

Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus Thermophilus'un Farklı Besiyerlerinde Gelişme Durumlarının İncelenmesi

Dr. A. Kadir HALKMAN — Adnan ÇAVUŞ — Vuslat BEKTAŞ

A.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü (Mikrobiyoloji)

1. GİRİŞ

Çoğu araştırmada kullanılan mikroorganizma kültürlerinin gelişme özelliklerinin bilinmesi gerekir. Özellikle endüstriyel mikrobiyolojiye yönelik çalışmalarda bu bilgiler önemlidir. Bu amaçla genellikle önce gelişme eğrisi çizilir, sonra buradaki değerler irdelenir.

Gelişme eğrisi; belirli zaman aralıkları ile kültürden alınan örneklerde hücre artışının çeşitli yöntemlerle belirlenmesi ile çizilir. Bu yöntemler kültürel sayım veya direk mikroskopik sayım ile hücre sayısının belirlenmesi, santrifüj sonrası yaş veya kuru ağırlık olarak hücre ağırlığının belirlenmesi, santrifüj ile elde edilen sedimentin hacminin ölçülmesi, toplam azot veya protein artışının belirlenmesi, kültür suspansiyonunun optik bulanıklığının ölçülmesi olup içlerinde en çok kullanılan kültürel sayım yöntemi ile canlı hücre sayısının belirlenmesidir (1, 15).

Bu çalışmada yoğurt starter bakterileri olarak bilinen **Lactobacillus bulgaricus** ve **Streptococcus thermophilus**'un 6 farklı besiyerinde gelişme eğrileri kültürel sayım yöntemi ile çizilmiş, ayrıca kültür pH ları da ölçülmüştür. Elde edilen değerlerden her iki bakteri için ayrı ayrı olmak üzere gelişme eğrilerinde logaritmik fazın sonuna ulaşma süresi, maksimum populasyon ve canlılık değerleri ile pH değerleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yoğurt starter kültürlerinin maksimum populasyonda ve aktif olarak üretilebilmeleri için araştırmacılar farklı besiyerleri önermişlerdir. Laktik kültürlerin amino asit gereksinimlerini karşılamak üzere aktif proteinaz sistemlerinin olması gerektiği ve sütlü besiyerleri dışında bu enzimin yüksek aktivite gösteremeyeceği belirtilmiştir (11). Laktik kültürlerin popülasyonlarını, artırmak amacı ile inkübasyon sırasında amonyum hidroksit ile yapılan nötralizasyonun yararları gösterilmiştir (3, 6).

Çeşitli çalışmalarda üretilmiş kültürlerin santrifüj ile ortamdan ayrılması istenir. Sütlü besiyerlerinde üremiş kültürler santrifüjlendiğinde bakteri ile süt proteinleri beraber çöktüğünden saf haide bakteri konsantratu elde edilememektedir. Ancak 'STADHOUDERS ve ark. (12) tarafından önerilen sodyum sitrat uygulaması ile santrifüj sonunda sadece bakteriler çökmekte süt proteinleri sıvı fazda kalmaktadır. Sentetik besiyerlerinde üremiş kültürlerin santrifüjle ayrılması kuşkusuz daha kolaydır. Bu amaçla laktobasil için MRS Broth, streptokok için APT Broth önerilir (8).

Liyolize edilecek yoğurt starter kültürlerinin % 20 - 25 yağsız süt kurumaddeli sütlü besiyerinde üretilmeleri ile liyolizasyon sonunda yüksek canlılık ve aktivite elde edilebileceği belirtilmiştir (5). Yoğurt starter kültürlerinin üretildiği sütlü besiyerine sakkaroz katılması halinde inkübasyon sonunda elde edilecek canlılık ve titre edilebilir asitliğin azaldığı, katılan sakkarozun % 9'dan fazla olması halinde kültür gelişmesinin inhibe edileceği gösterilmiştir (14). Bir başka çalışmada ise yoğurda işlenerek süütün kurumaddesinin % 9 ile % 30 arasında değişebileceği, toplam kuru maddenin proteinler, fosfatlar, sitratlar, laktat ve diğer süt bileşenlerine bağlı olarak titre edilebilir asitliği artırdığı ve pıhtılaşma süresini kısalttığı belirtilmiştir (13).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada BEYATİ (2) tarafından Ankara piyasası yoğurtlarından izole edilen yoğurt starter bakterilerinden **Lactobacillus bulgaricus D1** ile **Streptococcus thermophilus C3** suşları kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan besiyerleri

Araştırmada 6 farklı besiyeri kullanılmıştır.

Bunlar;

- 1) % 10 YSB⁽¹⁾
- 2) % 11 YSB + % 0.1 Tween 80
- 3) % 16 YSB
- 4) % 20 YSB
- 5) % 20 YSB + % 8 sakkaroz
- 6) Laktobasil için MRS Broth, Streptokok

için APT Broth.

3.2.2. İnokülasyon ve örnek alımı

Denemelerin başlangıç tarihinden 3 gün önce başlamak üzere kültürler 6 farklı besiyerinde 12 saat aralıklarla transfer edilerek aktifleştirilmişlerdir. Bu aktif kültürler besiyerlerine % 2 oranında inoküle edilmiş, besiyeri ve kültür iyice karıştırıldıktan sonra steril boş tüplere 10 ml alınmış ve tüpler $42 \pm 1^\circ\text{C}$ de inkübasyona bırakılmıştır. Bu tüplerden 0-2-4-6-8-10-12-14 saatlerde alınan örneklerde canlılık ve asitlik belirlenmiştir. Her besiyeri, bakteri ve süre için 2 tüpten elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır.

3.2.3. Kültürel sayım

Kültürel sayım KÖŞKER'e (9) göre yapılmış ve örneklerin ml sindeki canlı hücre sayıları hesaplanmıştır. Kültürel sayımda laktobasil için Tomato Juice Agar (7), streptokok için LEE Agar (10) kullanılmıştır. Tomato Juice Agar'a % 0.1 Tween 80 ilave edilmiştir. Kültür ile aşılınmış besiyerleri $42 \pm 1^\circ\text{C}$ da 48 saat inkübe edilmiştir.

3.2.4. pH ölçümü

Tüplerden canlı hücre sayımı için örnek alındıktan sonra pH metre ile tüp içindeki kültürün pH sı ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

6 besiyeri, 2 bakteri ve 8 ayrı sürede elde edilen canlılık (c) ve pH değerleri tablo (1)

de toplu halde verilmiştir. Tablo (1) de ayrıca gelişme eğrilerinin çizilmesinde kullanılan ml deki canlı hücre sayılarının logaritmaları da (log c) verilmiştir.

Tablo (1) deki log c ve pH değerleri milimetrik kağıda işlenerek 6 besiyeri ve 2 bakteri için 12 ayrı gelişme eğrisi elde edilmiştir. Bu eğriler şekil (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b,) de verilmiştir.

Şekil 1a : 1 nolu besiyerinde laktobasil gelişme eğrisi

Şekil 1b : 1 nolu besiyerinde streptokok gelişme eğrisi

Şekil 2a : 2 nolu besiyerinde laktobasil gelişme eğrisi

Şekil 2b : 2 nolu besiyerinde streptokok gelişme eğrisi
nuna ulaşma süreleri verilmiştir.

Şekil 3a : 3 nolu besiyerinde laktobasil gelişme eğrisi

Şekil 3b : 3 nolu besiyerinde streptokok gelişme eğrisi

Şekil 4a : 4 nolu besiyerinde laktobasil gelişme eğrisi

Şekil 4b : 4 nolu besiyerinde streptokok gelişme eğrisi

Şekil 5a : 5 nolu besiyerinde laktobasil gelişme eğrisi

Şekil 5b : 5 nolu besiyerinde streptokok gelişme eğrisi

Şekil 6a : MRS Broth besiyerinde laktobasil gelişme eğrisi

Şekil 6b : APT Broth besiyerinde streptokok gelişme eğrisi.

Şekillerdeki gelişme eğrilerinin incelenmesinden bakterilerin farklı besiyerlerinde farklı sürelerde logaritmik gelişme fazlarının sonuna ulaştıkları görülür. Tablo (2) de log c değerlerine göre logaritmik gelişme fazının so-

(1) Yağsız Süt Besiyeri kelimelerinin baş harflerinden oluşan kısaltmadır. Yabancı dilde skim-milk, Non Fat Milk (NFM), Solids Non Fat (SNF) yerine, bunların Türkçe karşılığı olarak kullanılmıştır.

Tablo 1 : Canlılık ve pH değerleri

Süre (Saat)	0	2	4	6	8	10	12	14
1. Besiyeri								
c	1.95 x 10 ⁷	5.08 x 10 ⁷	1.62 x 10 ⁸	4.83 x 10 ⁸	8.14 x 10 ⁸	1.10 x 10 ⁹	1.32 x 10 ⁹	1.29 x 10 ⁹
Log c	7.29	7.70	8.21	8.68	8.91	9.04	9.12	9.10
pH	6.55	5.82	5.16	4.30	4.03	3.91	3.84	3.80
c	6.03 x 10 ⁶	1.89 x 10 ⁷	5.00 x 10 ⁷	7.59 x 10 ⁷	1.78 x 10 ⁸	2.14 x 10 ⁸	2.51 x 10 ⁸	2.70 x 10 ⁸
Log c	6.78	7.28	7.70	7.88	8.25	8.33	8.40	8.43
pH	6.73	6.20	5.60	5.20	5.03	4.86	4.71	4.70
2. Besiyeri								
c	1.38 x 10 ⁷	5.62 x 10 ⁷	1.95 x 10 ⁸	4.38 x 10 ⁸	9.56 x 10 ⁸	1.15 x 10 ⁹	1.30 x 10 ⁹	1.11 x 10 ⁹
Log c	7.14	7.75	8.29	8.64	8.98	9.06	9.11	9.05
pH	6.59	5.41	4.95	4.30	4.03	3.90	3.80	3.75
c	1.91 x 10 ⁷	2.70 x 10 ⁷	6.61 x 10 ⁷	1.08 x 10 ⁸	1.66 x 10 ⁸	2.01 x 10 ⁸	2.43 x 10 ⁸	2.21 x 10 ⁸
Log c	7.28	7.43	7.82	8.03	8.22	8.30	8.39	8.34
pH	6.71	5.91	5.65	5.27	5.10	4.94	4.84	4.73
3. Besiyeri								
c	2.30 x 10 ⁷	1.06 x 10 ⁸	2.51 x 10 ⁸	3.69 x 10 ⁸	3.90 x 10 ⁸	4.26 x 10 ⁸	4.10 x 10 ⁸	4.31 x 10 ⁸
Log c	7.36	8.03	8.40	8.57	8.59	8.63	8.61	8.63
pH	6.55	6.28	5.60	4.87	4.45	4.34	4.26	4.19
c	5.10 x 10 ⁶	7.76 x 10 ⁶	1.70 x 10 ⁷	2.85 x 10 ⁷	3.15 x 10 ⁷	3.47 x 10 ⁷	3.30 x 10 ⁷	3.67 x 10 ⁷
Log c	6.71	6.89	7.23	7.45	7.50	7.54	7.52	7.56
pH	6.63	6.45	6.01	5.62	5.40	5.31	5.19	5.10
4. Besiyeri								
c	1.82 x 10 ⁷	6.04 x 10 ⁷	2.24 x 10 ⁸	4.25 x 10 ⁸	5.25 x 10 ⁸	5.75 x 10 ⁸	5.15 x 10 ⁸	5.01 x 10 ⁸
Log c	7.26	7.78	8.35	8.63	8.72	8.76	8.71	8.70
pH	6.48	6.23	5.70	5.05	4.66	4.50	4.39	4.32
c	1.85 x 10 ⁷	5.25 x 10 ⁷	2.01 x 10 ⁸	4.07 x 10 ⁸	5.50 x 10 ⁸	6.00 x 10 ⁸	7.24 x 10 ⁸	7.10 x 10 ⁸
Log c	7.27	7.72	8.30	8.61	8.74	8.78	8.86	8.85
pH	6.65	6.43	6.00	5.68	5.50	5.39	5.29	5.20
5. Besiyeri								
c	4.46 x 10 ⁶	8.50 x 10 ⁶	4.47 x 10 ⁷	1.70 x 10 ⁸	2.04 x 10 ⁸	2.50 x 10 ⁸	3.20 x 10 ⁸	3.40 x 10 ⁸
Log c	6.65	6.93	7.65	8.23	8.31	8.40	8.51	8.53
pH	5.40	6.25	5.94	5.19	4.73	4.50	4.21	4.09
c	1.33 x 10 ⁷	2.63 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁸	5.25 x 10 ⁸	5.50 x 10 ⁸	6.04 x 10 ⁸	5.75 x 10 ⁸	5.90 x 10 ⁸
Log c	7.13	7.42	8.20	8.72	8.74	8.78	8.76	8.77
pH	6.52	6.25	5.80	5.52	5.32	5.23	5.05	5.00
6. Besiyeri								
c	6.30 x 10 ⁶	1.42 x 10 ⁷	5.14 x 10 ⁷	1.35 x 10 ⁸	2.44 x 10 ⁸	2.82 x 10 ⁸	2.95 x 10 ⁸	2.88 x 10 ⁸
Log c	6.80	7.15	7.71	8.13	8.39	8.45	8.47	8.46
pH	5.65	5.48	5.30	5.00	4.71	4.57	4.40	4.30
c	5.14 x 10 ⁶	1.48 x 10 ⁷	7.98 x 10 ⁷	1.95 x 10 ⁸	4.90 x 10 ⁸	6.30 x 10 ⁸	6.08 x 10 ⁸	7.00 x 10 ⁸
Log c	6.71	7.17	7.90	8.29	8.69	8.80	8.78	8.85
pH	6.72	6.25	5.28	4.85	4.70	4.69	4.65	4.60

log c değerleri ile pH değerleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacı ile DÜZGÜNEŞ'e (4) göre hesaplanan korrelasyon katsayıları (r) tablo (3) de verilmiştir.

Tablo 2 : log c değerlerine göre logaritmik gelişme fazının sonuna ulaşma süreleri (saat)

Besiyeri no	1	2	3	4	5	6
Laktobasil	8	8	6	6	6	8
Streptokok	8	8	6	6	6	8

Tablo 3 : log c - pH arasındaki korrelasyon katsayıları

Besiyeri no.	Laktobasil	Streptokok
1	-0.998	-0.993
2	-0.992	-0.968
3	-0.895	-0.975
4	-0.932	-0.979
5	-0.800	-0.960
6	-0.945	-0.987

5. TARTIŞMA

Tablo (1) deki (c) değerlerinin incelenmesi ile besiyerlerinin maksimum popülasyona ulaşma üzerinde etkilerinin olduğu görülür. Laktobasil en yüksek popülasyona 1 nolu besiyerinde (% 10 YSB) ulaşmıştır. 2 nolu besiyerinde (% 11 YSB + 0.1 Tween 80) 1 nolu besiyerine oranla aynı sayıda canlı hücre elde edilmiştir. % 16 YSB, % 20 YSB ve % 20 YSB + % 8 sakkaroz olan 3, 4 ve 5 nolu besiyerlerinde elde edilen canlı hücre sayıları 1 ve 2 nolu besiyerlerine oranla daha azdır. Sütlü besiyerleri arasında en düşük canlılık 5 nolu besiyerinde elde edilmiştir.

Streptokok'un canlı hücre sayımları laktobasilden farklı bulunmuştur. 1 ve 2 nolu besiyerlerinde birbirine yakın değerler elde edilmiştir. % 16 YSB (3 nolu besiyeri) canlı hücre sayısının en düşük olduğu besiyeri iken % 20 YSB de (4 nolu besiyeri) $7, 10 \times 10^8$ ile en yüksek canlı hücre sayısı elde edilmiştir. % 20 YSB + % 8 sakkaroz (5 nolu besiyeri)

% 20 YSB den biraz daha az canlı hücre sayısı vermiş olup sütlü besiyerleri arasında 2. sırada yer almıştır.

Sentetik besiyerleri (MRS, APT) canlı hücre sayısı açısından sütlü besiyerleri ile kıyaslandığında laktobasil'in üretildiği MRS Broth'un bütün sütlü besiyerlerinden daha az canlı hücre sayısı verdiği, streptokok'un üretildiği APT Broth'un ise genel sıralamada en iyi 2. besiyeri olarak yer aldığı görülür.

ml deki canlı hücre sayılarının logaritmaları ile çizilen gelişme eğrilerindeki logaritmik gelişme fazının sonuna ulaşma açısından da besiyerleri farklı sonuçlar vermişlerdir. (Tablo (2)'nin incelenmesi ile her iki bakteri içinde ve 1 ve 2 nolu besiyerlerinde (% 10 YSB, % 11 YSB + % 0.1 Tween 80) bu süre 8 saat iken 3, 4 ve 5 nolu besiyerlerinde (% 16 YSB, % 20 YSB, % 20 YSB + % 8 sakkaroz) 6 saat, sentetik besiyerleri olan MRS ve APT Broth da (6 nolu besiyeri) 8 saattir. Bununla beraber yüksek kurumaddeli sütlü besiyerleri olan 3, 4 ve 5 nolu besiyerlerinde laktobasilde 8. saatte elde edilen canlı hücre sayıları düşük kurumaddeli sütlü besiyerlerindeki (1 ve 2 nolu besiyerleri) daha azdır. Streptokokta ise düşük kurumaddeli sütlü besiyerlerindeki 6. saat canlı hücre sayıları sadece genel olarak en düşük canlı hücre sayısını veren % 16 YSB'nden (3 nolu besiyeri) fazla, % 20 YSB ve % 20 YSB + % 8 sakkarozdan ise azdır.

Log c değerleri ile pH değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren tablo (3)'ün incelenmesinde her iki bakteri içinde en kuvvetli ilişkinin % 10 YSB de (1 nolu besiyeri) en zayıf ilişkinin % 20 YSB + % 8 sakkaroz (5 nolu besiyeri) da olduğu görülür. Genel olarak bu ilişki streptokok da laktobasile oranla daha kuvvetli bulunmuştur.

6. SONUÇ

Lactobacillus bulgaricus D1 ve *Streptococcus thermophilus* Ç3 suşları için farklı besiyerleri farklı gelişme özellikleri sağlamışlardır. Laktobasil için % 10 YSB, % 11 YSB + % 0.1 Tween 80, streptokok için % 20 YSB ve APT Broth en yüksek canlı hücre sayıları vermişlerdir. Bu araştırma kullanılan bakteri cins ve türüne göre besiyeri seçiminin önemi ni göstermiştir.

SUMMARY

Different media gave different growth parameters for *L. bulgaricus* D1 and *S. ther-*

mophilus Ç3. 10 % NFM and 11 % NFM + 0.1 % Tween 80 for *L. bulgaricus*, 20 % NFM and APT Broth for *S. thermophilus* were the best media according the c.f.u. Values.

KAYNAKLAR

- 1) ARDA, M. 1978. Genel Bakteriyoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları no. 342. Üniversitesi Basımevi, 521 s.
- 2) BEYATİ, Y. 1982. Yoğurtlarda İzole Edilen Kimi Bakterilerin Starter Olarak Seçilme Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, A.Ü. Ziraat Fakültesi Ziraat Mikrobiyolojisi Birimi. 102 s.
- 3) BLAINE, J.W. 1972. Preparation and Preservation of Lactic Acid Starter Culture Concentrates. Dissertation Abstracts International B, 33 (1) 340.
- 4) DÜZGÜNEŞ, O. 1975. İstatistik Metodları. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. no. 578. Ankara Üniversitesi Basımevi, 179 s.
- 5) GAVIN, M. La Lyophilisation des Cultures de Yoghourt. These no 4227. de E'cole Polytechnique Federale Zurich, 126 s.
- 6) GILLILAND, S.E. 1977. Preservation and Storage of Concentrated Cultures of Lactic Streptococci. J. Dairy Science 60 (5) 805 - 809.
- 7) HARRIGAN, W.F., M.E. Mc CANCE. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London, New York. 362 s.
- 8) KILARA, A., K.M. SHAMANI, N.K. DAS. 1976. Effect of Cryoprotective Agents on Freeze - Drying and Storage of Lactic Cultures. Cultured Dairy Products J. 11 (2) 8 - 11.
- 9) KÖŞKER, Ö. 1976. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. No. 586. Ankara Üniversitesi Basımevi 138 s.
- 10) LEE, S.Y., E.R. VEDAMUTHU, C.J. WASHAM, 1974. An Agar Medium for the Differential Enumeration of Yoghurt Starter Bacteria. J. or Milk, Food Tech. 37 (5) 272 - 276.
- 11) SPECKMAN, C.A. 1975. Preparation, Evaluation and Use of Lyophilized Concentrated Dairy Starter Cultures in Cheese and Yoghurt Manufacture. P.H.D. Thesis. OREGON, 86 s.
- 12) STADHOUDERS, J., L.A. JANSEN, G. HUP. 1969. Preservation of Starters and Mass Production of Starter Bacteria. Netherlands Milk Dairy J. 23: 182 - 199.
- 13) TAMIME, A.Y., H.C. DEETH. 1980. Yoghurt: Technology and Biochemistry. J. of Food Protection, 43 (12) 939 - 977.
- 14) TRAMER, J. 1973. Yoghurt Cultures. J. of Soc. of Dairy Tech. 26 (1) 16 - 21.
- 15) TUNAİL, N. 1979. Kimyasal Mikrobiyoloji Ders Notları (Basılmamış) A.Ü. Ziraat Fakültesi Z. Mikrobiyolojisi Kürsüsü.