



**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN İZOLE EDİLEN
Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus delbrueckii*
subsp. *bulgaricus* İZOLATLARININ MOLEKÜLER
TANIMLANMASI ve ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melike VURMAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı
Doç. Dr. Enes DERTLİ
2020
(Her Hakkı Saklıdır)**

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN İZOLE EDİLEN *Streptococcus thermophilus* ve
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* İZOLATLARININ MOLEKÜLER
TANIMLANMASI VE ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

(Molecular Identification and Investigation of Industrial Importance of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Isolates Isolated From Traditional Yoghurts)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melike VURMAZ

Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

Bayburt
Şubat, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Doç. Dr. Enes DERTLİ danışmanlığında, 182003007 numaralı Melike VURMAZ tarafından hazırlanan “Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* İzolatlarının Moleküler Tanımlanması ve Endüstriyel Öneme Sahip Özelliklerinin Araştırılması” adlı bu çalışma 28/02/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği (Atatürk Üni. Ortak) Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL

İmza: ..M. Şengül.....

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Enes DERTLİ

İmza: ..Enes Dertli.....

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Emin MERCAN

İmza: ..Emin Mercan.....

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÇAKIR

İmza: ..Özlem Çakır.....

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Tayyibe ERTEN

İmza: ..Tayyibe Erten.....

Bu tezin Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirildiğini onaylıyorum.

..03/03/2020

Doç. Dr. Fatih GÜRBÜZ
Enstitü Müdür Vekili

ETİK VE BİLDİRİMİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* İzolatlarının Moleküler Tanımlanması ve Endüstriyel Öneme Sahip Özelliklerinin Araştırılması’’ başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Melike VURMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım zorlukları bilgi ve birikimi ile aşmamda yardımcı olan, tez çalışmam boyunca gerekli tüm imkânları sağlayan, eğitici, çalışkan ve paylaşımcı kişiliğiyle yüksek lisans eğitimim boyunca bana ışık tutan, saygı değer hocam Doç. Dr. Enes DERTLİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Yüksek Lisans eğitimimde sizinle çalışabilmenin mutluluğunu ve gururunu yaşıyorum.

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvarında beraber çalıştığım, her zaman manevi desteğini esirgemeyen, çeşitli sorunlarımda her türlü yardımıyla bana destek olan, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle her zaman beni bilgilendiren, yoğun çalışma temposunda bile her zaman vakit ayırabilen, değerli hocam Sayın; Öğretim Görevlisi Hümeysra İSPİRLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda HPLC analizlerinde engin bilgi ve birikimiyle çalışmamda yardımcı olan Öğretim Görevlisi Mustafa Onur YÜZER'e, tez takip süresince yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Emin MERCAN'a ve tez yazım aşamasında bilgilerini eksik etmeyen Araştırma Görevlisi Dr. Emin USLU' ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimlerimi beraber tamamladığım, çalışmalarım boyunca desteğini hep hissettiğim, her anımı beraber geçirdiğim, her türlü zorlukların üstesinden beraber geldiğimiz, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, kendisi ile zor anlarımda bile gülebildiğim, hayat enerjisi, güler yüzlülüğü ve pozitif düşünceleri ile motive olmamı sağlayan, Gıda Yüksek Mühendisi Adayı Yasemin KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın her evresinde benimle olan, varlıkları beni cesaretlendiren, aldığım her kararda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem Elif VURMAZ ve babam Mehmet VURMAZ' a, bana her zaman abilik yapan sevgili amcam Lütfi VURMAZ'a, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman dualarıyla yanımda olan babaannem, halalarım ve sevgilerini hep hissettiğim kardeşlerime sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Yoğurt suşlarının saflaştırılması ve geliştirilmesi aşamalarındaki katkılarından dolayı Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş. Ar-Ge' ye teşekkürlerimi arz ediyorum.

Bu tez çalışması 116G024 numaralı KAMAG projesi ile TÜBİTAK tarafından desteklenen proje sonuçları sonucunda ortaya çıkmıştır. Proje ile tez çalışmasını ve burs ile de tez öğrencisini destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GELENEKSEL YOĞURTLARDAN İZOLE EDİLEN *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* İZOLATLARININ MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melike VURMAZ

Şubat 2020, 85 sayfa

Yoğurt ülkemizde ve dünyada en fazla tüketilen süt ürünlerinin başında gelmektedir. Yoğurt üretiminden yoğurt starter kültürleri *S. thermophilus* ile *L. bulgaricus* sorumludur. Endüstriyel olarak yoğurt üretimi ticari yoğurt starter kültürleri ile gerçekleştirilmektedir. Geleneksel üretimde ise o yöreye özgü geleneksel yoğurt kültürleri kullanılmaktadır. Fakat her geçen gün bu tip kültürlerin sayısı azalmaktadır. Ticari kültürlerin dominant olması aynı zamanda yoğurt üretiminin tek tipleşmesine ve geleneksel yoğurt özelliklerinin kaybına sebebiyet vermektedir. Bu çerçevede geleneksel yoğurt kültürlerinin izolasyonu ve endüstriyel starter kültür olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması oldukça önemli bir husus olarak değerlendirilmektedir. Bu tez kapsamında geleneksel yoğurt başlatıcı kültürlerinin endüstride kullanım olanaklarının artırılması hedeflenmiştir. Öncelikle ülkemizin 10 farklı bölgesinden inek, manda, keçi ve koyun sütleri ve geleneksel olarak üretilen yoğurtlar örnekleri toplanmıştır. Her iki suşun da izole edilmesi amacıyla özel besiyerlerine ekimi takiben farklı koloniler morfolojik değerlendirme ve Gram boyama sonrasında seçilmiş ve bu suşlara özgü geliştirilen primerler kullanılarak PCR işlemi ile suşların yoğurt starterlerine ait oldukları gösterilmiştir. Takiben RAPD-PCR işlemi ile genotipik ön tiplendirme gerçekleştirilmiş ve suşların *S. thermophilus* ile *L. bulgaricus* oldukları 16S rRNA analizi ile ortaya konmuştur. Suşların detaylı genotipik tiplendirilmesi amacıyla da MLST tekniği kullanılmış ve farklı suşlar sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Genotipik olarak geliştirilen 34 adet *S. thermophilus* ve 45 adet *L. bulgaricus* suşlarının başlatıcı kültür olarak kullanılması için teknolojik özellikleri araştırılmıştır. Teknolojik özellikler olarak yoğurt kültürlerinin % laktik asit üretim miktarları, pH geliştirme yetenekleri, proteolitik aktiviteleri, bakteriyofajlara karşı dirençlilikleri ve ekzopolisakkarit üretim miktarları ile üretilen ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonları araştırılmıştır. Teknolojik özellikleri belirlenen yoğurt kültürlerinde öne çıkan suşlar belirlenmiştir. Bu suşlardan 11 adet *S. thermophilus* suşu ve 19 adet *L. bulgaricus* suşu en iyi teknolojik özellik gösteren başlatıcı kültürler olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, PCR, MLST, ekzopolisakkarit.

ABSTRACT

MASTER THESIS

MOLECULAR IDENTIFICATION and INVESTIGATION of INDUSTRIAL IMPORTANCE of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Isolates ISOLATED FROM TRADITIONAL YOGHURTS

Melike VURMAZ

February 2020, 85 Pages

Yogurt is one of the most consumed dairy product in Turkey and all over the world. Yogurt starter cultures *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* is responsible for yogurt production. Commercial yogurt starter cultures are used for the yogurt production at industrial level. In traditional production, autochthonous cultures are used for the yogurt production although the number of autochthonous cultures is decreasing due to the domination of the commercial starters which also results in the decrement of the variation in the characteristics of yogurt. In this respect, isolation and identification of autochthonous starter cultures that can be used for industrial purposes is a crucial task. This thesis is aimed to evaluate the potential of autochthonous starter cultures to be used for industrial purposes. For this aim, traditional yogurts were collected from 10 different regions of Turkey. Specific mediums were used to isolate both starter cultures from yogurt samples and isolated were tested for their morphology and Gram stain which was followed by the test of yogurt starters by PCR reactions. The pre-typing of the isolated were conducted by RAPD-PCR analysis and *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* strains were identified by 16S rRNA sequencing. MLST analysis was applied for the molecular typing of the strains and distinct isolated were selected for further studies. In total 44 *S. thermophilus* and 31 *L. bulgaricus* strains were tested for their technological characteristics in terms of lactic acid production level %, pH development characteristics, proteolytic activities, resistance to certain bacteriophages and EPS production characteristics and strains that revealed good characteristics were determined. Among these strains, 11 *S. thermophilus* and 19 *L. bulgaricus* strains revealed important characteristics to be used as starter cultures at industrial level.

Keywords: *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, PCR, MLST, exopolysaccharides.

İÇİNDEKİLER

ETİK VE BİLDİRİMİ	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLOLAR DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xi
BİRİNCİ BÖLÜM.....	1
Giriş	1
İKİNCİ BÖLÜM	4
Kaynak Özetleri.....	4
Yoğurt	4
Yoğurt bileşenleri ve sağlık üzerine etkileri.....	4
Yoğurt Florası ve Yoğurt Üretiminde Kullanılan Başlatıcı Kültürler	8
<i>L. bulgaricus</i>	8
<i>S. thermophilus</i>	8
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> arasındaki simbiyotik ilişki.....	9
Yoğurt Üretiminde Kullanılan Starter Kültürlerin Metabolizması.....	10
Yoğurt Üretiminde Kullanılan Başlatıcı Kültürlerde Aranılan Özellikler.....	11
Asit üretimi.....	11
Proteolitik aktivite.....	11
EPS yetenekleri.....	12
Faj dirençliliği.....	13
Antimikrobiyal özellik.....	16
Yoğurt Kültürlerinin Tanımlanması	17
Fenotipik tanımlama.....	17
Genotipik tanımlama.....	17
16S rRNA gen dizilimi.....	18
Alt tür tanımlanmasında MLST tekniği.....	18
Tezin Amacı.....	18

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	19
Materyal ve Yöntem	19
Materyal	19
Yoğurt örnekleri.....	19
Besiyerleri ve kimyasallar.	19
Çalışmada kullanılan Primerler.	23
Yöntem.....	24
Yoğurt örneklerinden bakteri izolasyonunda kültür ortamının oluşturulması ve büyüme koşulları.	24
Kültür stoklarının oluşturulması ve izolatların depolanması.....	24
Yoğurt kültürlerinin fenotipik tanımlanması.	25
Koloni morfolojisi.....	25
Gram boyama.....	25
Yoğurt kültürlerinde moleküler çalışmalar.....	25
Yoğurt kültürlerinden genomik DNA izolasyonu.	25
Yoğurt kültürlerine özgü primerler kullanılarak kültürlerin PCR ile kontrolü.....	26
Yoğurt kültürlerinin RAPD-PCR ile genotipik ayrımı.	27
İzolatların 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu.	28
PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü.....	29
Dizi analizi.....	30
İzolatların alt tür tanımlanmasında MLST tekniğinin kullanımı.	30
İzole edilen suşların teknolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	31
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların asit geliştirme özelliklerinin belirlenmesi.	31
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların % laktik asit miktarının belirlenmesi.	32
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.	32
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların faj dirençliliğinin belirlenmesi.	33
Laktozlu modifiye BHI ortamında geliştirilen türlerin eps izolasyonu ve saflaştırılması...33	
İzole edilen suşların fenol-sülfirik asit testi ile EPS üretim miktarı analizi.	34
Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi.....	34
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	35
Yoğurttan Gram +, Katalaz – Suşların İzolasyonu Amacıyla Bakterilerinin Fenotipik Karakterizasyonu	35
Yoğurt Bakterilerinin Genotipik Tanımlanması	36
Yoğurt bakterilerinin PCR işlemi ile kontrolü.....	36

RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon.....	39
<i>S. thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i> Pozitif Türlerin 16S rRNA Genlerinin Sekanslanması...	40
İzolatların alt tür tanımlanmasında MLST tekniğinin kullanımı.....	42
İzole Edilen Suşların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	48
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların % laktik asit miktarının belirlenmesi.	48
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> türlerine ait suşların ph geliştirme özelliklerinin belirlenmesi.....	50
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	52
<i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> suşların faj dirençliliğinin belirlenmesi.....	54
Suşların fenol-sülfirik asit Testi ile EPS üretim miktarının belirlenmesi.....	58
Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi.....	59
BEŞİNCİ BÖLÜM.....	64
Sonuç ve Öneriler	64
Kaynakça.....	68
EKLER	76
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>L. bulgaricus</i> ışık mikroskopunda görüntüsü	8
Şekil 2. <i>S. thermophilus</i> ışık mikroskopunda görüntüsü.....	9
Şekil 3. <i>S. thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i> Arasındaki Simbiyotik İlişki.....	10
Şekil 4. Yoğurt üretiminde laktöz fermantasyonu	10
Şekil 5. Enantiyomerik laktik asit formları.....	11
Şekil 7. Kuyruklu bakteriyofaj.....	14
Şekil 8. Bradley'in faj sınıflandırması	15
Şekil 9. Fajların litik ve lizojenik döngüsü	16
Şekil 10. 16S rRNA geni	29
Şekil 12. Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.	30
Şekil 13. <i>L. bulgaricus</i> suşunun gram boyama ile ışık mikroskopunda görüntüsü	35
Şekil 14. <i>S. thermophilus</i> suşunun gram boyama ile ışık mikroskopunda görüntüsü.....	35
Şekil 15. <i>S. thermophilus</i> pozitif ve negatif çıkan izolatlarla ait jel görüntüsü	36
Şekil 16. <i>S. thermophilus</i> pozitif ve negatif çıkan izolatlarla ait jel görüntüsü	36
Şekil 17. <i>L. bulgaricus</i> pozitif ve negatif çıkan izolatlarla ait jel görüntüsü	37
Şekil 18. <i>L. bulgaricus</i> pozitif ve negatif çıkan izolatlarla ait jel görüntüsü	37
Şekil 19. <i>S. thermophilus</i> pozitif çıkan izolatların GTG5 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.	39
Şekil 20. <i>L. bulgaricus</i> pozitif çıkan izolatların GTG5 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.	40
Şekil 21. <i>S. thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i> pozitif suşlarda 16S geninin amplifikasyonunu gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.....	41
Şekil 22. <i>S. thermophilus</i> ve <i>L. bulgaricus</i> pozitif suşlarda 16S rRNA geninin amplifikasyonunu gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.....	41
Şekil 23. <i>S. thermophilus</i> suşlarında rpoB, recA ve pyrG bölgelerinin ampilikasyonunu gösteren agaroz jel görüntüleri	43
Şekil 24. <i>L. bulgaricus</i> suşlarında, B-rpoB, B-recA, B-phes bölgelerinin ampilikasyonunu gösteren agaroz jel görüntüleri	43
Şekil 25. <i>L. bulgaricus</i> suşlarının MLST analiz çerçevesinde rpoB bölgesi baz alınarak UPGMA metodu ile oluşturulan dendogram.....	45

Şekil 26. <i>L. bulgaricus</i> suşlarının MLST analiz çerçevesinde pyrG bölgesi baz alınarak UPGMA metodu ile oluşturulan dendogram.....	46
Şekil 27. <i>L. bulgaricus</i> suşlarının MLST analiz çerçevesinde recA bölgesi baz alınarak UPGMA metodu ile oluşturulan dendogram.....	46
Şekil 28. 44 <i>L. bulgaricus</i> türlerinde pH değerleri	51
Şekil 29. 31 <i>S. thermophilus</i> türlerinde pH değerleri.....	51
Şekil 30. İzolataların fajlara karşı dirençli(B) ve duyarlı(A) olduklarını gösteren petri.....	55
Şekil 31. <i>L. bulgaricus</i> B16Y75 suşunun ürettiği EPS'in HPLC kromatogramı.....	60
Şekil 32. <i>S. thermophilus</i> B61Y5 suşunun ürettiği EPS'in HPLC kromatogramı.....	61
Şekil 33. <i>L. bulgaricus</i> B12Y68 suşunun ürettiği EPS'in HPLC kromatogramı.....	61



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Yoğurdun Besinsel İçeriği (100 g)	6
Tablo 2. Modifiye MRS Agar için Kullanılan Besiyeri Bileşimi.....	19
Tablo 3. Skim Milk Besiyeri Bileşimi	20
Tablo 4. Laktozlu Modifiye BHI Besiyeri Bileşimi	20
Tablo 5. Modifiye M17 Broth Bileşimi	21
Tablo 6. Elliker Broth Bileşimi.....	21
Tablo 7. Modifiye M17 Yumuşak Agar Bileşimi.....	22
Tablo 8. Modifiye M17 Agar Bileşimi	22
Tablo 9. Tez Çalışmasında Kullanılan Primeriler	23
Tablo 10. <i>S. thermophilus</i> Suşlarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan PCR Karışımı	26
Tablo 11. <i>S. thermophilus</i> Suşlarının Belirlenmesi için Oluşturulan PCR Şartları.....	27
Tablo 12. <i>L. bulgaricus</i> Suşlarının Belirlenmesi için Hazırlanan PCR Karışımı	27
Tablo 13. <i>L. bulgaricus</i> Suşlarının Belirlenmesi için Oluşturulan PCR Şartları.....	27
Tablo 14. RAPD-PCR Analizi için Hazırlanan PCR Karışımı.....	28
Tablo 15. RAPD-PCR Analizi için Oluşturulan PCR Şartları	28
Tablo 16. 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Karışımı	29
Tablo 17. 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Şartları.....	29
Tablo 18. MLST Analizi için Hazırlanan PCR Karışımı	31
Tablo 19. MLST Analizi için Oluşturulan PCR şartları	31
Tablo 20. <i>S. thermophilus</i> İzolatlarının <i>pyrG</i> , <i>recA</i> ve <i>rpoB</i> MLST Bölgeleri için Allel Tipleri.....	44
Tablo 21. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> Türlerinde % Laktik Asit Miktarı	49
Tablo 22. <i>L. bulgaricus</i> ve <i>S. thermophilus</i> Türlerin Proteolitik Aktiviteleri.....	53
Tablo 23. <i>L. bulgaricus</i> Suşlarının Bakteriyofaj Dirençliliği.....	56
Tablo 24. <i>S. thermophilus</i> Suşlarının Bakteriyofaj Dirençliliği.....	57
Tablo 25. Suşların Fenol-Sülfirik Asit Testi ile EPS Üretim Miktarı.....	59
Tablo 26. EPS'lerin Monosakkarit Kompozisyonunun Belirlenmesi	63

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

L	:Litre
LAB	:Laktik Asit Bakterileri
Mg	:Miligram
mL	:mililitre
mM	:Milimolar
PCR	:Polymerase Chain Reaction
Rpm	:Dakikada Devir Sayısı
MLST	:Multilocus Sequence Typing
rRNA	:ribosomal RNA
OD	:Optik Dansite
HPLC	:Tüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TÜBİTAK	:Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
EPS	:Ekzopolisakkarit
MRS	:DeMan Rogosa Sharpe
L.	: <i>Lactobacillus</i>
S.	: <i>Streptococcus</i>
pH	:Aktif hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
°C	:Santigrat Derece
Ca	:Kalsiyum
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
UV	:Ultraviyole
TCA	:Trikloroasetik asit

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

Yoğurt bakterilerinin sütte bulunan laktozu kullanarak laktik asit fermantasyonu sonu elde edilen süt ürünü olarak ilk üretim tarihi net olarak bilinmese de (Cheng, 2010) Türklere has bir süt ürünüdür. Türk Gıda Kodeksi' ne göre yoğurt; *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subps. *bulgaricus* kültürleri kullanılarak üretilen süt ürünü olarak tanımlanmıştır (FAO/WHO, 2011). FAO/WHO ise yoğurdu içine süt ürünleri ilave edilmiş veya edilmemiş sütün *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin sütte oluşturduğu fermantasyon sonucu elde edilen pıhtılaşmış süt olarak tanımlamıştır (FAO/WHO, 2011).

S. thermophilus ve *L. bulgaricus* türleri arasında bulunan simbiyotik ilişki yoğurt üretiminde rol oynamaktadır. *S. thermophilus* suşları ürettikleri formik asit, piruvik asit ve karbondioksit ile *L. bulgaricus*'un gelişimini teşvik etmektedir. Aynı şekilde *L. bulgaricus* sütte bulunan proteinlerin peptitler ve serbest amino asitlere parçalanmasını sağlayarak *S. thermophilus*'un kullanabilmesini ve böylece gelişimini teşvik etmektedir. Yoğurt üretiminde kullanılan bu kültürler sütte bulunan laktozu kullanarak laktik asit üretmektedir. Asit üretimi ile sütte asitlik artmakta ve böylelikle pıhtılaşma gerçekleşmektedir. Fermantasyon ile çeşitli bileşenler ve metabolitler oluşmaktadır. Oluşan bu metabolitler yoğurda özgü tat ve aromanın gelişmesini sağlamaktadır. Ayrıca yoğurt kültürleri tarafından üretilen ekzopolisakkarit (EPS) ile yoğurdun viskozitesini arttırmaktadır (Nagaoka, 2019).

Kendine özgü tat ve aroması olan yoğurt zengin vitamin, mineral, kalsiyum ve protein içeriğine sahiptir. Yoğurdun besleyici özelliğinin yanı sıra laktoz intoleransı, kabızlık ve ishal gibi hastalıklarda olumlu etkilerinin olduğu da belirlenmiştir (Cheng, 2010).

Yoğurt üretiminde *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türleri başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadır. Başlatıcı kültür kullanımında, pH geliştirme, % laktik asit üretim miktarları, proteolitik aktiviteleri, bakteriyofajlara karşı dirençlilikleri ve EPS üretimleri gibi özellikler aranmaktadır. Bu aranan özelliklerden en önemlisi asidifikasyon, sütün mikrobiyal olarak korunmasında oldukça önem arz etmektedir. Kültürler gelişimleri esnasında sütte bulunan laktozu fermente ederek sütün asitliğinin artmasına neden olmaktadır. Sütteki asitliğinin artması ile yoğurtta patojen mikroorganizmaların gelişimi önlenmektedir. Bununla birlikte asitliğin artması ile pıhtı yapısı da oluşmaktadır (Ruas-Madiedo, Hugenholtz, & Zoon, 2002).

Yoğurt fermantasyonu ile pH düşmekte ve pH 5.3 olduğunda ise kazein misellerinin stabil yapısı bozulmaktadır. Kazein misellerinin yapısının bozulması ile jel yapı oluşmaktadır (Duboc & Mollet, 2001). Yoğurt üretiminde asitliğin artması ile yoğurdun pH'sı düşmekte ve patojen mikroorganizmaların gelişimi durmakta bu da yoğurtta antimikrobiyal aktivitenin oluşmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra yoğurt bakterilerinin ürettikleri hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi metabolitlerle yoğurtta antimikrobiyal etkinin oluşmasında etkili olmaktadır (Akpınar, Yerlikaya, & Kiliç, 2011).

Yoğurt üretiminde ürün kalitesini arttırmak amacıyla süte yağ, proteinler veya şekerler ilave edilmektedir. Bununla birlikte pektin, nişasta, alginat ve jelatin gibi stabilizörler de kullanılabilir. Ancak stabilizatörler ile üretilen yoğurtlar tüketiciler tarafından fazla kabul görmemekte ve yasal olarak ülkemiz dâhil pekçok ülkede stabilizörlerin kullanımına izin vermemektedir. Son yıllarda LAB tarafından üretilen EPS'ler yoğurdun reolojik özelliklerini geliştirdiği bazı araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Bununla birlikte LAB tarafından üretilen EPS'lerin insan sağlığı üzerinde de iyileştirici etkilerinin bulunması EPS'lerin kullanımını arttırmaktadır (Duboc, & Mollet, 2001; Ruas-Madiedo *vd.*, 2002).

Yoğurt üretiminde başlatıcı kültürlerde aranan diğer bir özellik proteolitik aktivitedir. *S. thermophilus* türlerinin gelişimleri için peptitler ve aminoasitlere ihtiyaç duymaktadır. *Lb. bulgaricus* türleri ise ortamda bulunan proteinleri daha küçük birimlere parçalanmasını sağlayarak *S. thermophilus* türlerinin gelişmelerini teşvik etmektedirler (Nagaoka, 2019). Bununla birlikte proteolitik aktivitenin gerçekleşmesi ile yoğurdun tekstüründe de iyileştirme olduğu bildirilmiştir (Pescuma, Hébert, Mozzi, & Valdez, 2007; Yüksekdağ, & Beyatlı, 2003).

Yoğurt üretiminde en büyük sorunlardan biri olan bakteriyofaj enfeksiyonları ise yoğurt oluşumunu önlemektedir. Faj enfeksiyonu ile fermantasyon süresi uzamakta ve zamanla fermantasyon gerçekleşmemektedir. Bu nedenle başlatıcı kültürlerde aranan diğer bir özellikte yoğurt kültürlerinin fajlara karşı direnç göstermeleridir (Mc Grath, Van Sinderen, & Fitzgerald, 2002).

Ülkemizde geleneksel olarak üretilen ve Türkler tarafından yaygın olarak tüketilen yoğurt zengin bir mikroflora içermektedir. Endüstriyel olarak üretilen yoğurtlar *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türlerini içerirken geleneksel olarak üretilen yoğurtlar bahsi geçen iki bakterinin yanı sıra, farklı LAB ve mayalar da bulundurabilmektedir. Yoğurtlarda maya bulunması kirliliğin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra geleneksel olarak üretilen yoğurtlarda gelişen mayaların yoğurtta tat ve kokuya etki edebildikleri bilinmektedir. Geleneksel yoğurtlarda gelişebilen probiyotiklerin ise insan sağlığını iyileştirici olduğu bildirilmiştir (Roostita, & Fleet, 1996).

Ülkemizde sevilerik tüketilen yoğurt geleneksel olarak üretilesinin yanı sıra günümüzde endüstriyel olarak da çok yüksek oranda üretmektedir. Endüstriyel yoğurt üretiminin artması ile birlikte ticari yoğurt kültürleri de artmaktadır. Böylece ticari kültürler zamanla geleneksel üretimde kullanılan yoğurt kültürlerinin yerini almaktadır. Ticari kültürler ise geleneksel yoğurtlara özgü tat ve aromanın değişmesine neden olmaktadır. Bu tez kapsamında geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan izole edilen kültürlerin endüstriyel olarak üretimlerini sağlamak amacıyla çeşitli özellikleri incelenmiştir. Bu bağlamda, Türkiye'nin farklı bölgelerinden inek, keçi, koyun ve manda sütünden geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan kültür izolasyonu ve tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Takiben, tanımlanan yoğurt kültürlerinin yoğurt üretiminde kullanılma potansiyellerinin incelenmesi amacıyla başlatıcı kültürlerde aranan özellikler araştırılmıştır. Bu çerçevede bu tez kapsamında geleneksel yoğurtlarımızdan izole edilen LAB izolatlarının genotipik ayrımının gerçekleştirilmesinin ardından, seçilen geleneksel yoğurt bakterilerinde asit üretimi, proteolitik aktivite, EPS üretme, faj dirençliliği ve antimikrobiyal gibi starter kültürde bulunması zorunlu olan özellikler araştırılmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

Kaynak Özetleri

Yoğurt

Geçmişte insanların fermente ürünleri nasıl bulduklarına dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak ilerleyen süreçte fermantasyon işlemi ile gıda maddelerinde bozulmaları önlemek için kullanılmaya başlanıldığı bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Chandan, Gandhi, & Shah, 2017). Yoğurdun tam olarak hangi dönemde çıktığına ilişkin farklı bilgiler bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda süt veren hayvanların evcilleştirildiği M.Ö. 5000 dönemlerde yoğurt üretiminin yapıldığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra bazı kutsal kitaplarda da yoğurt ile ilgili bilgiler yer almaktadır. Türklerin yoğurt tüketimi ise uzun yıllar öncesine dayandığı düşünülmektedir. Orta Asya kavimleri ile İskitler 'de tüketildiği ve Kafkaslarda, Karadeniz ve Hazar Denizi arasında yaşayan Türklerin yoğurt tükettiği yapılan araştırmalarda belirlenmiştir. Bununla beraber Uygarca yazılan metinlerde, Divan-u Lugati Türk ve Kutadgu Bilik eserlerinde de yoğurt tüketildiğine dair bilgiler yer almaktadır (Özer, & Özer, 2006). Türklerin yoğurt olarak ifade ettiği fakat yıllar boyunca farklı ülkelerde farklı isimlerde kullanıldığı için tarihi tam olarak bilinmemektedir. Örneğin; Ermenistan'da katık, Hindistan'da dahi, İran'da direk, Suudi Arabistan'da leben raib, Irak ve Lübnan'da laban, Sudan'da roba ve İspanya'da cuajada gibi isimler ile kullanılmıştır (Fisberg, & Machado, 2015).

Yoğurt süte *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerinin ilave edilmesi ile sütte asitlik ve pıhtılaşma oluşmasıyla meydana gelmektedir (Breslaw, & Kleyn, 1973). İlave edilen bu bakteriler ortamda bulunan laktozu kullanarak laktik asit oluşturmaktadır. Oluşan asitlik ile sütün başlangıçtaki pH'sını 6.3-6.5'ten 4.6 civarlarına düşmekte ve böylece yoğurda özgü tat ve aroma oluşmaktadır (Köse, & Ocak, 2014).

Yoğurt bileşenleri ve sağlık üzerine etkileri.

Sütte bulunan bileşenler ile yoğurtta bulunan bileşenler farklılık gösterebilmektedir. Örneğin sütteki laktoz miktarı yoğurttaki laktozda daha fazladır. Bunun nedeni ise fermentasyon esnasında laktik asit bakterilerinin ortamda bulunan laktozu enerji kaynağı olarak kullanmasıdır (Köse, & Ocak, 2014).

Yoğurt bileşiminde bulunan vitaminler, proteinler ve mineraller bazı etkenlerden dolayı değişiklik gösterebilmektedir. Bu etkiler arasında genetik faktörler, yem, lokasyon dönemi, yaş ve mevsim yer almaktadır. Bununla birlikte yoğurt üretiminde etkinlik gösteren yoğurt kültürlerinin gelişimleri ve fermantasyon işlemini gerçekleştirme kabiliyetleri de yoğurt bileşimini etkileyebilmektedir (Adolfsson, Meydani, & Russell, 2004).

Sütte bulunan vitaminler bakteri türüne göre ve fermantasyon şartlarına göre farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte sütün işlenmesi ile sütte bulunan suda çözünebilir vitaminlerin miktarları da etkilenebilmektedir. Ayrıca sütte bulunan B vitaminlerinin azalmasında bir diğer etken bakteri türlerinin büyümeleri esnasında B₁₂ vitaminlerine ihtiyaç duymasıdır.

Mikroorganizmaların gelişmelerini sürdürebilmeleri için azot ve enerjiye ihtiyaç duyarlar. Yoğurtta bulunan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterileri ise süte bulunan laktozu kullanarak ihtiyaç duydukları enerjiyi karşılayabilmektedirler. Ayrıca yoğurt kültürlerinin aktivitelerinin başlayabilmesi için ortamda belirli miktarda azot bulunması da gerekmektedir (Abu-Tarboush, 1996).

Yoğurt içerdiği kalsiyum, çinko, fosfor ve magnezyum ile mineral içeriği oldukça iyi bir besin kaynağı olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra bazı yoğurt kültürleri B vitamini ve folik asit üretme kabiliyetlerine sahiptirler (Buttriss, 1997). Bahsi geçen yoğurdun besinsel içeriği Tablo 1’de verilmiştir.

Sütte bulunan laktoz glikoz ve galaktozdan meydana gelen bir disakkarittir. Laktoz β -galaktosidaz (laktaz) enzimi yardımı ile glikoz ve galaktoza parçalanabilmektedir. Yoğurt fermantasyonunda kullanılan yoğurt kültürleri laktaz içerdikleri için laktozu monosakkaritlere parçalayabilmektedirler. Bu nedenle laktozun bağırsaklarda sindirimini kolaylaşmaktadır (Savaiano, AbouElAnouar, Smith, & Levitt, 1984). Daha sonra monosakkaritler vücut tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Laktozun laktaz enzimi ile parçalanmaması durumunda laktoz sindirilmeden kalın bağırsağa geçer ve kalın bağırsakta bulunan mikroorganizmalar tarafından kullanılırlar. Böylece laktoz intoleransı denilen kişilerde şişkinlik, ishal ve karın ağrısı gibi hastalıklar meydana gelmektedir (Mckinley, 2005).

Sütte bulunan proteinler yoğurt kültürleri yardımı ile serbest amino asit ve peptitlere parçalanabilmektedir (Meydani, & Ha, 2000). Genellikle insanların proteinleri sindiriminde sorun yaşamadıkları için proteinlerin parçalanmaması sindirim açısından önemli değildir (Buttriss, 1997).

Tablo 1. Yoğurdun Besinsel İçeriği (100 g) (Kızılaslan, & Solak, 2016).

Enerji	65.75 kcal
Protein	3.3 g
Yağ	3.8 g
Karbonhidrat	4.0 g
Lif	0 g
Doymuş yağ asidi	2.3 g
Tekli doymamış yağ asidi	1.15 g
Çoklu doymamış yağ asidi	0.15 g
Kolesterol	14 mg
D vitamini	0 µg
Demir	0.05 mg
Sodyum	50 mg
Potasyum	160 mg
Kalsiyum	130 mg
Fosfor	100 mg
Çinko	0.45 mg

Yoğurtta bulunan yağlar tat ve aromayı doğrudan etkilemese de tat ve aromanın artırılmasında etkili olabilmektedirler. Yoğurt üretim esnasında süte uygulanan ısı işlem ile keto asitler (aseton, butanon, hekzanon), hidroksi asitler (v-veleroaktone, δ-kaprolakton, δ-kaprilakton) ve diğer yağ bileşikleri (2-heptanon, 2-nonanon, 2-undecanon, pentan) oluşabilmektedir (Köse, & Ocak, 2014). Ayrıca sütün yağ içeriğine göre yağda çözünen vitaminlerin miktarı da değişebilmektedir (Buttriss, 1997).

Süt kalsiyum içeriği ile zengin bir gıda ürünü olmasının yanında fermente süt ürünleri ve yoğurt içerdiği vitaminler, mineraller ve LAB ile insan sağlığı üzerinde yararlı etki oluşturmaktadır (Plessas, Bosnea, Alexopoulos, & Bezirtzoglou, 2012).

Süt ve fermente süt ürünlerinde bulunan bileşenler insan sağlığı üzerinde de iyileştirici etki oluşturmaktadır. Örneğin; süt ve yoğurtta bulunan Ca^{+2} obeziteye karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Ca^{+2} vücutta bulunan yağ hücrelerinin metabolizmasını düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Ca^{+2} miktarının artması ile vücutta bulunan yağ hücrelerinin enerji depolanması, lipid sentezinin uyarılması ve lipolizi önleyerek vücutta yağ kütlelerinin artışı önlenmektedir (Zemel, Thompson, Milstead, Morris, & Campbell, 2004).

Yoğurt içerdiği laktik asit bakterileri ile sağlığı teşvik edici etkisinin olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiş ve bu durumun üzerine yoğurt üretiminde kullanılan *L. bulgaricus* ve *S.thermophilus* türleri gastrointestinal sistemde diğer probiyotik mikroorganizmalara göre daha zayıf olduğu ortaya konmuştur (Del Campo vd., 2005).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada tümörlü fareleri *S.thermophilus* ve *L. bulgaricus* içeren yoğurt ve süt ile beslenmiştir. Yoğurt ile beslenen farelerin süt ile beslenen farelere oranla hayatta kalma sürelerinin arttığı belirlenmiştir (Pala vd., 2011).

Kötü kolesterol (LDL) kolesterol seviyesinin düşürülmesi ile ilgili yapılan bir diğer çalışmadan ise yüksek lipit seviyesine sahip bireyler üzerinde bitkisel stanollü yoğurt ve stanol içermeyen yoğurtlar ile diyet yapılmıştır. Çalışmanın sonunda stanollü yoğurtlarda LDL kolesterol seviyesi oldukça düşmüştür ve stonolsüz yoğurtlarda da LDL kolesterol seviyesinin düştüğü belirlenmiştir (Furuncuoglu, Basar, Alici, & Sengul, 2014). Yapılan çalışmalarda kalsiyumun LDL kolesterolü üzerinde olumlu etkisinin yanı sıra kalp-damar hastalıkları ve obezite riskinin azalmasında da etkili olduğu belirlenmiştir (Astrup, 2014).

Yoğurtta bulunan bir diğer bileşik olan konjuge linoleik asit antikarsinojenik, ateroskleroz, antidiyabetik, antibakteriyel ve kolesterol azaltıcı etkiye sahip konjuge çift bağ içeren bir yağ asitidir. Bu yağ asidi çeşitli LAB tarafından linoleik asit kullanarak üretilebilmektedir (Lin, 2003; Ogawa vd., 2005). Fermente süt ürünlerinde konjuge linoleik asit üreten mikroorganizmalar; *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* türlerinin bazı suşlarıdır. Konjuge linoleik asit *cis*-9, *trans*-11 izomer yapıdadır. Yapılan bir çalışmada ticari yoğurt, geleneksel olarak üretilen yoğurt ve farklı peynir örneklerinde konjuge linoleik asit içeriği araştırılmıştır. Prandini, Sigolo, Tansini, Brogna, & Piva (2007) tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel olarak üretilen yoğurtlarda yüksek miktarda konjuge linoleik asit tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalara göre yağsız yoğurt içerisine ilave edilen %1 linoleik asit ile yoğurdun tat ve tekstüründe herhangi bir değişim meydana gelmemesiyle birlikte konjuge linoleik asit miktarında önemli bir artış gözlemlenmiştir (Lin, 2003).

Tarrah vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. thermophilus*'un 8 suşunun sağlık üzerine etkileri araştırılmış ve *S. thermophilus* suşlarının antikanser etkisinin olduğu belirlenmiştir

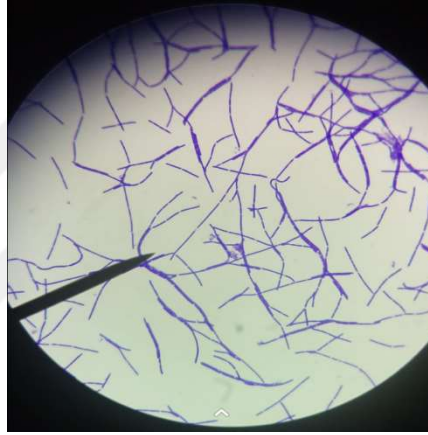
Ayrıca yoğurt üretiminde kullanılan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının bağırsak mikroflorasına olumsuz etki eden antibiyotiklerin yan etkilerini de azalttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte bu kültürler bebeklerde ve çocuklarda karşılaşılan enfeksiyonların engellenmesinde olumlu etki göstermektedir. Dolayısıyla bu kültürler patojen

mikroorganizmaların neden olduğu bağırsak enfeksiyonlarında iyileştirici etkiye sahiptir (Petti, Tarsitani, & D'arca, 2008).

Yoğurt Florası ve Yoğurt Üretiminde Kullanılan Başlatıcı Kültürler

L. bulgaricus.

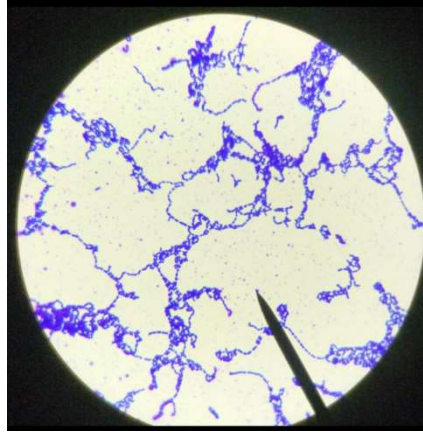
Laktobasillus türleri genel olarak Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik ve çubuk şeklinde ve uzun zincirli mikroorganizmalardır. *L. bulgaricus*' un gram boyama ile boyanmasının ışık mikroskobunda görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. Fakültatif anaerobik olan bu türler 42°C' de optimum büyüme göstermektedir (Felis, & Dellaglio, 2007). Bu türlerden *L. bulgaricus* yoğurt üretiminde önemli rol almaktadır. *L. bulgaricus* türleri fruktoz, glukoz ve laktozu fermente etme yeteneğine sahiptir.



Şekil 1. *L. bulgaricus* ışık mikroskobunda görüntüsü.

S. thermophilus.

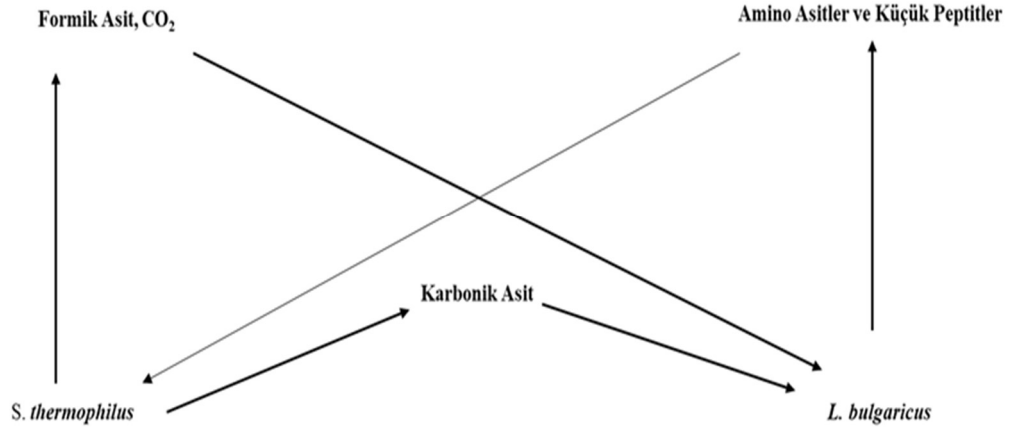
S. thermophilus Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, zincirli kok şeklinde ve spor oluşturmeyen bir mikroorganizmadır. *S. thermophilus*' un gram boyama ile boyanmasının ışık mikroskobunda görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir. Gelişimleri için anaerobik ortama, optimum 40-45°C sıcaklık ve besin içeri yüksek ortama ihtiyaç duymaktadırlar. Yoğurt ve peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan *S. thermophilus*, yoğurtlarda *L. bulgaricus* ile kullanılmaktadır. Bu tür ortamda bulunan laktoz ve sakkarozu kullanarak fermantasyonu gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Ayrıca az da olsa glikoz, galaktoz ve fruktozu kullanarak da büyümelerini gerçekleştirebilmektedir (Dede, 2010).



Şekil 2. *S. thermophilus* ışık mikroskopunda görüntüsü.

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* arasındaki simbiyotik ilişki.**

Yoğurtta bulunan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşları yoğurt yapımında süte 1:1 oranında ilave edilmektedir. Bu kültürler ürettikleri bileşenlerle birbirlerinin gelişimlerini teşvik etmektedir. Süte inoküle edilen suşlarda ilk önce *L. bulgaricus* ortama hâkim olmaktadır. *L. bulgaricus* sütte bulunan proteinleri *S. thermophilus*'un kullanabileceği aminoasitlere kadar parçalamaktadır. *S. thermophilus*'un gelişmesi esnasında meydana gelen formik asit, üre ve karbondioksit üretimi ile ortamda bulunan oksijen de azalmaktadır. Böylelikle *L. bulgaricus*'un gelişimi artmaktadır. Ayrıca *S. thermophilus* fermantasyon işleminin başında az miktarda gelişmektedir. Bu gelişme ile az da olsa asitlik artışı meydana gelmektedir. Asitliğin oluşması da *L. bulgaricus*'un gelişimini hızlandırmaktadır. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* arasındaki simbiyotik ilişkilerden biri de *L. bulgaricus*'un ortamda bulunan valin, histidin, metiyonin, glutamik asit ve lösin gibi amino asitlerin *S. thermophilus*'un kullanabilmesi için serbest hale geçmesini sağlar. *S. thermophilus* ise *L. bulgaricus*'un gelişimini teşvik eden pürin, primidin, CO₂, formik asit, oksaloasetik asit ve fumarik asit üretmektedir (Abu-Tarboush, 1996). Simbiyotik yaşamlarının sonunda her iki tür de sütte bulunan laktozu laktik aside kadar metabolize etmesiyle fermantasyon işlemi tamamlanmaktadır (Tavşanlı, 2015). Formik asit, sütün ısıtılması ile açığa çıkmaktadır ve sıcaklığın artmasıyla formik asit miktarı da artmaktadır. Formik asit miktarının artması ile *L. bulgaricus*'un gelişiminin arttığı gözlemlenmiştir (Radke-Mitchell, & Sandine, 1984). *L. bulgaricus* gelişiminde etkili olan bir başka bileşik CO₂ ise *S. thermophilus* tarafından üretilmektedir (Louaileche, Bracquart, Saulnier, Desmazeaud, & Linden, 1993). *S. thermophilus* ile *L. bulgaricus* arasındaki simbiyotik ilişki Şekil 3'de verilmektedir.



Şekil 3. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* arasındaki simbiyotik ilişki (Aswal, Shukla, & Priyadarshi, 2012).

Yoğurt Üretiminde Kullanılan Starter Kültürlerin Metabolizması

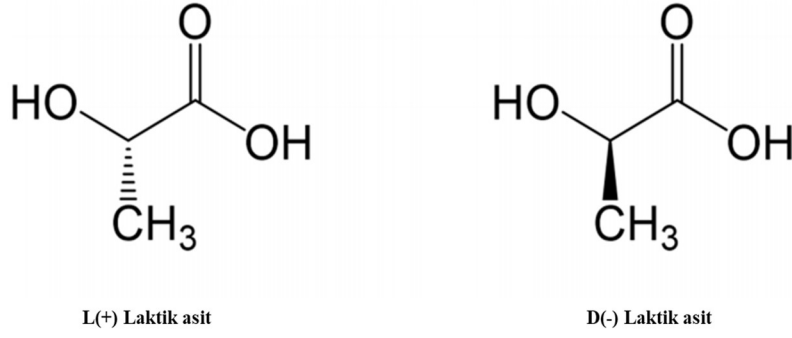
Yoğurdun fermantasyonu ile önemli biyokimyasal dönüşümler meydana gelmektedir. Bu dönüşümler; laktozdan laktik asit oluşması, kazeinlerin hidrolizi ile peptitlere ve serbest amino asitlere dönüşmesi ve süt yağının yağ asitlerine parçalanmasıdır (Settachaimongkon vd. , 2014). LAB proteinleri, lipitleri ve şekerleri metabolize etmeleri ile fermente ürünlerin üretiminde önemli rol almaktadır. Fermente ürünlerin üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılan LAB'lar gıdaların muhafazasında, tekstür, tat ve aromanın gelişmesinde kullanılmaktadır (Pescuma vd. , 2007).

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* β -D-galaktosidaz enzimi ile P- β -D-galaktosidaz enzimlerine sahip olmaları için laktozu D-glukoz ve β -D galaktoza hidrolize edebilmektedir (Premi, Sandine, & Elliker, 1972). Yoğurt kültürlerinde bulunan β -D-galaktosidaz enzimi ile laktoz öncelikle glukoz ve galaktoza parçalanmaktadır (Alm, 1982). Laktozun hidrolizi Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Yoğurt üretiminde laktoz fermantasyonu (Hossain, 2015).

Laktozun hidrolize uğraması sonucu oluşan laktik asit, Şekil 5'de verildiği gibi hidroksil grubunun ikinci karbon atomuna bağlanma şekillerine göre *L. bulgaricus* D(-) laktik asit ve *S. thermophilus* L(+) laktik asit oluşturmaktadır (Akın, 1997; Bottazzi, 1988).



Şekil 5. Enantiyomerik laktik asit formları (Casalini, Rossi, Castrovinci, & Perale, 2019).

Laktik asit üretimi ile sütün asitliği artmaktadır ve asitliğin artması ile sütte bulunan kalsiyum fosfat kazein misellerinden ayrılmaktadır. Kalsiyumun kazein misellerinden ayrılması ile kazeinin çökmesi gerçekleşmekte ve pH 4.6-4.7'ye ulaştığında kazein tamamen çökmektedir (Zourari, Accolas, & Desmazeaud, 1992). β -D-galaktosidaz enzimi ise laktoz fosfattan glikoz ve galaktoz-6-fosfat oluşması sağlamaktadır (Premi *vd.*, 1972). Meydana gelen glikoz Embden Meyerhof glikolitik reaksiyon zincirinde pürüvik asite daha sonra laktat dehidrarogenaz enzimi ile laktik asit oluşmaktadır (Tamime, & Deeth, 1980).

Yoğurt Üretiminde Kullanılan Başlatıcı Kültürlerde Aranılan Özellikler

Asit üretimi.

Yoğurt üretiminde kullanılan başlatıcı kültürlerde aranılan özelliklerden ilki asitliğin hızlı artmasıdır. Yoğurt bakterileri sütte bulunan laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaktadır. Yoğurt oluşumu esnasında pH 5.0 değerinin altına düştüğü zaman yoğurtta bulunan *L. bulgaricus* asetaldehit ve laktik asit oluşturmaya başlar. Laktik asit oluşması ile kazein misellerinin izoelektrik noktası bozulmaktadır ve yoğurt pıhtısı oluşmaktadır (Tamime, & Robinson, 2007). Oluşan asetaldehit ve laktik asit ile yoğurda özgü aroma oluşumu meydana gelmektedir. Asit üretiminin devam etmesi ile pH 4.6' da pıhtılaşma gerçekleşir ve yoğurt pH 4.2-4.3' te tüketime hazır hale gelmektedir (Weinbrenner, Barefoot, & Grinstead, 1997).

Yoğurt oluşumunda asitlik oldukça önemli olmakla beraber yoğurt üretimi esnasında meydana gelebilecek olumsuz koşullarda, yoğurdun tekstürel yapısında meydana gelen değişiklikler ve duyuşal farklılıklar için pH ölçümü yapılmaktadır (Brabandere, & De Baerdemaeker, 1999). Asit üretimi ile fermente ürünlerde özgü tat ve aroma gibi karakteristik özelliklerin oluşması da gerçekleşmektedir (Tamime, & Robinson, 2007).

Proteolitik aktivite.

Sütte bulunan azotlu bileşikler, mikroorganizmaların gelişimlerinde oldukça önemlidir. Yoğurt kültürlerinin büyümeleri için ihtiyaç duydukları azot miktarının az olması durumunda

kültürlerin gelişimini sınırlamaktadır. Yoğurt kültürlerinden *L. bulgaricus*' un *S. thermophilus* ' a kıyasla kazeini parçalama etkisi daha yüksektir (Abu-Tarboush, 1996).

Yoğurt bakterileri süte inoküle edildikten sonra proteaz enzimlerinin ortamda bulunan proteinlerin serbest aminoasitlere kadar parçalanması ile proteoliz olayı gerçekleşmektedir. Yoğurt kültürleri gelişebilmeleri için buldukları ortamda bazı serbest aminoasitlere ihtiyaç duymaktadır. Yoğurt üretiminde proteoliz; kültürlerin gelişim evresinde gerçekleşmektedir. Yoğurt kültürlerinden *S. thermophilus* sadece endosellüler enzim üretmektedir. *L. bulgaricus* ise hem endosellüler hem de ekzosellüler enzim üretmektedir (Pescuma vd. , 2007; Yüksekdağ, & Beyatlı, 2003). Yapılan çalışmalarda *S. thermophilus*'un sadece hücre içinde enzim ürettiği ve *L. bulgaricus* suşlarının ise hücre içinde ve hücre dışında enzim üretebildiği belirlenmiştir. Hücre dışında üretilen enzimler sayesinde hücre içine alınacak proteinler daha küçük parçalara ayrılarak hücre içine kolaylıkla girmesi sağlanmaktadır (Kebede, 2005). Proteolitik aktivite bakteri türlerine ve dış etkilere göre farklılık gösterebilmektedir (De Giori, De Valdez, de Ruiz Holgado, & Oliver, 1985).

Yoğurt fermantasyonunda gerçekleşen proteolitik aktivite ile yoğurdun yapısının iyileştiği, asit üretimini teşvik ettiği ve yoğurdun sindiriminde önemli rol aldığı belirlenmiştir. Yoğurt bakterileri arasındaki simbiyotik ilişkilerden biride proteolitik aktivitedir. *S. thermophilus* bulunduğu ortamda daha fazla proteine ihtiyaç duymaktadır. Fakat sütte bulunan aminoasitlerden glutamik asit, histidin, sistin, metionin, valin ve lösin yeterli miktarda değildir. Ancak *L. bulgaricus*' un proteolitik aktivitesi daha fazla olduğu için *S. thermophilus*' un gelişimi için ihtiyaç duyduğu aminoasitleri proteinaz enzimi ile oluşturmaktadır (Pescuma vd., 2007; Yüksekdağ, & Beyatlı, 2003).

Proteolitik aktivite ile yoğurdun tekstür ve aromasının iyileştirilmesinin yanı sıra yoğurdun daha iyi sindirilmesini sağlamaktadır. Proteolitik aktivitenin fazla gerçekleşmesi durumunda yoğurdun tadında ve tekstüründe bozulmalar meydana gelmektedir (Kılıç, 1991).

EPS yetenekleri.

LAB büyümeleri esnasında organik asit, asetik asit, etanol, laktik asit, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit gibi çeşitli metabolitler üretmektedir. Üretilen bu metabolitler fermente ürünün raf ömrünü uzatmasıyla birlikte ürüne özgü tat ve aromanın oluşmasına da yardımcı olmaktadır (Leroy, & De Vuyst, 2004).

EPS' ler fermente ürünlere jelleşme özelliği kazandıran; suda çözünebilen, yüksek molekül ağırlığına sahip ve uzun zincirli polisakkaritlerdir. EPS'ler fermente üründe

emülsiyon, stabilizasyon ve sinerezin inhibisyonu gibi özelliklerini iyileştirici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizmaların büyümeleri esnasında hücre dışına salınan ekzopolisakkaritler hücreyi fagozitoza, faj saldırılarına, hücrenin kurumasına, antibiyotiklere ve toksik bileşenlere karşı korumaktadır. Endüstride kullanılan mikrobiyal EPS'ler arasında dekstran, ksantan, gellan, pullulan, maya glukanları ve aljinatlar yer almaktadır. LAB tarafından üretilen EPS'ler genellikle fermente gıdalarda et, sebze, peynir ve yoğurtlarda bulunabilmektedir (De Vuyst, & Degeest, 1999).

LAB tarafından üretilen EPS'ler tek tip şeker monomerlerinden oluşan homopolisakkaritler ve birden fazla farklı tip şeker monomerlerinden oluşan heteropolisakkaritler şeklinde üretilmektedirler. Yoğurt bakterileri olan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* ise genelde heteropolisakkarit şeklinde EPS üretmektedir (Broadbent, McMahon, Oberg, & Welker, 2001). Heteropolisakkarit yapıda olan *S. thermophilus* suşlarının EPS monosakkaritlerinin galaktoz, glikoz ve ramnozdan oluştuğu bildirilmiştir ve yapılan çalışmalarda bu monosakkarit dizilimlerinin tekrarlanan birimleride farklılık gözlemlenmiştir (Broadbent, McMahon, Welker, Oberg, & Moineau, 2003). *L. bulgaricus* suşlarının ürettiği EPS'in monosakkaritleri ise galaktoz, glikoz, ramnoz, mannoz ve pentoz içerdiği belirtilmiştir (Grobben, Sikkema, Smith, & De Bont, 1995).

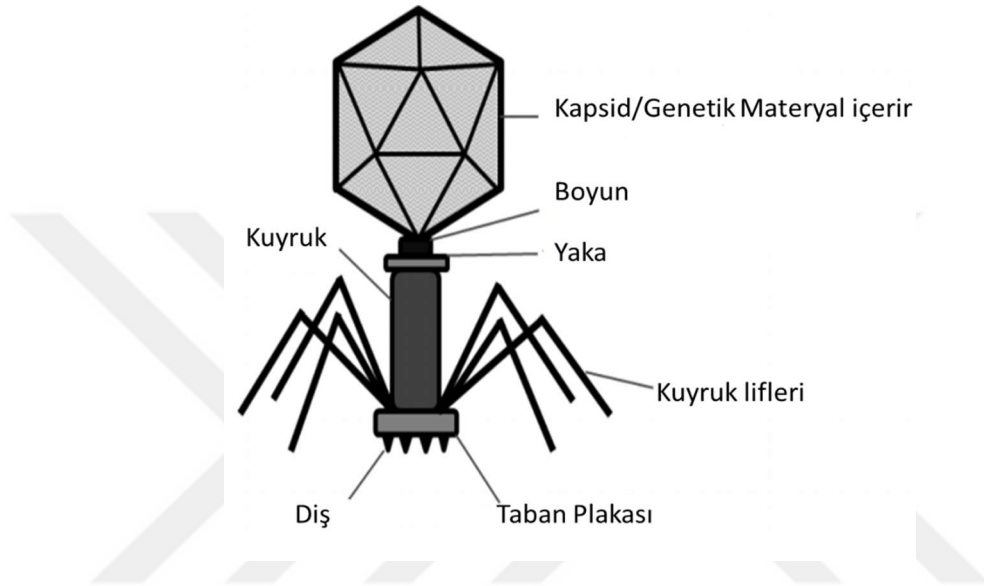
LAB ürettiği metabolitlerden EPS'lerin teknofonksiyonel özelliklerinin yanısıra sağlık üzerinde de iyileştirici etkilerinin olduğu belirlenmiştir. EPS'lerin antitümör etkinliğinin olduğu ve sitokinlerin indüklenmesini sağladığı belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *L. bulgaricus* OLL1073R-1 suşunun ürettiği EPS'in antitümör ve bağışıklık için önemli bir sitokin olan IFN- γ üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmaya göre *L. bulgaricus* OLL1073R-1 suşunun ürettiği EPS IFN- γ sitokinini indüklediği ve antitümör etki gösterdiği belirlenmiştir (Makino vd. , 2006). Başka bir çalışmada ise *S. thermophilus* CRL 1190 suşu tarafından üretilen EPS' in kronik gastrit üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu belirlenmiştir (Patel, & Prajapat, 2013).

Son zamanlarda yoğurt bakterileri tarafından üretilen EPS yoğurdun tekstüründe olumlu katkı sağladığında giderek önem kazanmaktadır (Patel, & Prajapat, 2013). EPS aktivitesine sahip yoğurt kültürleri ile üretilen yoğurtlarda EPS'in serum proteinlerinin kuvvetli tutulmasını sağlayarak su tutma kapasitesini arttırmaktadır (Duboc, & Mollet, 2001).

Faj dirençliliği.

Başlatıcı yoğurt bakterilerinde faj dirençliliği 1930 yılından beri süt endüstrisinde oldukça önemli bir sorun oluşturmaktadır. Fajlara karşı duyarlı olan yoğurt bakterileri herhangi

bir faj ile kontamine olması sonucu yoğurt bakterilerinin lize neden olmaktadır. Lize olan kültürler fermantasyonun gerçekleşmesini yavaşlatmakta veya zamanla kültürler tamamen lize olarak fermantasyon işleminin aksamasına neden olmaktadır (A Quiberoni *vd.* , 2003). Özellikle yoğurt üretiminde oldukça önemli risk oluşturmaktadır. Bakteriyofajların yoğurt üretiminde fermantasyonun yavaşlatarak asetaldehit üretiminin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bu da yoğurt üretiminde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Mc Grath *vd.*, 2002).



Şekil 6. Kuyruklu bakteriyofaj (Doss, Culbertson, Hahn, Camacho, & Barekzi, 2017).

Bakteriyofajlar, tek veya çift sarmal yapıya sahip DNA ve RNA bulunduran virüslerdir. Bakteriyofajlar morfolojik ve nükleik asit dizilimlerine göre sınıflandırılmaktadır (Ackermann, 2011). Bakteriyofajların morfolojik ve nükleik asit dizilimlerine göre sınıflandırılması Şekil 8.' de verilmektedir. Şekil 7'de ise kuyruklu bakteriyofajın yapısı veilmiştir.

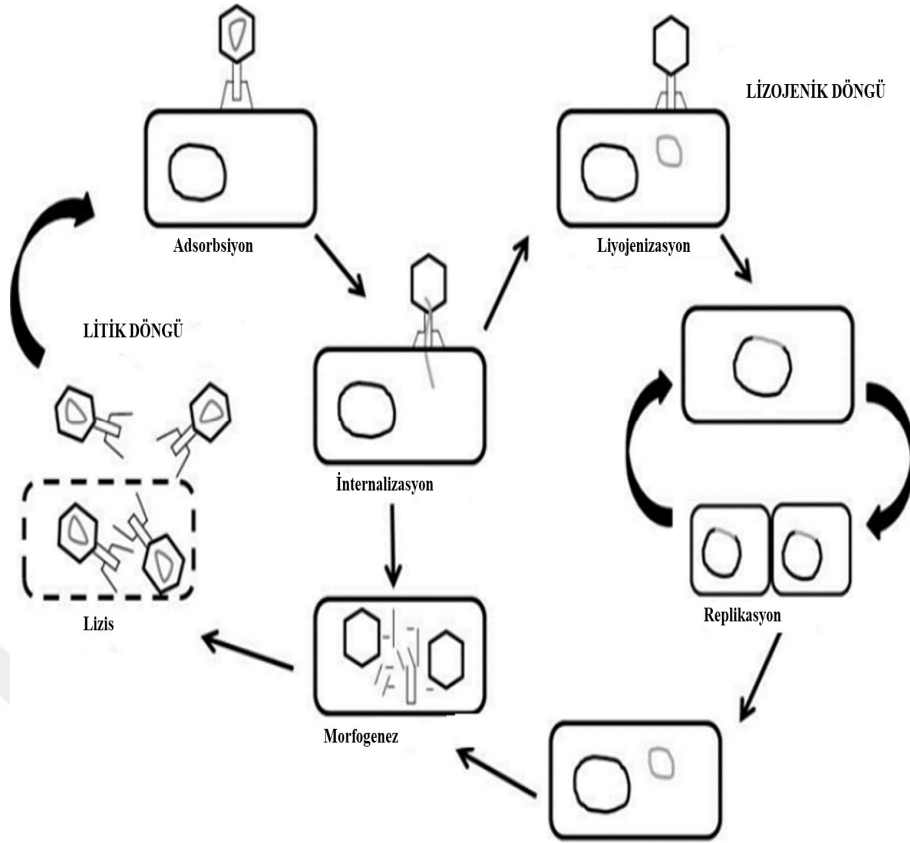
Tip	Nükleik Asit	Özellik
A	DNA,2	Polihedral baş, uzun etrafında kontraktil kuyruk ve kuyruk iğnesi ile kuyruk fibrilleri
B	DNA,2	Polihedral baş, kontraktik kuyruk olmayan uzun kuyruk
C	DNA,2	Polihedral baş, kontraktik kılıfı olmayan kısa kuyruk
D	DNA,1	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer
E	RNA,1	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomer
F	RNA,1	Fleksibl filamentöz

1: Tek iplikli
2: Çift sarmal yapıya sahip iplikli

Şekil 7. Bradley'in faj sınıflandırması (Soykut, & Tunail, 2009b).

Bakteriyofajlar kendilerine özgü konakçı hücreye bağlandıktan sonra etkileşime girmektedirler. Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır. Gram pozitif bakteri fajları peptidoglikan tabakasındaki molekülleri tanıyarak fajlarda bulunan kuyruk uçlarındaki proteinler ile hücre yüzeyine yapışmaktadır. Bu bağlanma ile faj viral genomun kapsitten salınması gerçekleşmektedir. Bakteriyofaj genomunu konakçıya aktardıktan sonra hücre dışında kalır. Bakteriyofajlar aktarılan genomları konakçı hücreye bağlandıktan sonra transkripsiyon gerçekleşmektedir. Böylece fajlar kendilerine özgü replikasyon mekanizmalarını kolaylıkla kodlamaktadırlar (Chibeu, 2013).

Bakteriyofajların litik ve lizojenik yaşam döngüleri bulunmaktadır Litik faj döngüsü; bakteri fajı konakçı hücrenin yüzeyine yüzey bileşenleri içeren reseptör bölgelerine bağlanmaktadır. Böylece bakteriyofaj ilgili genom konakçı hücreye aktarılmaktadır. Faj genomu konakçı hücrede RNA polimeraz enzimi yardımıyla transkripsiyon gerçekleşmektedir. Bakteriyofaj konakçı hücrenin metabolik faaliyetlerini yönlendirerek kendi bileşenlerinin üretilmesini sağlamaktadır. Fajlar, konak hücrede daha iyi çalışarak bakterinin ölümüne neden olmaktadır. Lizojenik faj döngüsü; faj DNA'sı bakteri hücrelerine bağlanarak bakteride DNA replikasyonu gerçekleşirken faj DNA'sı da çoğalmaktadır. Bakteri hücrelerinin çoğalması ile faj DNA'sı da çoğalmaktadır (Hanlon, 2007).



Şekil 8. Fajların litik ve lizojenik döngüsü (Chibeu, 2013).

Yoğurt bakterileri fajlarının lizojenik fajlar olduğu bildirilmiştir (Soykut, & Tunail, 2009a). Şekil 9’da bakteriyofajların litik ve lizojenik döngüsü verilmektedir.

Antimikrobiyal özellik.

Yoğurt üretiminde kullanılan başlatıcı kültürlerin süte inoküle edilmesi ile yoğurdun pH’sı düşmektedir. Asitliğin artması ile ortamda bulunan patojen mikroorganizmaların gelişimi engellenmektedir. Asitliğinin artmasının dışında fermantasyon sırasında üretilen bakteriyosin, ve bakterisit proteinleri de patojen mikroorganizmaların gelişimini önlemektedir (Akpınar, Yerlikaya, & Kiliccedil, 2011). Bu metabolitlerden bakteriyosinler; LAB tarafından üretilen protein yapıdaki bileşikleridir. Yapılan çalışmalarda bakteriyosinlerin gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenmiştir (Rattanachaikunsopon, & Phumkhachorn, 2010). Yoğurt üretiminde kullanılan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* patojen mikroorganizmaları inhibe ettiği için çeşitli hastalıkların tedavisinde iyileştirici etki göstermektedir (Akpınar, Yerlikaya, & Kiliccedil, 2011).

Yoğurt kültürlerinin çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve *L. bulgaricus* suşlarının *Escherichia coli*’ye ve *S. thermophilus* suşlarının *Klebsiella pneumoniae*’ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Akpınar, Yerlikaya, &

Kilicedil, 2011). Başka bir çalışmada *L. bulgaricus* 'un *Staphylococcus aureus* ' a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve *L. bulgaricus*'un ürettiği hidrojen peroksit ile antimikrobiyal aktivite sağladığı belirlenmiştir (Dahiya, & Speck, 1968). Yoğurt kültürleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve çalışmada *Lb. bulgaricus*'un ürettiği bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ve *Vibrio cholerae* suşlarına karşı etkileri araştırılmıştır. *L. bulgaricus* 'un ürettiği bakteriyosinin bu patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Tufail vd., 2011).

S. thermophilus suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldığı bir çalışmada ise 41 *S. thermophilus* suştan 13'ü *S. aureus* ve *L. monocytogenes* patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu suşlardan *S. thermophilus* ST134 suşunun ürettiği termofilin A bakteriyosinin ısıya dayanıklı ve antimikrobiyal etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Ward, & Somkuti, 1995).

Yoğurt Kültürlerinin Tanımlanması

Fenotipik tanımlama.

LAB' nin fenotipik olarak tanımlanması için morfolojik olarak incelenmesi, metabolik yapısı ve biyokimyasal yöntemler kullanılmaktadır.(Ammor vd, 2005). *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının tür bazında tanımlanmasında kullanılan fenotipik yöntemler; hücre morfolojisi, hücre duvarının özelliği, katalaz testi, glikozdan gaz oluşturma yetenekleri, sitrat kullanımı, karbonhidrat fermantasyonu testleri ve farklı sıcaklık, tuz, pH koşullarına karşı dayanıklılığına göre tanımlanabilmektedir (Erkus, Okuklu, Yenidunya, & Harsa, 2014).

Genotipik tanımlama.

Bakterileri cins ve suş bazında tanımlanması için kullanılan farklı moleküler teknikler bulunmaktadır. LAB' lerinden olan yoğurt bakterilerini genotipik olarak tanımlamada 16S rRNA, türe özgü primer ile PCR ve RAPD-PCR teknikleri kullanılabilir (Dede, 2010). PCR (plimeraz zincir reaksiyonu) tekniği ile istenilen gen bölgesi çoğaltılmaktadır. PCR ile çoğaltılan DNA'lar jel elektroforez yardımı ile jelde elektrik yükü ile yürütüldükten sonra görüntülenmesi prensibine dayalıdır (Çakır, & Çakmakçı, 2005). RAPD-PCR tekniği ile türler arasında ayırım yapılmaktadır ve böylelikle birbiri ile farklı türlerin ayırt edilmesi sağlanmaktadır (Aydın Osmanoğlu, & Başak, 2010).

16S rRNA gen dizilimi.

Bakterilerde rRNA'yı kodlamada 16S gen bölgesi kullanılmaktadır. 16S rRNA bölgesi bakteriye özgü diziler bulunduran gen bölgeleri olarak ifade edilmektedir. 16S rRNA ile gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak o bölgenin çoğaltılması ve tanımlanmasıdır. Bakteriler tanımlamak için sekanslama işlemi uygulanır. Sekanslama işlemi ile bakteriler tür ve suş düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmektedir (Tavşanlı, 2015).

Alt tür tanımlanmasında MLST tekniği.

MLST tekniği, multilocus enzim elektroforez tekniğinde bakterilerin karşılaştırılması zor olduğu için bu teknik geliştirilmiştir (Dede, 2010). MLST ile bakteri DNA'sında altı veya yedi temel fonksiyonları gerçekleştirmek için gerekli genler sıralamada kullanılmaktadır (Cai, Rodriguez, Zhang, Broadbent, & Steele, 2007).

Yapılan çalışmada geleneksel olarak üretilen yoğurtlarda izole edilen 25 *L. delbrueckii* suşları MLST tekniğinde b-gal, pheS ve rpoA primerleri kullanılarak alt tür tanımlanması yapılmıştır. Çalışmaya göre MLST tekniğinde analiz edilecek olan genlerin sayısının artması ile ayırım gücünün de arttığı bildirilmiştir (Cebeci, & Gürakan, 2011). *L. delbrueckii* suşlarının alt tür tanımlanmasında yapılan bir diğer çalışmada fusA, gyrB, hsp60 ile pyrG, recA ve recG primerleri kullanılmıştır. MLST tekniği ile 41 *L. delbrueckii* suşu alt tür seviyesinde tanımlanması yapılmıştır (Tanigawa, & Watanabe, 2011).

Tezin Amacı

Yoğurt Türkiye'de eski dönemlerden günümüze kadar geleneksel olarak üretilen besin değeri yüksek ve çeşitli hastalıklar üzerinde de iyileştirici etkisi bulunan fermente süt ürünüdür. Geleneksel olarak üretilen yoğurt ticari olarak üretimi de yapılmakta ve ticari üretimi gün geçtikçe artmaktadır. Ticari olarak üretilen yoğurtlarda kullanılan starter kültürler geleneksel olarak üretilen yoğurtlara da kontamine olmaktadır. Türkiye'de çok fazla tüketilen yoğurt, ticari kültürle kontamine olması ile zamanla geleneksel kültürlerin kaybedilmesine neden olmaktadır. Ticari kültürler ile fermente edilen yoğurtlar ise geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan daha farklı tada sahiptir. Bu tez kapsamında farklı illerimizde geleneksel olarak üretilen yoğurt örnekleri toplanmıştır. Toplanan yoğurt örneklerinden *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* türleri izole edilmiştir ve izole edilen türler tanımlandıktan sonra başlatıcı kültürlerde aranan özellikler araştırılmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem

Materyal

Yoğurt örnekleri.

Türkiye'nin on farklı ilinden (Bayburt, Bursa, Bingöl, Malatya, Kayseri, Ordu, Erzurum, Erzincan, Trabzon ve Elazığ) inek, manda, keçi ve koyunlardan geleneksel yöntemlerle üretilen yoğurt ve süt steril numune kapları yardımı ile temin edilmiştir. Temin edilen örnekler soğuk zincirde Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarına getirilmiş ve analiz süresine kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Besiyerleri ve kimyasallar.

Tez çalışmasında kullanılan besiyerler: yoğurt kültürlerinin geliştirilmesi ve saflaştırılmasında *L. bulgaricus*' in geliştirilmesi amacıyla de %1 fruktozlu Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve Tablo 2'de verilen modifiye MRS agar bileşimi kullanılmıştır. *S.thermophilus*' in geliştirilmesi amacıyla %1 laktozlu M17 broth ve agar kullanılmıştır. Yoğurt örneklerinde dilüsyon hazırlamak için Ringer tablet ve %0.005 L-sistein kullanılmıştır.

Tablo 2. Modifiye MRS Agar İçin Kullanılan Besiyeri Bileşimi

Modifiye MRS Agar (g/L)	
Kazeinden pepton	18
Maya ekstraktı	4
D(+) Glukoz	20
Di-Potasyum Hidrojen Fosfat	2
Tween 80	3
Amonyum Sülfat	2
Sodyum Asetat	5
Magnezyum Sülfat	0.2
Fruktoz	10
L-Sistein	0.5
Agar-Agar	15
Manganese (II) Sülfat	0.04

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* türlerinin pH ve %asitlik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan besiyeri bileşimi Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. *Skim Milk Besiyeri Bileşimi*

Skim Milk Besiyeri (g/L)	
Kazeinden pepton	5
Glukoz	1
Yağsız süt tozu	28
Maya ekstrakt	2.5

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* türlerinin proteolitik aktivitesinin belirlenmesinde kültürlerin gelişimleri için pastörize yağsız süt kullanılmıştır.

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* türlerinden EPS izolasyonu amacı kullanılan besiyeri bileşimi Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. *Laktozlu Modifiye BHI Besiyeri Bileşimi*

Laktozlu Modifiye BHI (g/L)	
BHI (Brain Heart Infusion) broth	37
Kazeinden pepton	5
Etten pepton	5
Sodyum asetat	5
Tween 80	1
Magnezyum sülfat heptahidrat	0.2
Laktoz	20

Suşların bakteriyofajlara karşı dirençliliğini belirlemek için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT faj koleksiyonundan yararlanılmıştır.

L. bulgaricus suşlarının fajlara karşı dirençliliğini belirlemek için kültürler MRS broth, 1M CaCl₂ ilave edilmiş MRS agar ve 1M CaCl₂ ilave edilmiş MRS yumuşak agar kullanılmıştır. *S. thermophilus* suşlarının fajlara karşı dirençliliğini belirlemek için suşlar Tablo 5’de verilen besiyeri bileşimi kullanılarak aktifleştirilmiştir.

Tablo 5. *Modifiye M17 Broth Bileşimi*

Modifiye M17 Broth Bileşimi(g/L)	
Poli-peptone	5
Fiton pepton	5
Maya Ekstraktı	2.5
Et Ekstraktı	5
Laktoz	8
Askorbik asit	0.5
B-disodyum gliserol fosfat	9.5
1 M MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mL
1 M CaCl ₂	1.2 mL

Bakterilerin fajlara karşı dirençliliğini belirlenmesi amacıyla fajların geliştirilmesinde Tablo 6’da verilen Elliker broth bileşimi kullanılmıştır.

Tablo 6. *Elliker Broth Bileşimi*

Elliker Broth(g/L)	
Tripton	20
Maya Ekstraktı	5
Jelatin	2.5
Dekstroz	5
Laktoz	5
Sükroz	5
Sodyum Asetat	4
Askorbik asit	0.5

S. thermophilus suşlarının fajlara karşı dirençliliğini belirlemek için kullanılan modifiye M17 yumuşak agar bileşimi Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. *Modifiye M17 Yumuşak Agar Bileşimi*

Modifiye M17 Yumuşak Agar(g/L)	
Fiton pepton	2.4
Poli-pepton	2.4
Maya Ekstrakt	2
Kazein hidrolizat	2.4
Et Ekstrakt	3.3
Askorbik asit	0.4
Sodyum- β -gliserofosfat	12.7
1M MgSO ₄ .7H ₂ O	1.3
Agar-Agar	6
Dehydrated Elliker Broth	16

S. thermophilus suşlarının fajlara karşı dirençliliğini belirlemek için kullanılan modifiye M17 agar bileşimi Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. *Modifiye M17 Agar Bileşimi*

Modifiye M17 Agar(g/L)	
M17 Broth	42.5
Agar-Agar	15
Laktoz	3

Moleküler çalışmada kullanılan primerler ise Tablo 9’da verilmiştir.

Çalışmada kullanılan Primerler.

Tablo 9. Tez Çalışmasında Kullanılan Primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Hedef gen	Kullanım amacı	Hedef gen boyutu (bp)	Referans
GTG5	GTGGTGGTGGTGGTG	-	Suş düzeyinde ayırım	-	(Versalovic, Schneider, De Bruijn, & Lupski, 1994)
AMP_F	GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG	16S	Tanımlama	1.500	(Baker, Smith, & Cowan, 2003)
AMP_R	AAGGAGGTGATCCARCCGCA				
P1	CACTATGCTCAGAATACA	968	<i>S.thermophilus</i> türünü belirleme	3.000	(Lick, Keller, Bockelmann, & Heller, 1996)
P2	CGAACAGCATTGATGTTA				
delF188:	CAACATGAGTCGCATGATTCAAG	16S	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bugaricus</i> türünü belirleme	854	(Liew, Lu, & Zhang, 2015)
delR1042	GGAACCACCTCTCTAGCTGTAG				
pyrG primerF	CATACCGAGGCAGACAC	624	MLST profilleme	736	(Yu vd. , 2015)
pyrG primerR	AAAGAAGGTGGCATCGC				
recA primerF	AAAGAAGGTGGCATCGC	617	MLST profilleme	768	(Yu vd. , 2015)
recA primerR	ATCGTCCTCATCTAGCTCAAC				
rpoB primerF	CATTACACGCACTACGG	661	MLST profilleme	786	(Yu vd. , 2015)
rpoB primerR	GATAACAGCATCCTCGA				
B_recA primerF	ATGCGGATGGGCGAGAA	551	MLST profilleme	694	(Song vd. , 2016)
B_recA primerR	CTACCTTAAATGGCGGAGC				
B_rpoB primerF	GGCGGAAAGAGTTATCGT	603	MLST profilleme	772	(Song vd. , 2016)
B_rpoB primerR	GATGTCGGCTGGAGTGAT				
B_pyrG primerF	AAGCCGACCCAGCAATC	563	MLST profilleme	742	(Song vd. , 2016)
B_pyrG primerR	AGCCGACGCAAGGTG				

Yöntem

Yoğurt örneklerinden bakteri izolasyonunda kültür ortamının oluşturulması ve büyüme koşulları.

Yoğurt ve süt örneklerinden *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türlerini izole etmek amacı ile örneklerden 10 gram steril stomacher poşetlerine tartılıp 90 ml steril Ringer çözeltisi (%0,05 gram L-sistein içeren) ilave edilerek homojenize işlemi uygulanmasını takiben örneklerden seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha önce dilüsyon hazırlamak amacıyla kullanılan serum fizyolojik çözeltisi yerine daha iyi sonuç veren Ringer çözeltisi kullanılmıştır.

S. thermophilus suşlarının izolasyonu için 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltme faktörlerindeki %1 laktoz ile zenginleştirilmiş M17 agara yayma yöntemiyle ekim yapıp petri kutuları 45°C de 24 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip %1 laktoz ile zenginleştirilmiş M17 broth besiyerine steril kürdan yardımı ile alınıp 45°C de 24 saat inkübe edilmiştir. *S. thermophilus* suşlarının saflaştırılması amacı ile %1 oranında laktoz ile zenginleştirilmiş M17 agara çizim yapılmıştır. *S. thermophilus* türlerinin saflaştırılması için modifiye M17 agar kullanılmıştır. İzolatlarından saflaştırılması amacıyla tek bir koloni düşene kadar (genelde 5 çizim) ilgili besiyerine çizim işlemi gerçekleştirilmiş ve sonrasında saflaştırılan izolatlar en az 5 defa ilgili besiyerine ekilmiş ve sonrasında bu izolatlar ticari olmayan-saf izolatlar olarak değerlendirilmiş ve sonraki işlemlerde kullanılmıştır (İspirli, 2016).

L. bulgaricus suşlarının izolasyonu için 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} seyreltme faktörlerinden Tablo 2'de bileşimi verilen modifiye MRS agara dökme yöntemi ile ekim yapıp petri kutuları 45°C de 48-72 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda katı besiyeri ortamında gelişen morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilip %1 fruktoz ile zenginleştirilmiş MRS broth besiyerine steril kürdan yardımı ile alınıp 45°C de 48-72 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. *L. bulgaricus* suşlarının saflaştırılması amacı ile Tablo 2'de verilen modifiye MRS agar ve %1 fruktozlu MRS broth kullanılmıştır. İzolatlarından saflaştırılması amacıyla tek bir koloni düşene kadar (genelde 5 çizim) ilgili besiyerine çizim işlemi gerçekleştirilmiş ve sonrasında saflaştırılan izolatlar en az 5 defa ilgili besiyerine ekilmiş ve sonrasında bu izolatlar ticari olmayan-saf izolatlar olarak değerlendirilmiş ve sonraki işlemlerde kullanılmıştır.

Kültür stoklarının oluşturulması ve izolatların depolanması.

İzole edilen bakterilerin stok solüsyonları sonraki analizlerde kullanılmak üzere %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanıp -80°C de depolanmıştır. Depolama işleminde en az 3 tekrar olacak şekilde stoklama işlemi gerçekleştirilmiştir. İzole edilip saflaştırılan kültürlerin stok

solüsyonları sonraki analizlerde kullanılmak üzere %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanıp - 80°C de depolanmıştır.

Yoğurt kültürlerinin fenotipik tanımlanması.

Koloni morfolojisi.

Petri kutusunda gelişen koloniler fenotipik olarak ayırt edilmiş ve birden fazla koloni olması durumunda dominant koloniden seçim yapıp süreç devam ettirilmiştir. Ekimi yapılan yoğurt bakterilerinin izolasyonu aşamasında her petriden en az 3 farklı koloni seçilmiştir. Seçilen koloniler saflaştırılmıştır.

Gram boyama

Yoğurt kültürlerinde gram boyama için kültürler 18-24 saat kültür ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen kültürlerle santrifüj işlemi uygulanarak sıvı besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Pellet temiz lam üzerine öze yardımıyla yayılmıştır. Lama yayılan pellet kuruduktan sonra 3 kez alevden geçirilmiştir. Alevden geçirilerek lama fiksasyonu sağlanan preparat kristal viyole ile 1 dakika boyanmış, kristal viyole lam üzerinden akıtılmış ve lügol çözeltisi damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Daha sonra lügol çözeltisi akıtılıp önce etil alkol ile sonra su ile yıkanmıştır. Preparat sulu karbol füksin ile 20-30 saniye boyanmıştır ve süre sonunda boya akıtılarak su ile uzaklaştırılmıştır. Kendiliğinden kurumaya bırakılan preparata immersiyeon yağı damlatılarak ışık mikroskopunun $\times 100$ 'lük objektifinde incelenmiştir (Sert, 2002).

Yoğurt kültürlerinde moleküler çalışmalar.

Yoğurt kültürlerinden genomik DNA izolasyonu.

Modifiye M17 agardan izole edilen ve *S. thermophilus* olduğu düşünülen izolatlardan DNA izolasyonu fenol:kloroform:isoamil alkol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye MRS agardan izole edilen *L. bulgaricus* olduğu düşünülen izolatlardan ise İnvitrogen Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Fenol:kloroform:izoamil alkol kullanılarak dna izolasyonu için *S.thermophilus* olduğu düşünülen izolatlar sıvı kültür ortamında bir gece geliştirilmiş kültürden ependorf tüpü içerisine 1 ml alınarak 10 dakika 7000 x g de santrifüj işlemi ile bakteri hücreleri bir araya toplanmıştır. Tüpteki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bir araya toplanan hücrelerin üzerine 450 μ l TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edilip hafif bir karıştırma ile hücrelerin tampon içerisinde

süspansiyon olması sağlanmıştır. Süspansiyon edilen hücrelere 50 µl %10 luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µl Proteinaz K ilave edilip iyice vortekslendikten sonra 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0.5 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C’de 10 dakika 7000 x g de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı ile birkez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M’lık sodyum asetatın 50 µl içeriğe ilave edilip hafifçe karıştırılmıştır. İçeriğe 1 ml izopropanol ilave edilerek çöken DNA’nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 3000 x g de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pellet üzerine 0,5 ml %70 lik etanol ilave edilip hafif karıştırıldıktan sonra içerik 3000 x g de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için içerik 37°C’de 5-10 dakika bekletilmiş ardından elde edilen DNA 100 µl distile su ilave edilerek süspansiyon edilmiştir (Dahiya, & Speck, 1968).

Yoğurt kültürlerine özgü primerler kullanılarak kültürlerin PCR ile kontrolü.

Modifiye M17 agar ortamından izole edilen ve *S. thermophilus* olduğu düşünülen izolatlardan DNA izole edilip, *S. thermophilus* türüne özgü primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından elde edilen izolatların *S. thermophilus* türüne ait olup olmadığı belirlenmiştir. PCR reaksiyonu için Tablo 9 ’da belirtilen P1 ve P2 primerleri kullanılmıştır. Bu amaç için hazırlanan PCR karışımı Tablo 10’da, PCR şartları ise Tablo 11’de verildiği gibi uygulanmıştır (Lick vd, 1996).

Tablo 10. *S. thermophilus* Suşlarının Belirlenmesi için Hazırlanan PCR Karışımı

H ₂ O	50 µl için
DNA	1 µl
5X Phusion Buffer	10 µl
dNTP miks	0,4 µl
P1	1 µl
P2	1 µl
Taq polimeraz	0,25 µl

Tablo 11. *S. thermophilus* Suşlarının Belirlenmesi İçin Oluşturulan PCR Şartları

Denatürasyon	95°C 2 dk 1 döngü
Denatürasyon	95°C 30 s
Bağlanma	55°C 30 s 25 döngü
Uzama	72°C 1 dk
Son uzama	72°C 5 dk

Modifiye MRS agar ortamından izole edilen ve *L. bulgaricus* olduğu düşünülen izolatlardan genomik DNA ekstraksiyon kiti ile DNA izole edilip, *L. bulgaricus* türüne özgü primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların *L. bulgaricus* türüne ait olup olmadığı belirlenmiştir. PCR reaksiyonu için Tablo 9’da belirtilen delF188 ve delR1042 primerleri kullanılmıştır. Bu amaç için hazırlanan PCR karışımı Tablo 12’de, PCR şartları ise Tablo 13’de verildiği gibi uygulanmıştır (Lu, Kong, Yang, & Kong, 2015).

Tablo 12. *L. bulgaricus* Suşlarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan PCR Karışımı

H ₂ O	50 µl için
DNA	1 µl
5X Phusion Buffer	10 µl
dNTP miks	0,4 µl
P1	1 µl
P2	1 µl
Taq polimeraz	0,25 µl

Tablo 13. *L. bulgaricus* Suşlarının Belirlenmesi için Oluşturulan PCR Şartları

Denatürasyon	95°C 2 dk 1 döngü
Denatürasyon	95°C 30 s
Bağlanma	50°C 30 s 25 döngü
Uzama	72°C 1 dk
Son uzama	72°C 5 dk

Yoğurt kültürlerinin RAPD-PCR ile genotipik ayrımı.

Kurulan PCR reaksiyonları sonucu *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* pozitif olarak bulunan izolatların farklı *S. thermophilus* suşlarına ve farklı *L. bulgaricus* suşlarına ait olup olmadığını belirlemek için GTG5 (5' GTGGTGGTGGTGGT 3') primeri kullanılarak RAPD (Rastgele Amplifiye edilmiş Polimorfik DNA) profilleri açığa çıkarılmıştır (Versalovic vd., 1994). Bu amaç için hazırlanan PCR karışımı Tablo 14’de, RAPD-PCR şartları ise Tablo 15’de verildiği gibi uygulanmıştır.

Tablo 14. *RAPD-PCR Analizi için Hazırlanan PCR Karışımı*

H ₂ O	50 µl için
DNA	1 µl
5X Phusion Buffer	10 µl
dNTP miks	4 µl
Primer (GTG) ₅	1,5 µl
Taq polimeraz	0,25 µl

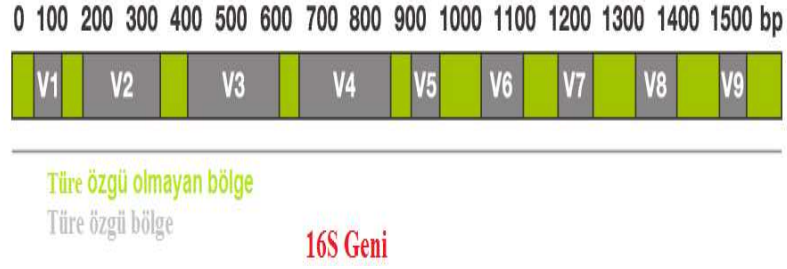
Tablo 15. *RAPD-PCR Analizi için Oluşturulan PCR Şartları*

Denatürasyon	95°C 10 dk 1 döngü
Denatürasyon	94°C 1 dk
Bağlanma	40°C 1 dk 35 döngü
Uzama	65°C 8 dk
Son uzama	65°C 16 dk

İzolatların 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu.

RAPD-PCR işlemini takiben farklı kolonilerde 16S PCR işlemi uygulanmıştır. 16S rRNA geni bakterilerin çoğalması için elzem olan ribozomal RNA'lerden sedimentasyonuna bağlı olarak 16S olarak adlandırılan rRNA geninin kodlandığı gendir ve temel özelliği bakterilerin jenerasyonu için gereklidir. En önemli özelliği ise bu gen bölgesinin her bir bakteri türüne özgü olmasıdır. Dolayısıyla taksonomik açıdan bakterilerin sınıflandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle son yıllarda bakterilerin tanımlanması 16S rRNA gen bölgelerine göre yapılmaktadır. Yani bu bölge parmak izi bölgesi olarak da adlandırılmaktadır. Bakteriyel tanımlamada bu genin kullanımının bir diğer avantajı da bu genin 1500 bp uzunluğunda olması dolayısıyla sekanslama işlemi açısından kolay ve ucuz olmasıdır.

Bu gen Şekil 10'da görüldüğü üzere 9 farklı bölgeden oluşmakta ve bu bölgeler türler arası değişken bölgeler yer almaktadır. Ayrıca her türde aynı olan bölgeleri içermekte ve primer geliştirilme işlemlerinde her tür için aynı olan bölgeler kullanılmaktadır. Bu genin kullanılması son zamanlarda oldukça gelişen topluluk mikrobiyota analizlerinin de gelişimine katkı sağlamıştır.



Şekil 9. 16S rRNA geni.

16S rRNA geninin tespiti amacıyla PCR işlemi için; ekstrakte edilen DNA' ların 1 µl' si Gotaq (Promega) ile yürütülen PCR da DNA şablonu olarak kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımı Tablo 16'da, PCR şartları ise Tablo 17'de verilmiştir (Baker vd. , 2003).

Tablo 16. 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Karışımı

H ₂ O	50 µl için
DNA	1µl
5X Phusion Buffer	10µl
dNTP miks	4 µl
Primer 1(AMP-F)	1,0 µl
Primer 2(AMP-R)	1,0 µl
Taq polimeraz	0,25 µl

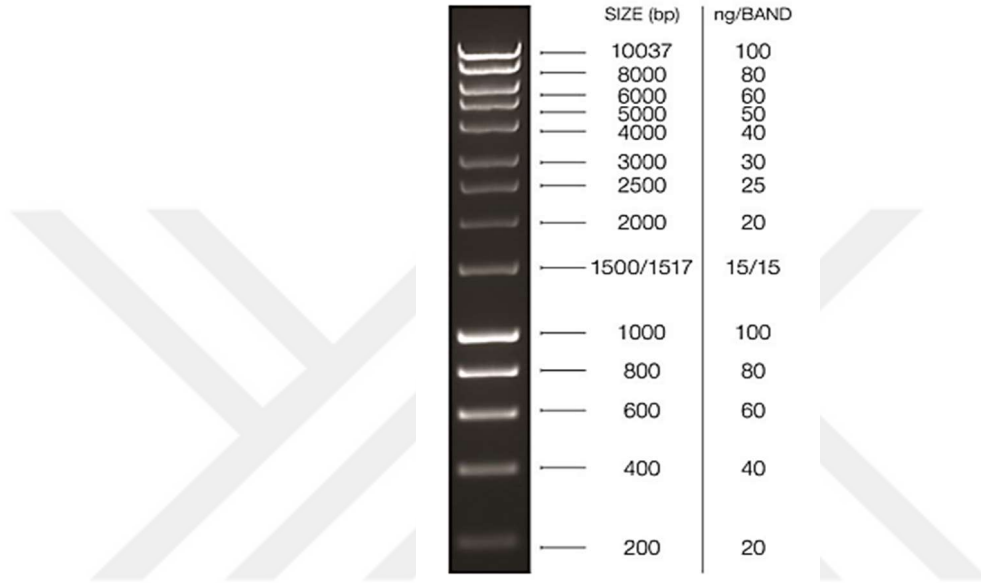
Tablo 17. 16S rRNA Geninin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Şartları

Denatürasyon	95°C 2 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C 30 s	
Bağlanma	55°C 20 s	25 döngü
Uzama	72°C 30 s	
Son uzama	72°C 5 dk	1 döngü

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü.

PCR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü için konsantrasyonu %1 olan agaroz jeli 0,5X Tris borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. PCR ürününden 10 µl alınarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE tamponu kullanılarak elektroforez işlemine bırakılmıştır. Örnekleri bir yükleme boyası ile boyamak gerektiğinde örnekleri agaroz jele yüklemmeden önce örnekler loading buffer (0,015% bromethyl blue (Sigma), 10% glycerol (Sigma) in 0,5 x TBE buffer) ile renklendirilmiştir. Bu işlem için ilk olarak parafilm üzerine 1 µl loading buffer dan konulup üzerine 10 µl örnek aktarılarak otomatik pipet aracılığı ile örnek

ve buffer birbirine karıştırılmıştır ve renklendirilen örnekler agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez işleminin ardından jeller 1 mg.L^{-1} lik etidyum bromid çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilerek jelde yüklü olan DNA parçacıklarının boyanması gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından jeller deiyonize su içerisinde kısa süre tutularak durulandıktan sonra UV Transilluminatör (Cleaver) kullanılarak görüntülenmiştir. Hyperladder I (Bioline, UK) her bir jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır. Jele yüklenen 5 µl ladder'ın fragmentlerinin boyutları ve miktarları Şekil 12' de gösterilmiştir.



Şekil 10. Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.

Dizi analizi.

DNA sıralaması bir DNA molekülünün nükleotit bileşiminin belirlenmesidir. Bu bağlamda saflaştırdığımız PCR ürünlerinin 16S rRNA geninin sekans analizi ülkemizde Molla Gürani Mah. Fındıkzade Sok No:19/5 Fatih - İSTANBUL adresinde hizmet veren Medsantek Laboratuar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine yaptırılmıştır.

İzolatların alt tür tanımlanmasında MLST tekniğinin kullanımı.

İlgili kolonilerden seçilip RAPD-PCR profillemeye ve takiben 16S rRNA PCR işlemleri ile ön ayırımı gerçekleştirilmiştir. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* olduğu tespit edilmiş kültürlerin suş seviyesinde ayırımının gerçekleştirilmesi amacıyla Çoklu Lokus Dizilim Analizi (MLST) uygulanmıştır. Bu kapsamda Tablo 9'da verilen primerler kullanılarak her iki bakteriye özgü gen bölgeleri PCR işlemi ile çoğaltılmış ve takiben PCR ürünleri sekanslama işlemi için MEDSANTEK (İstanbul) firmasına gönderilmiştir. Sekans işlemi sonucunda ilgili genlerin dizileri Finch TV programı ile görüntülenmiş ve MLST analizi için elde edilmiştir.

MLST analizinin uygulanmasında <https://pubmlst.org/> adresindeki veri tabanı *S. thermophilus* suşları için oldukça yeterli sayıda MLST verisi içerdiğinden bu suşların ilgili gen bölgesinin hangi tip allelde olduğunun belirlenmesi için bu veri tabanı kullanılmıştır. *L. bulgaricus* suşlarının MLST profillerinin belirlenmesi için ise bu veri tabanı yeterli profile sahip olmadığı için bu suşlar ile ilgili gen bölgesini kapsayan filogenetik dendogram oluşturulmuş ve MLST profilleri belirlenmiştir. MLST analizi için hazırlanan PCR karışımı Tablo 18’de, PCR şartları Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 18. *MLST Analizi için Hazırlanan PCR Karışımı*

H ₂ O	50 µl için
DNA	1 µl
5X Phusion Buffer	10 µl
dNTP miks	4 µl
Primer R	1,0 µl
Primer F	1,0 µl
Taq polimeraz	0,125 µl

Tablo 19. *MLST Analizi için Oluşturulan PCR Şartları*

Denatürasyon	95°C 2 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C 30 s	
Bağlanma	50°C 1dk	30 döngü
Uzama	72°C 1dk	
Son uzama	72°C 5 dk	1 döngü

İzole edilen suşların teknolojik özelliklerinin belirlenmesi.

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının asit geliştirme özelliklerinin belirlenmesi.**

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* türlerinin asidifikasyon aktivitesi pH’nın zaman içerisinde değişiminin ölçümü (Δ pH) ile belirlenmiştir. *L. bulgaricus* türleri %1 fruktozlu MRS brothda ve *S. thermophilus* türleri %1 laktozlu M17 brothda iki kez aktifleştirildikten sonra bileşimi Tablo 3’te verilen 100 ml Skim Milk Besiyerine % 2 oranında inoküle edilerek 42°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ortamın pH’sı iki saat aralıklarla 10 saat boyunca ölçümü yapılmıştır. Türlerin asidifikasyon oranları Δ pH=pH_{Başlangıç}-pH_{Ölçüm zamanı} formülasyonuna göre belirlenmiştir.

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşların % laktik asit miktarının belirlenmesi.**

L. bulgaricus türleri %1 fruktozlu MRS brothda ve *S. thermophilus* türleri %1 laktozlu M17 brothda iki kez aktifleştirildikten sonra bileşimi Tablo 3'te verilen 100 ml Skim Milk Besiyerine % 2 oranında inoküle edilerek 42°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültür santrifüj ile çöktürülerek süpernatanttan 9 ml alınarak 18 ml distile su ile karıştırılmıştır. Üzerine Ek-1' de belirtildiği gibi hazırlanan fenolftalein indikatöründen 0,5 ml ilave edilerek 0,1N NaOH çözeltisi (Ek-1) ile titre edilmiştir. Kültürlerin ürettiği asit, titre edilebilir yüzde asitlik (laktik asit) olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Laktik asit} = (V \times 0,009 \times 100) / m$$

V: Titrasyonda kullanılan 0,1 N NaOH çözeltisi

m: Titrasyonda kullanılan örnek miktarı

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.**

L. bulgaricus ve *S. thermophilus* türlerinin proteolitik aktiviteleri *o-fitalaldehit* metodu kullanılarak belirlenmiştir (Rajagopal, & Sandine, 1990). Bu metotta süt proteinlerinin hidrolizi ile açığa çıkan α -amino grupları *o-fitalaldehit* ve β -merkaptöetanol ile reaksiyona girerek OD₃₄₀ nm'de ölçülebilen kompleksi oluşturur. *L. bulgaricus* türleri %1 fruktozlu MRS brothda ve *S. thermophilus* türleri %1 laktozlu M17 brothda iki kez aktifleştirildikten sonra serbest aminoasitlerin taşınmasını engellemek için Tablo 26'da belirtildiği gibi hazırlanan 5 ml 0,32 mM sodyum fosfat buffer (pH 7,2) ile yıkanmış ve aynı çözeltinin 1mL' sinde süspansiyon edilmiştir. Daha sonra hücreler pastörize yağsız süt ortamına %2 oranında inoküle edilmiş ve *S. thermophilus* suşları 37°C ve *L. bulgaricus* 42 °C 'de 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekten 2.5 ml alınıp 10 ml 0.75 M TCA (Ek-1) ve 0.5 ml distile su ilave edilip karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve sonrasında whatman 4A filtre kâğıdı ile süzümüştür. Süzüntüden 50µl alınarak Ek-1' de belirtildiği gibi hazırlanan 1 ml OPA reagent çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra OD₃₄₀ da ölçüm yapılarak örnekteki serbest aminoasit miktarı belirlenmiştir (Hou, Liu, Ren, Han, & Du, 2015). Aynı zamanda süttten gelebilecek serbest amino asitleri yok saymak için kontrol örneğine de aynı işlemler uygulanmış ve örneğin

$$\Delta OD'_{si} = \text{Örnek OD}_{340 \text{ nm}} - \text{Kontrol OD}_{340 \text{ nm}}$$
 formülü ile belirlenmiştir.

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının faj dirençliliğinin belirlenmesi.**

L. bulgaricus suşlarının fajlara karşı dirençliliğini belirlemek için suşlar MRS broth içerisinde 4 saat geliştirilmiştir. 4 saatin sonunda *L. bulgaricus* kültürlerinde 0,3 mL alınarak 3 mL MRS yumuşak agar içeren (%0,6 agar) tüplere aktarılmış ve karıştırılmıştır. Daha sonra yumuşak agar bir öncesinden hazırlanmış olan MRS agar içeren petriplakların üzerine homojen bir şekilde dökülmüştür. Katılaştıran agar üzerine titreleri 10^8 - 10^9 pfu/mL' ye yükseltilen faj filtratlarından mikropipet yardımı ile 10µL spot yapılmıştır. Petriler kurduktan sonra 42-43°C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda damlatılan alanlarda berrak plak (liziz) oluşup oluşmamasına göre değerlendirilmiştir. Liziz oluşması karşılaştırılan bakterilerin damlatılan faja karşı duyarlı olduğunu, plak oluşmaması ise bakterinin damlatılan faja karşı dirençli olduğunu göstermektedir.

S. thermophilus suşlarının fajlara karşı dirençliliğini belirlemek için suşlar Tablo 5'de verilen M17 broth besiyerinde 4 saat geliştirilmiştir. Geliştirilen kültürlerinden 0,3 mL alınarak Tablo 7'de verilen M17 yumuşak agar içeren tüplere aktarılmış ve karıştırılmıştır. Daha sonra yumuşak agar bir gün öncesinden hazırlanan Tablo 8'de verilen M17 agar içeren petriplaklarına döküp homojen olarak yayılmıştır. Katılaştıran agar üzerine titreleri 10^8 - 10^9 pfu/mL' ye yükseltilen faj filtratlarından mikropipet yardımı ile 10µL damlatılmıştır. Petriler kurduktan sonra 42-43°C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda damlatılan alanlarda berrak plak (liziz) oluşup oluşmamasına göre değerlendirilmiştir. Liziz oluşması karşılaştırılan bakterilerin damlatılan faja karşı duyarlı olduğunu, plak oluşmaması ise bakterinin damlatılan faja karşı dirençli olduğunu göstermektedir (Acar Soykut, & Tunail, 2007).

Laktozlu modifiye BHI ortamında geliştirilen türlerin eps izolasyonu ve saflaştırılması.

EPS üretimi için suşlar %40'lık gliserol kullanılarak hazırlanan ve -80°C'de muhafaza edilen kültür stoklarından canlandırma amacı ile *S. thermophilus* suşları %1 laktozlu M17 brothda, *L. bulgaricus* suşları %1 fruktozlu MRS brothda %1 oranında kültürler ekilmiş ve 45°C de 24 saat ön geliştirme yapılmıştır. Gelişen kültürler Tablo 4'de bileşimi verilen %2 laktoz içeren modifiye BHI besiyerine %1 oranında ekilerek 45°C de 2 gün geliştirilmiştir. Gelişen kültürler 10 dakika boyunca 4000×g de santrifüjlenerek çöken hücreler uzaklaştırılmış ve elde edilen ham EPS içeren süpernata ×2 kat soğuk etanol ilave edilerek ham EPS'nin çökmesi için +4°C'de 2 gün bekletilmiştir. Çöken ham EPS 4000×g de 15 dk santrifüj işlemi ile elde edilmiştir ve süpernatın uzaklaştırılarak ham EPS 10 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. Tamamen çözündürülen EPS -80°C'de dondurulduktan

sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulan EPSler şeker miktarının tespit edilmesi için fenol sülfirik testinde ve monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi analizlerinde kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edilmiştir (Dertli, Mercan, Arıcı, Yılmaz, & Sağdıç, 2016)

İzole edilen suşların fenol-sülfirik asit testi ile EPS üretim miktarı analizi.

EPS izolasyonunu takiben üretilen EPS miktarını belirlemek amacıyla fenol-sülfirik asit testi uygulanmıştır. Bu amaçla glikoz kullanılarak standart seyreltiler ile (0’dan 0,2 mg.ml⁻¹’ye kadar) kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Daha sonra 200 µl örnek spektro küvetine konmuş ve üzerine 600 µl %98’lik sülfirik asitten ilave edildikten sonra 120 µl %5’lik fenol ilave edilmiş ve renk gelişimi için 5 dakika beklenmiştir. Ardından ilgili küvetlerdeki OD_{490 nm} ölçülmüş ve glukoz eğrisi kullanılarak örneklerin EPS miktarı belirlenmiştir (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi.

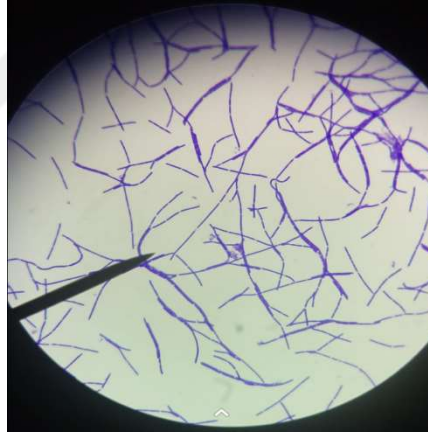
EPS üretim miktarlarının belirlenmesi için hazırlanan örnekler refraktif indeks dedektörüne sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmiş olup enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenmiş ve kolon olarak CARBOsep CHO-682 Pb Column kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 85°C’de sabit tutulmuş ve mobil faz olarak su kullanılmıştır. Örneklerin glukoz, fruktoz, maltoz ve galaktoz içerikleri, aynı sistem ve çözücü kullanılarak her bir şeker için daha önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyona karşılık HPLC kromatogramından elde edilen alan değerlendirilerek monosakkarit kompozisyonu belirlenmiştir (Dertli, Colquhoun, Côté, Le Gall, & Narbad, 2018).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

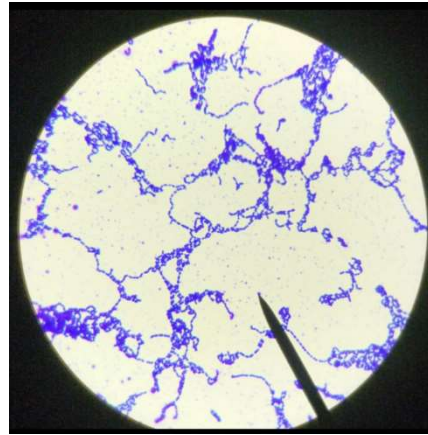
Araştırma Bulguları ve Tartışma

Yoğurttan Gram +, Katalaz – Suşların İzolasyonu Amacıyla Bakterilerinin Fenotipik Karakterizasyonu

Yoğurt starter kültürlerinin izolasyonu amacıyla *S. thermophilus* suşları için laktozla modifiye edilen M17, *L. bulgaricus* içinde fruktozla modifiye edilmiş MRS besiyerlerinde gelişen farklı tipteki tek koloniler yine ilgili besi ortamlarına ekilip geliştirilmiş ve takiben LAB türlerinin ortaya çıkarılması amacıyla izolatlara Gram boyama ve katalaz testi uygulanmıştır. Test sonucunda Gram + ve katalaz – fenotip gösteren izolatlar bir sonraki basamak için seçilmişleridir. Şekil 13-14 sırasıyla *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları Gram boyama sonrasındaki mikroskop görüntülerini göstermektedir.



Şekil 11. *L. bulgaricus* suşunun gram boyama ile ışık mikroskopunda görüntüsü.

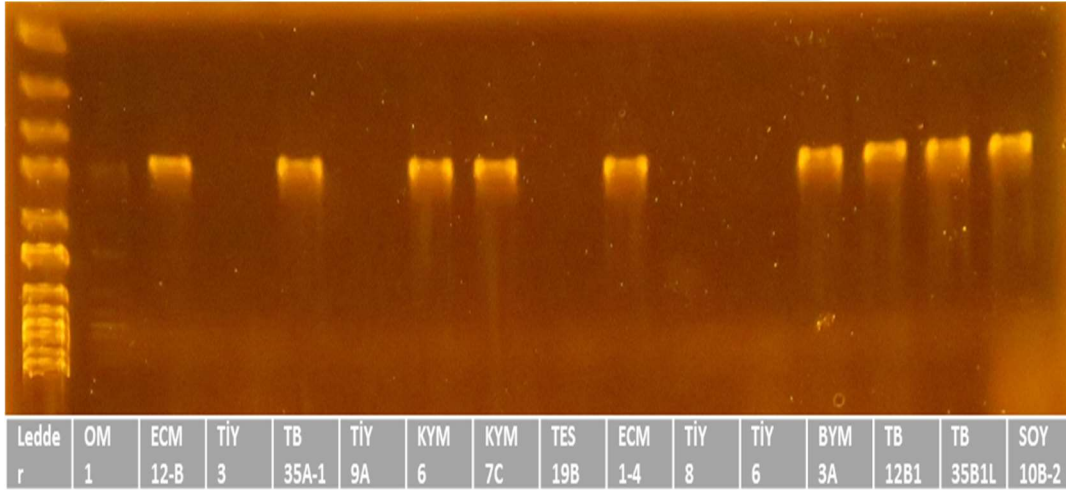


Şekil 12. *S. thermophilus* Suşunun gram boyama ile ışık mikroskopunda görüntüsü.

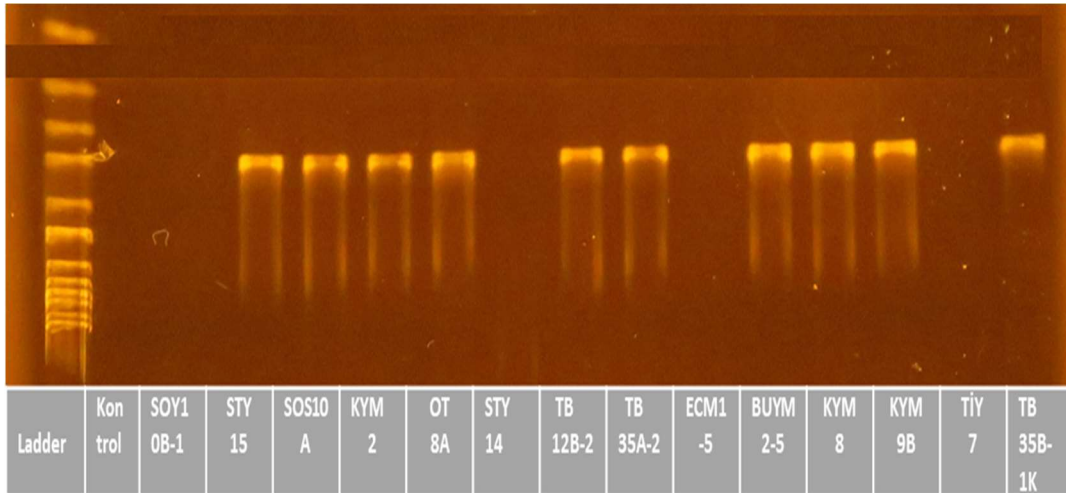
Yoğurt Bakterilerinin Genotipik Tanımlanması

Yoğurt bakterilerinin PCR işlemi ile kontrolü.

Yoğurt izolatlarından sadece starter kültür olabilecek *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının seçilmesi işlemi çerçevesinde daha önce bu bakterilere özgü olarak geliştirilmiş primerler marifetiyle PCR işleminin uygulanması metodolojisi geliştirilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak *S. thermophilus* olduğu düşünülen izolatlardan DNA izole edilip, *S. thermophilus* türüne özgü primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. Elde edilen izolatların *S. thermophilus* türüne ait olup olmadığı belirlenmiştir. PCR işleminin ardından elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. *S. thermophilus* olarak düşünülen 171 izolatın özgü primer ile kontrol edilmesi sonucu 105 tane *S. thermophilus* türüne ait izolatlar belirlenmiştir. Şekil 15 ve Şekil 16'de *S. thermophilus* suşu olabilecek izolatların PCR görüntülerini göstermektedir.



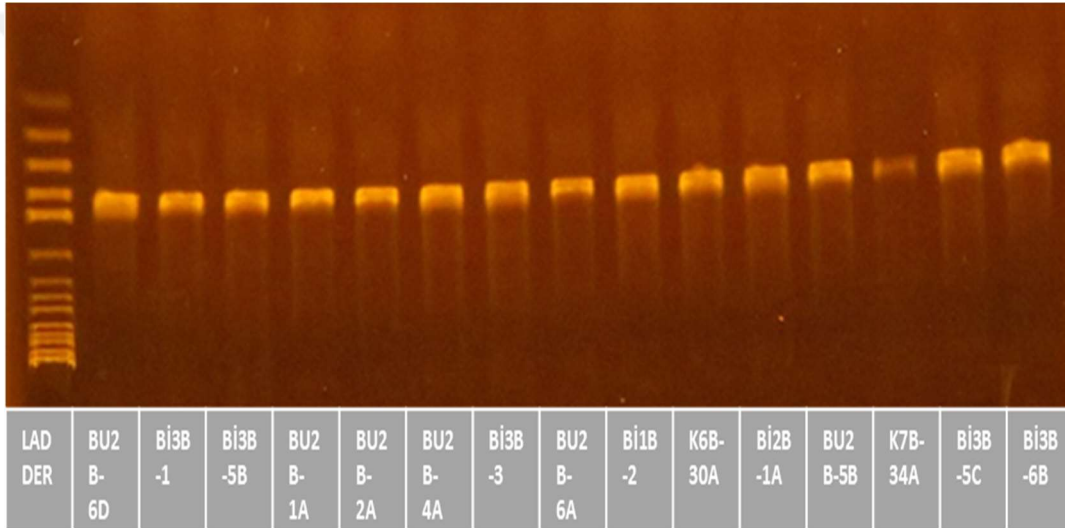
Şekil 13. *S. thermophilus* pozitif ve negatif çıkan izolatlara ait jel görüntüsü (ürün; 1000 bp).



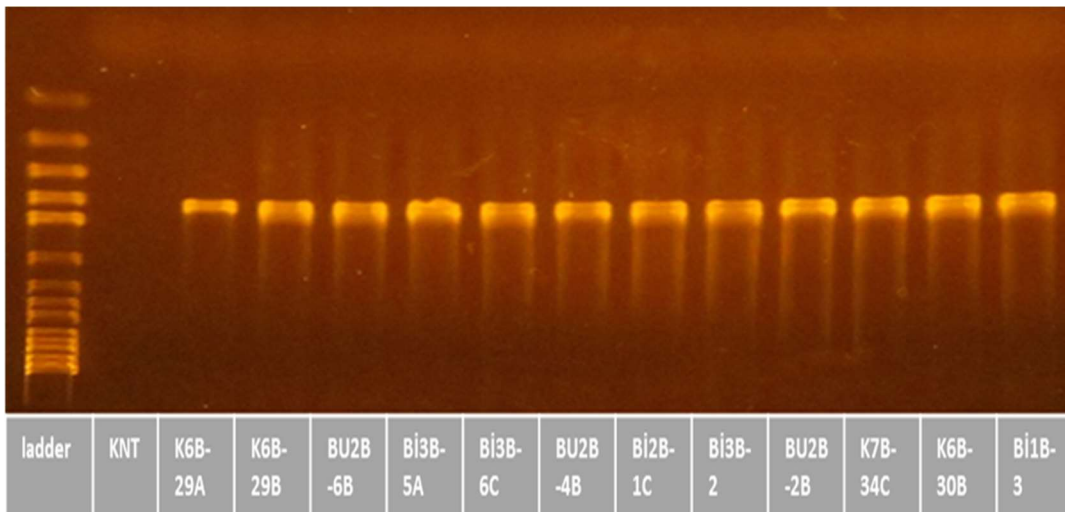
Şekil 14. *S. thermophilus* pozitif ve negatif çıkan izolatlara ait jel görüntüsü (ürün; 1000 bp).

Her iki şekilden de görüleceği üzere izolatlardan bazılarında *S. thermophilus* spesifik PCR işlemi neticesinde beklenen boyutta bir ürün oluşurken bazılarında ise herhangi bir ürün oluşmamıştır. Oluşan ürünler sonrasında sekanslama işlemine gönderilmiş ve pozitif izolatların *S. thermophilus* olduğu belirlenmiştir.

Benzer bir yaklaşım *L. bulgaricus* izolatlarına da uygulanmıştır. Bu kapsamda *L. bulgaricus* olduğu düşünülen izolatlardan DNA izole edilip, *L. bulgaricus* türüne özgü primer seti ile PCR reaksiyonu kurulmuştur. Elde edilen izolatların *L. bulgaricus* türüne ait olup olmadığı belirlenmiştir. PCR işleminin ardından elde edilen PCR ürünleri agaroz jele elektroforezinde yürütülmüştür. *L. bulgaricus* olarak düşünülen 115 izolatın özgü primer ile kontrol edilmesi ile 96 tane *L. bulgaricus* türüne ait izolatlar belirlenmiştir. Şekil 17 ve 18’de *L. bulgaricus* suşu olabilecek izolatların PCR görüntülerini göstermektedir.



Şekil 15. *L. bulgaricus* pozitif ve negatif çıkan izolatlara ait jel görüntüsü (ürün; 900 bp).



Şekil 16. *L. bulgaricus* pozitif ve negatif çıkan izolatlara ait jel görüntüsü (ürün; 900 bp).

Her iki şekilden de görüleceği üzere ilgili primer seti ile beklenen boyutta ürünler *L. bulgaricus*'a özgü PCR işleminin sonucunda elde edilmiştir. Önemli olarak herhangi bir hatalı sonucun oluşup oluşmadığının tespiti için kültür koleksiyonumuzda yer alan bazı Laktobasil ve Enterokok'lar her iki primer seti ile de reaksiyona sokulmuş ancak hiçbir ürün oluşumu gözlenmemiştir. Sonuç olarak ilgili izolatların kültüre edilmesi ve takiben PCR'a dayalı metodoloji ile taranması sonucunda sadece *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türlerine ait izolatlar izole edilebilmiştir.

Lick vd. (1996) yapmış olduğu çalışmada 34 LAB (laktobasil, streptokok ve enterokok) ile *E. coli* suşları çalışma kapsamında kullanmışlardır. Elde edilen bu suşlar kendilerine özgü primer ile PCR'da kontrol etmişlerdir. Primer olarak lacZ nükleotit kullanılmışlardır. Çalışmaya göre bu primer ile kontrol edilen suşlarda primerin sadece *S. thermophilus* suşunu hedef aldığı belirlenmiştir. Ayrıca suşlar arasında yer alan ve *S. thermophilus* ile benzerlik gösteren *S. salivarius* DNA'sında da herhangi bir amplifikasyon görülmediği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada bu yaklaşımın kendilerine özgü primer ile PCR tekniği kullanılarak *S. thermophilus* suşlarının daha hızlı ve daha etkili bir şekilde tanımlanabileceğine izin veren bir yöntem olduğu savunulmaktadır.

Yapılan bir diğer çalışmada Türkiye'de geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan yoğurt kültürleri izole edilmiştir. İzolatların hangi tür olduğunu belirlemek için PCR tekniği ile *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* türlerine ait 16S rRNA bölgesindeki suşlara özgü bölgeyi çoğaltmak için uygun primerler kullanılmıştır. Suşların bakteri türlerini doğrulamak için hücre morfolojileri, Gram boyama ve katalaz aktiviteleri incelenmiş ve izolatların *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* türlerine ait olduğu onaylanmıştır. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* türlerini belirlemede türe özgü bölgenin çoğaltılması ile *S. thermophilus* türlerine ait 61 suş ile *L. bulgaricus* 36 suş belirlenmiştir (Gezginc, Topcal, Comertpay, & Akyol, 2015).

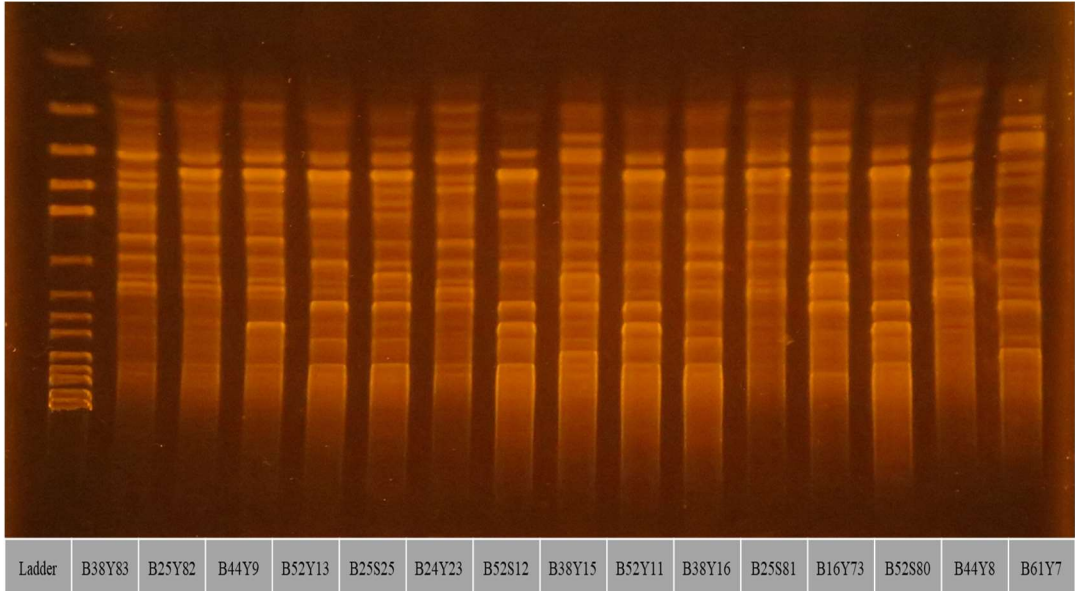
Başka bir çalışmada buna benzer yaklaşımla *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum* ve *S. thermophilus* suşlarının hedef gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak bu suşların tanımlanması hedeflenmiştir. Kullanılan bu hedef gen bölgeleri ile PCR tekniği kullanılmıştır. Çalışma sonunda izole edilen 5 LAB türünün hedef gen bölgeleri çoğaltılmıştır ve bu suşları hızlı ve etkili ayrımı gerçekleştirilmiştir (Cremonesi vd., 2011).

Diğer bir çalışmada ise *S. thermophilus* türleri için 16S rRNA gen bölgesindeki spesifik bir bölgeye özgü bir primer seti tasarlanmıştır. Bu primer *S. thermophilus* dışında, *L. lactis* ve *E. faecium* suşlarında da bu bölge aranmıştır. Tasarlanan primer ile 16S rRNA bölgesi amplifiye edilen suşların benzerlik oranları *S. thermophilus*, *L. lactis* ve *E. faecium* suşlarında sırasıyla %100, %71 ve %57 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında 10 tane yaygın olarak

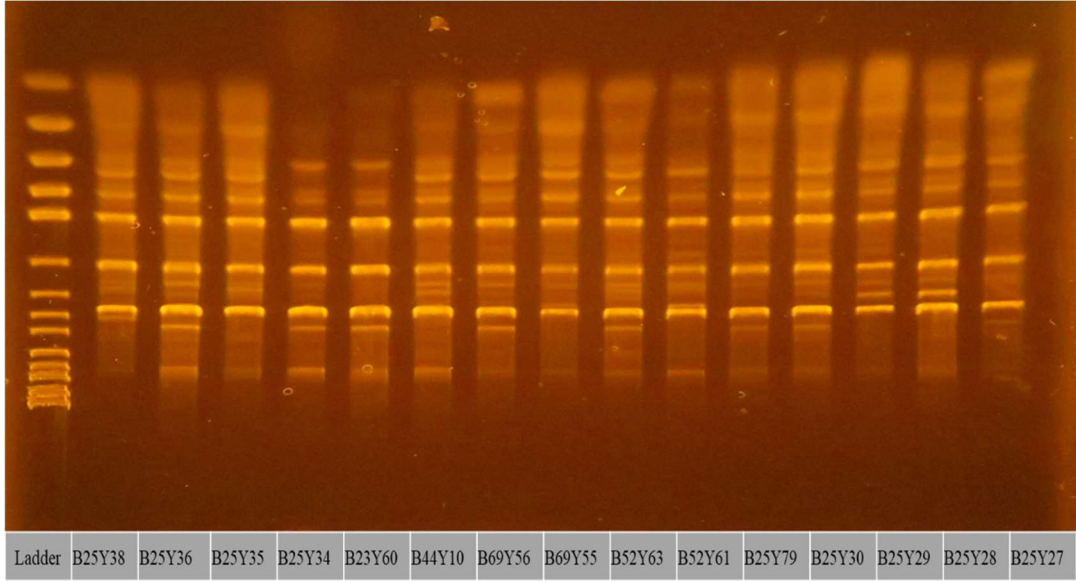
kullanılan LAB ile *Bifidobacterium*'unda hızlı tespit edilmesi amacıyla spesifik primerler tasarlanmıştır. 16S rRNA benzerlik analizi ile birbirine çok yakın olan türler arasında da ayırım yapılabildiği bildirilmiştir (Lu vd. , 2015). *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *L. fermentum* türlerinin hızlı tespiti amacıyla (Cremonesi vd., 2011) PCR işlemi kullanmıştır. Bu analizde *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* türlerine özgü β -galaktosidaz üretimini kodlayan gen bölgesi, *L. helveticus* türüne özgü proteinaz üretimini kodlayan gen bölgesi, *L. lactis* türünde dipeptit taşıma sisteminin üretimini kodlayan gen bölgesi ve *L. fermentum* türünde arginin-ornitin antipoter protein üretimini kodlayan gen bölgesi hedef alınarak primer geliştirilmiştir. Bu çalışmanın sonunda yakından ilişkili türlerin birbirinden ayırt etmek için kullanılan PCR analizinin oldukça etkili olduğu belirtilmiştir (Cremonesi vd., 2011).

RAPD-PCR analizi ile genotipik karakterizasyon.

Yoğurt starter kültürü olabilecek izolatların genetik ayrımı ilk olarak RAPD-PCR işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* olarak belirlenen izolatların (GTG)5 profilleri PCR işlemi ile çıkartılmıştır. Şekil 19 ve 20' de sırasıyla *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının RAPD-PCR işlemi sonucunda oluşan bant profillerini göstermekte olup, bu profillere göre farklı olduğu düşünülen suşlar bir sonraki basamak için seçilerek ön genotipik tipleme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 17. *S. thermophilus* pozitif çıkan izolatların GTG5 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.

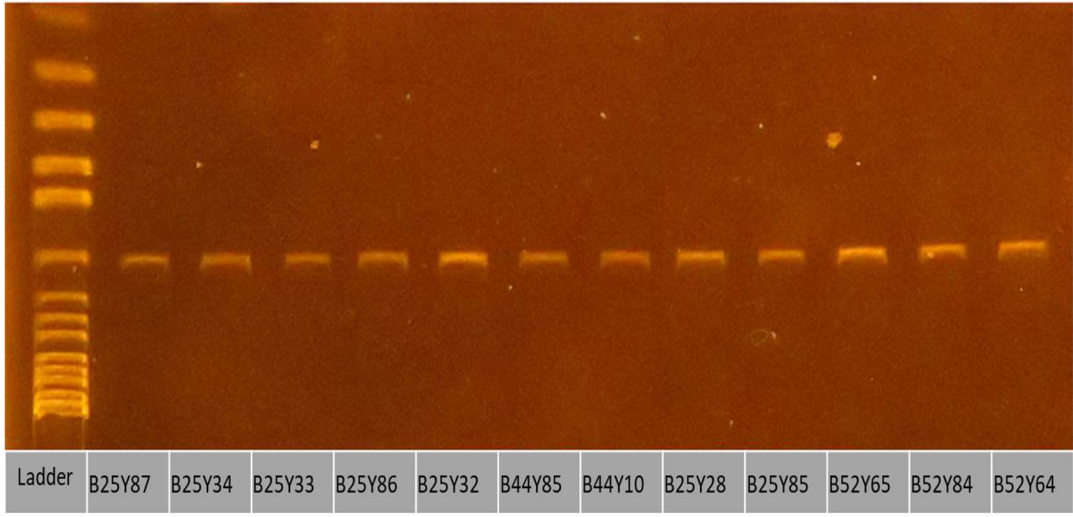


Şekil 18. *L. bulgaricus* pozitif çıkan izolatların GTG5 profillerini gösteren agaroz (%1) jel görüntüsü.

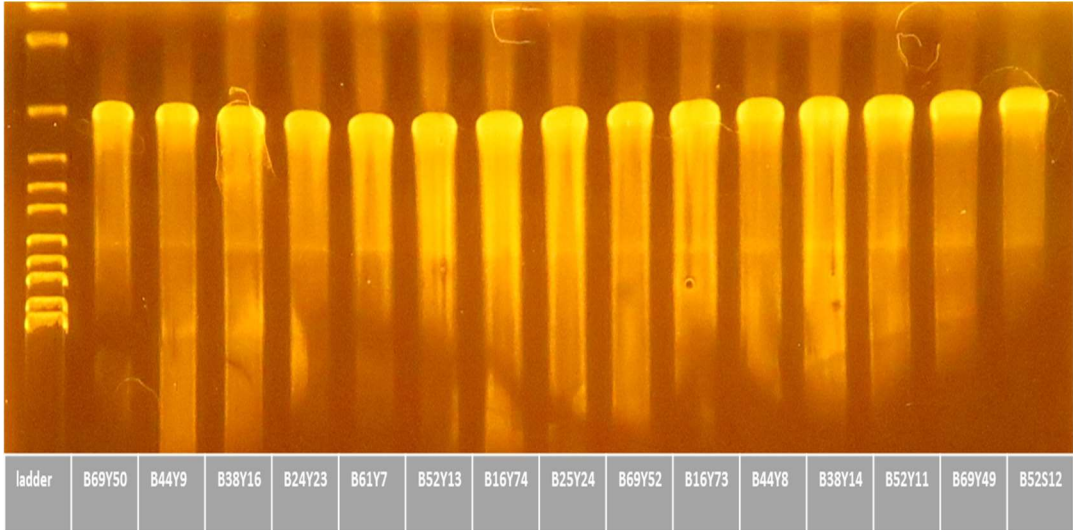
Her iki şekilden de görülebileceği üzere (GTG)5 işlemi önemli bir düzeyde ayırım elde etme imkânı sağlamış ve böylece ilk başta 105 ve 96 olan sırasıyla *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* sayıları benzer olabileceği düşünülen izolatların elenmesi ile başta 16S rRNA PCR işlemi olmak üzere daha sonraki işlemlere 34 *S. thermophilus* ve 45 *L. bulgaricus* şeklinde aktarılmıştır.

***S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* Pozitif Türlerin 16S rRNA Genlerinin Sekanslanması.**

RAPD-PCR sonucu farklı olduğu düşünülerek seçilen izolatlarda 16S rRNA geni universal primerler kullanılarak PCR işlemi ile ampilifiye edilmiş ve 1500 bp ürünün elde edilip edilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. 16S rRNA geninin primerler ile ampilifiye edilmesi ile 34 *S. thermophilus* ve 45 *L. bulgaricus* tür sekanslama işlemine gönderilmiştir. Şekil 21-22' de *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* türlerine ait 16S rRNA geninin PCR ile ampilifikasyonunun ardından jelde yürütülmesi işlemi göstermektedir. PCR ürünleri açısından herhangi bir sorun teşkil etmeyen ürünler sonrasında sekanslama işlemi için MEDSANTEK'e (İstanbul) gönderilmiştir.



Şekil 19. *S. thermophilus* ve *L. Bulgaricus* pozitif suşlarda 16S rRNA geninin amplifikasyonunu gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.



Şekil 20. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* pozitif suşlarda 16S rRNA geninin amplifikasyonunu gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.

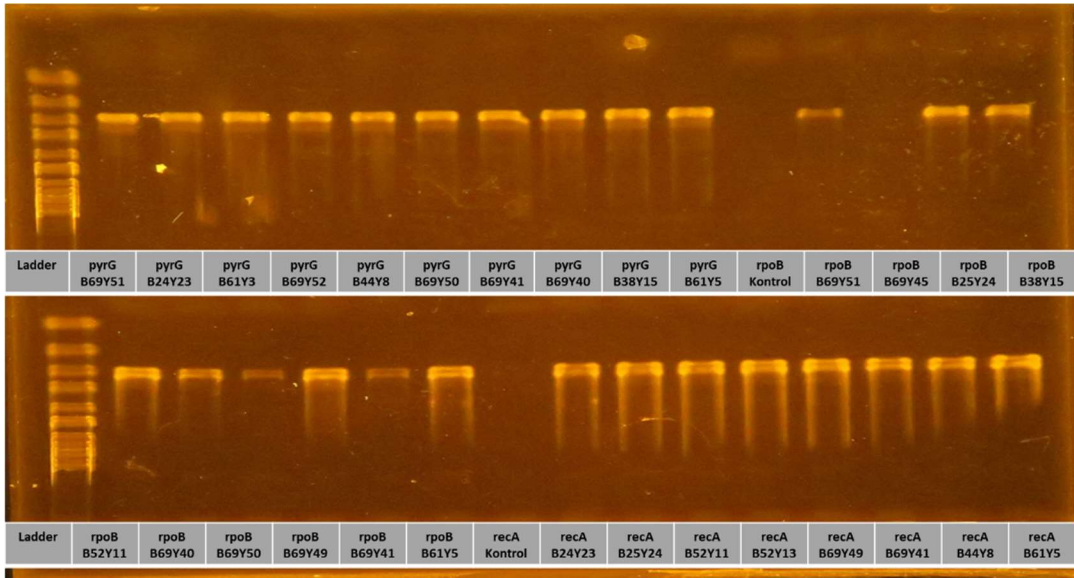
Sekanslama işlemi sonucunda bütün suşlar beklendiği şekilde *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* olarak BLAST sistemi marifetiyle tanımlanmıştır. Toplam 79 tane izolatta ve bunların 45 tanesi farklı *L. bulgaricus* ve 34 tanesi farklı *S. thermophilus* suşları olmak üzere tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Benzer bir çalışmada Lübnanın geleneksel fermente ürünü olan Labandan 96 LAB izole edilerek teknolojik özellikleri karakterize edilmiştir (Chammas, Saliba, Corrieu, & Béal, 2006). ‘‘Laban’’ yoğurt benzeri fermente bir süt ürünü olup bu kapsamda test edilen suşların fenotipik ve biyokimyasal analizlere tabi tutulması ile birlikte totalde 96 tane *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşu izole edilmiştir.

Dertli (2015), yapmış olduğu çalışmada, Düzce’de 4 farklı kaynaktan toplam 8 tane yoğurt örneği toplayarak 48 saat içerisinde analiz etmiştir. Toplam 7 izolat elde etmiş ve bu izolatlardan 3 ‘ünü *S. thermophilus* olarak tanımlanırken diğer 3 suş *S. hominis*, bir suş ise kültürlenmemiş bakteri ile eşlendiğini saptamıştır. Diğer bir çalışma da ise, Bayburt’ta geleneksel yoğurt örnekleri toplanarak analize tabi tutulmuş ve elde edilen 150 yoğurt izolatının genotipik olarak tanımlanması yapılmıştır. Çalışma sonunda *L. bulgaricus*’ a ait 4, *S. thermophilus*’a ait 9 suş identifiye edilmiştir (İspirli, & Dertli, 2018).

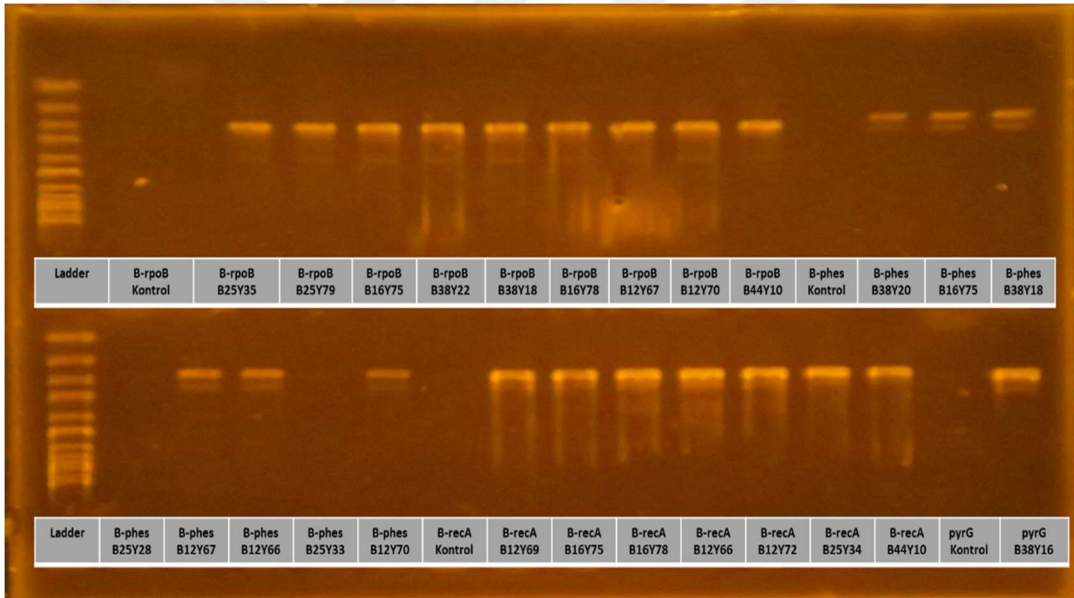
Başka bir çalışmada ise, Yunan yoğurdundan toplam 74 suş *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*’tan ise 75 suş izole edilerek bu suşların asidifikasyon hareketi, aroma bileşikleri oluşumu açısından değerlendirilmiştir (Xanthopoulos, Petridis, & Tzanetakis, 2001). Yine farklı bir çalışmada ise, Türkiye’nin farklı bölgelerinden elde edilen yoğurt örneklerinde 34 adet *S. thermophilus* suşu izole edildiği (Aslim, & Beyatli, 2004) tarafından rapor edilmiştir. Bütün bu çalışmalardan görüleceği üzere çok fazla sayıda örnek toplama işlemi gerçekleştirilmiş olmasına rağmen izole edilen farklı suş sayısının beklenenin altında olduğu yorumu ortaya konabilir. Bu husus geleneksel yoğurt bakterilerinin izolasyon güçlüğü olarak yorumlanabilir.

İzolatların alt tür tanımlanmasında MLST tekniğinin kullanımı.

MLST tekniği LAB türleri de olmak üzere bakteriyel türleri suş seviyesinde ayırmakta kullanılabilen oldukça etkin bir tekniktir. Bu kapsamda tez bütçesinin de el verdiği ölçüde farklı olduğu RAPD-PCR işlemi ile ortaya konan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarında 3’er MLST bölgesi ampilifiye edilmiş ve suşlar derinlemesine tiplendirilmeye çalışılmıştır. Şekil 23 ve 24’ de *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarında sırasıyla pyrG, recA, rpoB ve rpoB, recA ve pyrG bölgelerinin ampilifikasyonunu gösteren agaroz jel görüntülerini göstermektedir.



Şekil 21. *S. thermophilus* suşlarında rpoB, recA ve pyrG bölgelerinin ampilikasyonunu gösteren agaroz jel görüntüleri.



Şekil 22. *L. bulgaricus* suşlarında, B-rpoB, B-recA, B-phes bölgelerinin ampilikasyonunu gösteren agaroz jel görüntüleri.

İlgili bölgelerin ampilikasyonunu takiben bu bölgelerin sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir. *S. thermophilus* izolatları için elde edilen sekanslar sonrasında MLST veri tabanı olan <https://pubmlst.org/> adresine yüklenmiş ve *S. thermophilus* izolatlarının allel tipi belirlenmiştir. Tablo 20'de *S. thermophilus* izolatları için allel tiplerini göstermektedir. Tablo 20'den de görüleceği üzere pyrG gen bölgesi ile 5 farklı allel tipi ortaya çıkmış ve izolatlar 5 farklı suşa ayrılmıştır. Bu doğrultuda B69Y39, B52S12, B52Y13, B69Y51, B38Y16, B69Y40, B69Y41 ve B44Y8 allel tipi 11 olarak, B61Y1, B16Y73 ve B16Y74 allel tipi 9, B25S25 allel tipi 10, B69Y50, B24Y23, B38Y14 ve B44Y9 allel tipi 6, B61Y5 allel tipi 4 olarak ortaya

çıkıştır. Benzer olan allellerde recA gen bölgesinin farklı olduğu gözlenmiştir. Örneğin pyrG geni açısından B69Y39 ve B52Y13 11 allel tipinde iken, her iki izolat recA geni için sırasıyla 5 ve 2 allel tipini göstermişlerdir. Bu sonuç bu allellerin farklı olması münasebetiyle bu suşların farklı suşlar olduklarını göstermesi bakımından önem arz etmektedir. Benzer sonuçlar rpoB geni içinde ortaya çıkmıştır.

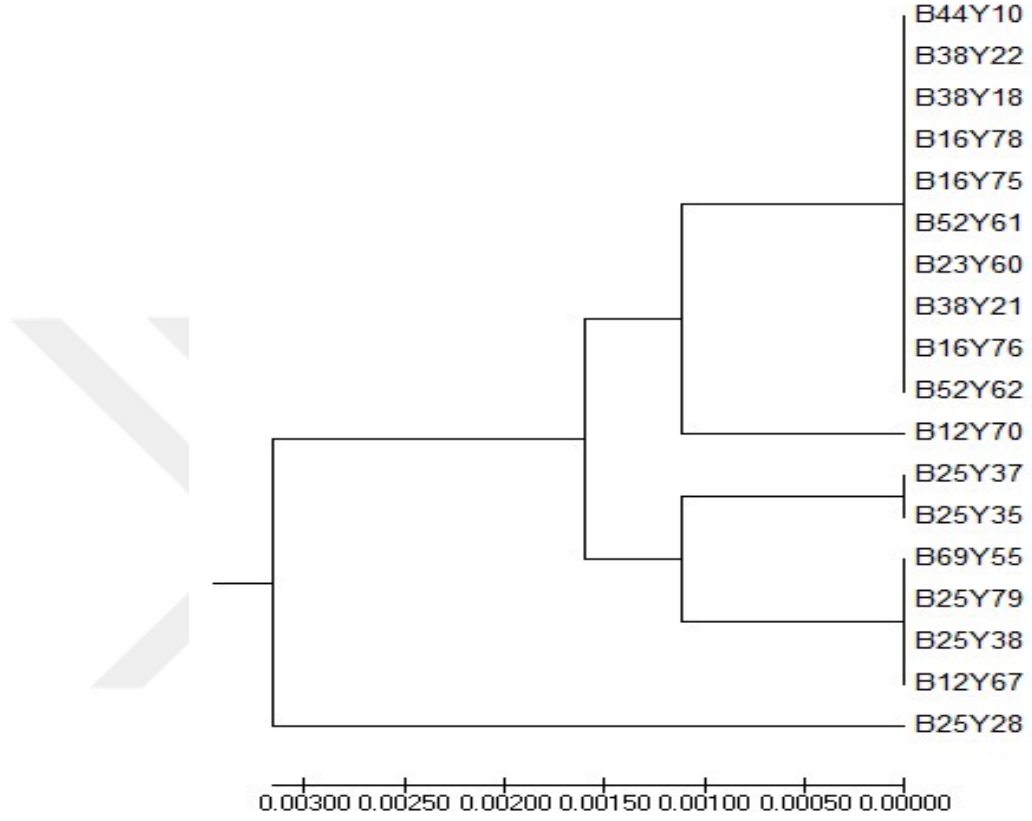
Tablo 20. *S. thermophilus* İzolatlarının pyrG, recA ve rpoB MLST Bölgeleri için Allel Tipleri

Suş Kodu	pyrG	recA	rpo-B
B69Y39	11	5	2
B61Y1	9	5	9
B52S12	11	5	2
B25S25	10	4	11
B69Y50	6	-*	-
B61Y5	4	2	-
B52Y13	11	2	-
B69Y52	11	2	-
B69Y51	11	-	-
B38Y16	11	-	-
B16Y73	9	-	-
B16Y74	9	-	-
B69Y40	11	-	-
B69Y41	11	2	-
B61Y3	4	-	-
B44Y8	11	2	-
B24Y23	6	6	
B38Y14	6	2	-
B38Y15	4	-	-
B44Y9	-	6	7
B25Y24	-	2	-
B52Y11	-	2	-
B69Y49	-	2	-

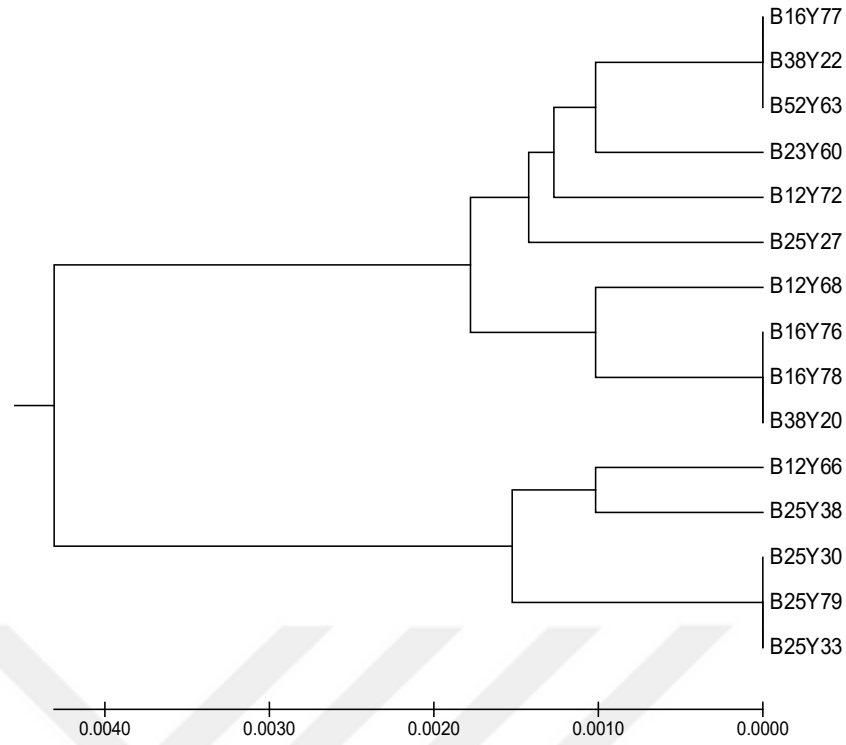
*Tez çalışması KAMAG projesi çerçevesinde yürütülmüş olduğundan ilgili MLST işlemi diğer bir grup tarafından gerçekleştirilmiştir.

L. bulgaricus suşları için MLST tiplendirmesinde ise ilgili veri tabanında yeterli MLST verisi olmadığı için tiplendirme işlemi ilgili gen bölgelerinin sekansları ile oluşturulan filogenetik dendogram ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 25, 26 ve 27' de sırasıyla rpoB, pyrG ve

recA bölgelerinin sekansları ile oluşturulmuş dendogramları göstermektedir. Şekil 25'den de görülebileceği üzere rpoB geni kullanılarak oluşturulan dendogram ile *L. bulgaricus* izolatları 5 farklı gruba ayrılabilmişlerdir. Bu işlem pyrG geni ile gerçekleştirildiğinde ise oluşan dendogram Şekil 26'da verilmiştir. Bu gen ile *L. bulgaricus* izolatları 8 farklı grup şeklinde ortaya çıkmışlardır.

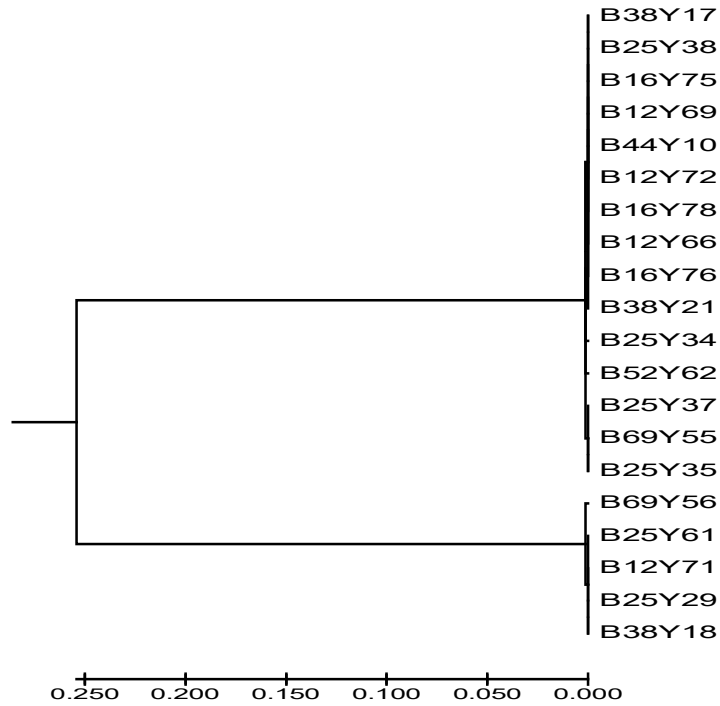


Şekil 23. *L. bulgaricus* suşlarının MLST analiz çerçevesinde rpoB bölgesi baz alınarak UPGMA metodu ile oluşturulan dendogram.



Şekil 24. *L. bulgaricus* suşlarının MLST analiz çerçevesinde *pyrG* Bölgesi baz alınarak UPGMA metodu ile oluşturulan dendrogram.

Her iki gen bölgesi ile oluşturulan dendogramlar önemli düzeyde ayırım sağlarken *recA* geni ile oluşturulan MLST profilinde sadece 2 grup meydana gelmiştir (Şekil 27).



Şekil 25. *L. bulgaricus* suşlarının MLST analiz çerçevesinde *recA* bölgesi baz alınarak UPGMA metodu ile oluşturulan dendrogram.

Sonuç olarak 3 farklı gen bölgesi kullanılarak *L. bulgaricus* izolatlarının MLST profilleri oluşturulmuş ve farklı suşlar ayırt edilebilmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada *L. bulgaricus* türleri Moğolistan, Rusya ve Batı Çin' de üretilen fermente ürünlerden 298 *L. bulgaricus* türü izole edilmiştir. İzole edilen türlerde MLST tekniği kullanılarak alt tür tanımlanması yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında *clpX*, *dnaA*, *groEL*, *murE*, *pheS*, *pyrG*, *recA* ve *rpoB* primerleri kullanılmıştır. Bu primerler ile *L. bulgaricus* türlerinin gen bölgeleri başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir. Bu MLST tekniği ile yapılan tanımlama ile endüstriyel boyutta farklı suşların rekombinant özellikler açısından fayda sağladığı öne sürülmüştür (Song *vd.*, 2016).

S. thermophilus türlerinin alt tür tanımlanmasının yapıldığı bir çalışmada *carB*, *clpX*, *dnaA*, *murC*, *murE*, *pepN*, *pepX*, *pyrG*, *recA*, and *rpoB* primerleri (housekeeping genleri karşılayan) kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında 239 adet *S. thermophilus* türleri, 18 adet referans türleri ve 119 adet tanımlı dizi türleri kullanılmıştır. 10 lokustan 132 polimorfik alan tespit edilmiştir. Primerler ile kontrol edilen *S. thermophilus* suşları ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur ve filogenetik ağaçta *S. thermophilus* izolatların ait 5 soy ağacı belirlenmiştir (Yu *vd.*, 2015).

Diğer bir çalışmada ise *L. casei* suşları belirlemek amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında altı farklı primer ve 40 *L. casei* izolatlarında MLST tekniği geliştirilmiştir. *L. casei* suşlarını belirlemede kullanılan primerlerin (housekeeping genleri karşılayan) allel genleri *pgm* primerinde 1-12 allel gen, *polA* primerinde 1-14 allel gen, *nrdD* primerinde 1-11 allel gen, *metRS* primerinde 1-10, *mutL* primerinde 1-20 ve *ftsZ* primerinde 1-15 allel tipinde olabildiği belirlenmiştir. Çalışma sonunda 36 farklı suş elde edildiği bildirilmiştir (Cai, Rodríguez, Zhang, Broadbent, & Steele, 2007).

L. plantarum türlerinin alt tür tanımlanması için yapılan bir çalışmada *L. plantarum* türleri farklı kaynaklarda izole edilerek alt tür tanımlanmasının yapılması amacıyla MLST tekniği ile ayırım yapılmıştır. Çalışmada 16 adet *L. plantarum* türü *pgm*, *ddl*, *pyrB*, *purK1*, *gdh* ve *mutS* primerleri (housekeeping genleri karşılayan) ile alt tür tanımlanması yapılmıştır. Tanımlamada örneğin, *pgm* primerinde 7 tane 1 allel gen, 8 tane 3 allel gen ve bir tane 2 allel gene sahip suş olduğu belirlenmiştir. Diğer primerlerde de allel genler belirlenerek farklı suşlar belirlenmiştir. *L. plantarum* alt türlerini belirlemede MLST tekniğinin hızlı ve kesin sonuç vermesi oldukça faydalı bir araç olabileceği bildirilmiştir (de las Rivas, Marcobal, & Munoz, 2006).

İzole Edilen Suşların Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşların % laktik asit miktarının belirlenmesi.**

Genotipik ayrımın ardından yoğurt başlatıcı kültürlerinin teknolojik özelliklerinin belirlenmesi sürecinde ilk basamak kültürler tarafından asit üretim yeteneklerinin belirlenmesi olmuştur. İzole edilen 36 *L. bulgaricus* ve 31 *S. thermophilus* suşlarında % laktik asit miktarı hesaplanmıştır. Kültürlerin % laktik asit değerleri Tablo 21’de verilmiştir. *L. bulgaricus* suşlarında % laktik asit değeri en yüksek B69Y55 (%0,6) kodlu suшта ve en düşük % laktik asit değeri ise B25Y30 (0,1) kodlu suшта tespit edilmiştir. *S. thermophilus* suşlarında ise % laktik asit değeri en yüksek B52Y11 (%0,38) kodlu suшта, en düşük % laktik asit değeri en B69Y40 (%0,21) kodlu suшта gözlenmiştir.

Yapılan bir araştırmaya göre Türkiye’nin farklı bölgelerinden (Antalya, Iğdır, Isparta, Konya, Mersin, Sivas ve Urfa) geleneksel yoğurt örnekleri toplanmıştır. Toplanan yoğurt örneklerinin titre edilebilir asitlik değerleri araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre % laktik asit miktarları 0.86-2.32 arasında olduğu belirlenmiştir. Yoğurt örneklerinin % laktik asit miktarları ise 0.96-1.73 arasında olduğu bildirilmiştir (Herdem A, 2006). Diğer bir çalışmada da Batman ilinin farklı köylerinde toplanan yoğurt örneklerinde % asit değerleri en yüksek %1.59 ve en düşük %0.82 olduğu belirlenmiştir (Eren Karahan L, 2016). Bursa ilinde ise yoğurt üretimi yapan 20 farklı firmadan toplanan yoğurt örneklerinde % asit değerleri araştırılmıştır. Araştırmaya göre % asitlik değeri %0.89-1.89 arasında tespit edilmiştir (Tayar, Anar, & Şen, 1993).

Tablo 21. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* Türlerinde % Laktik Asit Miktarı

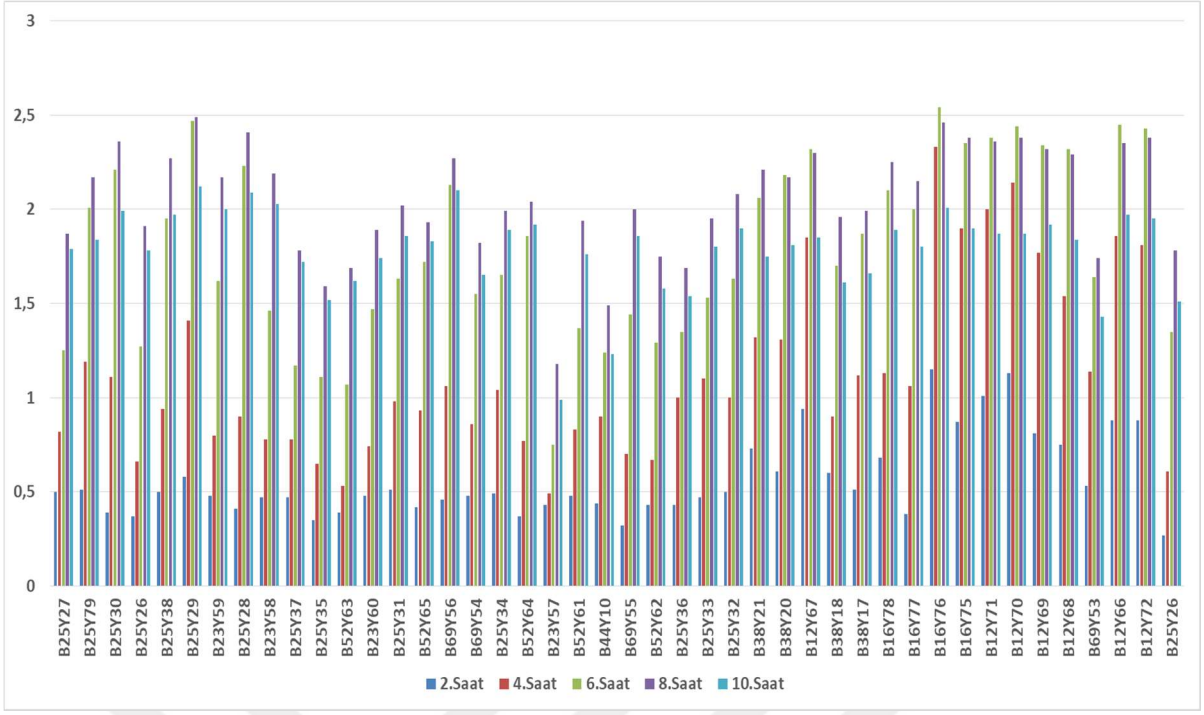
<i>L. bulgaricus</i> (% Laktik Asit)		<i>S. thermophilus</i> (% Laktik Asit)	
B25Y34	0,46±0,05	B44Y9	0,32±0,01
B25Y79	0,29±0,02	B52Y11	0,38±0,02
B12Y71	0,52±0,06	B38Y14	0,32±0,02
B16Y78	0,50±0,05	B24Y23	0,29±0,01
B25Y30	0,10±0,01	B69Y49	0,35±0,02
B25Y38	0,29±0,01	B44Y8	0,31±0,05
B12Y70	0,44±0,03	B38Y16	0,33±0,05
B12Y68	0,52±0,05	B69Y45	0,28±0,02
B38Y21	0,27±0,01	B61Y7	0,25±0,03
B25Y33	0,57±0,04	B61Y1	0,30±0,03
B38Y22	0,34±0,02	B25Y24	0,27±0,01
B69Y54	0,56±0,03	B69Y52	0,25±0,01
B12Y72	0,30±0,03	B69Y39	0,32±0,02
B44Y10	0,41±0,02	B61Y6	0,32±0,02
B16Y75	0,56±0,03	B16Y73	0,29±0,03
B25Y28	0,55±0,03	B69Y40	0,21±0,03
B25Y37	0,35±0,03	B61Y5	0,27±0,01
B25Y29	0,54±0,06	B69S44	0,33±0,01
B52Y65	0,32±0,02	B69Y48	0,34±0,01
B38Y17	0,48±0,03	B69Y43	0,37±0,03
B69Y55	0,60±0,03	B61Y2	0,27±0,03
B23Y58	0,32±0,02	B69Y46	0,33±0,04
B12Y66	0,44±0,03	B52S12	0,32±0,02
B16Y77	0,48±0,08	B52Y13	0,27±0,01
B25Y35	0,43±0,07	B38Y15	0,37±0,03
B52Y61	0,47±0,07	B16Y74	0,27±0,02
B52Y64	0,49±0,03	B61Y4	0,32±0,02
B25Y26	0,44±0,03	B69Y50	0,34±0,02
B25Y36	0,43±0,01	B25S25	0,38±0,02
B16Y76	0,25±0,01	B61Y3	0,26±0,01
B23Y59	0,49±0,01	B69Y41	0,34±0,05
B12Y69	0,46±0,01		
B23Y57	0,51±0,04		
B25Y32	0,36±0,02		
B38Y18	0,35±0,04		
B69Y56	0,29±0,02		
B38Y20	0,45±0,02		

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* türlerine ait suşların pH geliştirme özelliklerinin belirlenmesi.**

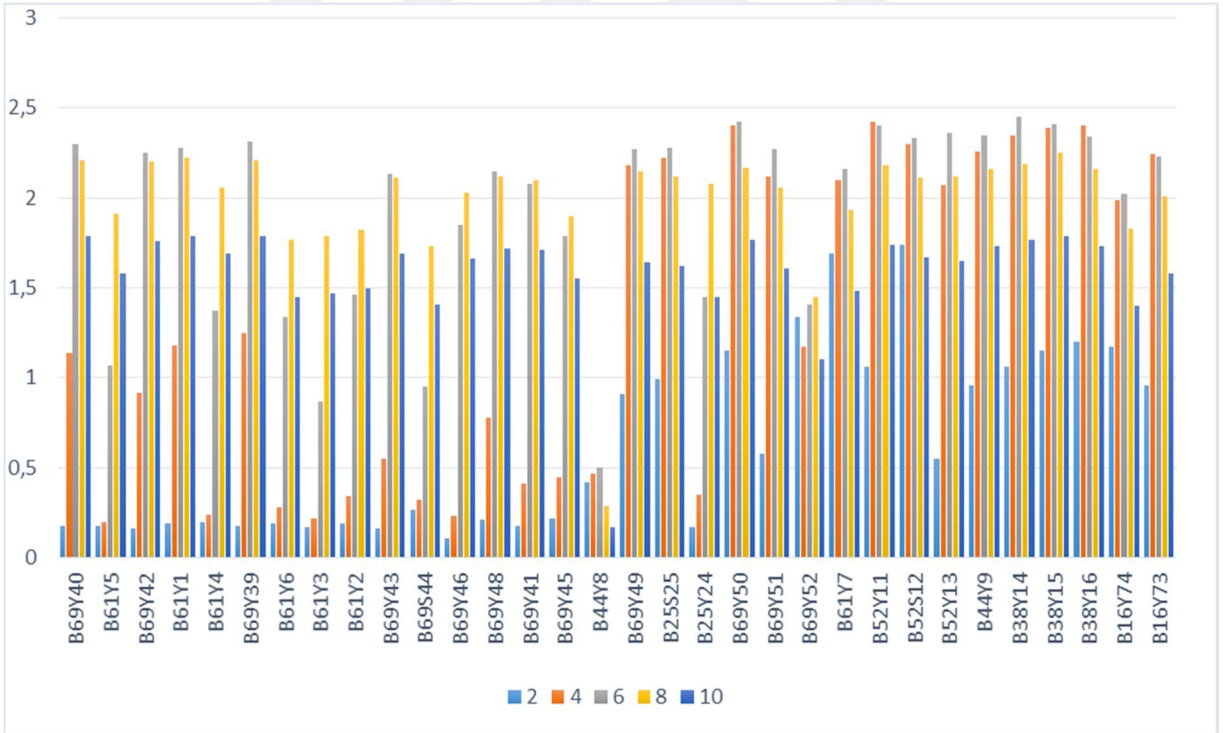
Geleneksel yoğurtlardan izole edilen 44 *L. bulgaricus* ve 31 *S. thermophilus* türlerinde pH geliştirmeyi belirlemek için suşların pH değerleri iki saat aralıklarla 10 saat boyunca ölçüm alınmıştır. Ölçüm sonuçları Şekil 28 ve 29’ da verilmiştir. *L. bulgaricus* suşları 6. saate kadar Δ pH değerinde artış görülmektedir. 6.saatten sonra ise Δ pH değeri azalmaya başlamıştır. Sırasıyla 2. saat, 4. saat, 6. saatlerinde Δ pH değeri en yüksek B16Y76 kodlu *L. bulgaricus* suşu olarak belirlenmiştir ve saatlere göre sırasıyla Δ pH değeri 1.15, 2.33 ve 2.54 olarak ölçülmüştür. 8.saat ve 10.saatlerinde ise Δ pH değeri en yüksek B25Y29 kodlu *L. bulgaricus* suşu olarak belirlenmiş ve saatlere göre sırasıyla Δ pH değeri 2.49 ve 2.12 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *L. bulgaricus* suşlarının en düşük Δ pH değerleri 2.saat, 4.saat, 6.saat 8.saat ve 10.saatte sırasıyla B25Y26 (0,27), B23Y57 (0,49), B23Y57 (0,75), B23Y57 (1,18) ve B23Y57 (0,99) olarak ölçülmüştür. *S. thermophilus* suşlarında ise 4. saate kadar Δ pH değerinde artış görülmektedir. 4.saatten sonra ise Δ pH değeri azalmaya başlamıştır. 2. saat, 4. saat, 6. saat, 8. saat ve 10. saat *S. thermophilus* suşlarında en yüksek Δ pH değeri sırasıyla B52S12 (1,74), B12Y11 (2,42), B69Y50 (2,42), B69Y40 (2,21) ve B69Y40 (1,79) olarak ölçülmüştür. Bunun yanı sıra 2.saat, 4.saat, 6.saat, 8.saat ve 10.saat *S. thermophilus* suşlarında en düşük Δ pH değeri sırasıyla B69Y42 (0,16), B69Y41 (0,41), B44Y8 (0,5), B69S44 (1,73) ve B16Y74 (1,40) olarak ölçülmüştür. Bulunan Δ pH değerleri literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında kültürlerin pH geliştirme yeteneklerinin yüksek olması oldukça önemlidir.

Yapılan araştırmaya göre *S. thermophilus* suşlarının *L. bulgaricus* suşlarından pH açısından daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *S. thermophilus* suşlarında pH 4.2-4.4 aralığında gelişimin yavaşladığı fakat *L. bulgaricus* suşları pH 3.5-3.8 seviyesine kadar asitliğe karşı tolerans gösterdiği belirlenmiştir (Lourens-Hattingh, & Viljoen, 2001).

Yapılan başka bir çalışmada ise yerli ve ticari *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının Δ pH değerleri araştırılmıştır. Kültürler pastörize yağsız süt içerisinde 42°C’de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. 5 saat inkübasyon sonunda yerli *S. thermophilus* suşlarında Δ pH değerlerinden bazılarının 1.00, 0.95, 0.90 olduğu belirlenmiştir. Ticari *S. thermophilus* suşlarında Δ pH değerleri ise 0.95-1.50 arasında olduğu belirlenmiştir. Ticari *L. bulgaricus* suşlarında Δ pH değerleri 1,0-1.51 arasında olduğu tespit edilirken yerli *L. bulgaricus* suşlarında Δ pH değerlerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir. *L. bulgaricus* suşlarında Δ pH değerlerinden 0.90 ve 0.80 en iyi değerleridir (Ayhan, Durlu-Özkaya, & Tunail, 2005).



Şekil 26. 44 *L. bulgaricus* türlerinde pH değerleri.



Şekil 27. 31 *S. thermophilus* türlerinde pH değerleri

Yapılan diğerk bir çalışmada pastörize inek sütünė *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşları inoküle edilmiştir. 42°C’de 4 saat inkübasyona bırakılan suşlar inkübasyon sonunda pH değerleri ölçölmüştür. *L. bulgaricus* suşlarının pH değeri 5.80, 4.75 ve 4.45 olarak bulunmuştur. *S. thermophilus* suşlarının pH değeri 4.57, 4.55 ve 4.69 olarak bulunmuştur (Abu-Tarboush, 1996).

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi.**

Geleneksel yoğurt örneklerinden izole edilen yoğurt başlatıcı költürlerinin proteolitik aktivitesi toplam amino asit konsantrasyonu tespitinde oldukça verimli sonuçlar elde edilen OPA metodu ile gerçekleştirilmiştir (Weimer, Oberg, Moyes, Brown, & Richardson, 1989). Bu çalışmada ise izole edilen 35 *L. bulgaricus* ve 25 *S. thermophilus* türlerin proteolitik aktiviteleri Tablo 22’de verilmiştir. Çalışmaya göre *L. bulgaricus* suşlarında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip suş B25Y28 olarak belirlenmiştir. B25Y28 suşunun OD₃₄₀ serbest amimo asit miktarı 0.547 olarak bulunmuştur. *L. bulgaricus* suşlarında en düşük proteolitik aktiviteye sahip suş B25Y30 olarak belirlenmiştir. B25Y30 suşunun OD₃₄₀ serbest amimo asit miktarı 0.078 olarak bulunmuştur. *S. thermophilus* suşlarında en yüksek proteolitik aktiviteye sahip suş B69Y40 olarak belirlenmiş ve OD₃₄₀ serbest amimo asit miktarı 0.172 olarak belirlenmiştir. Diğer *S. thermophilus* suşları ise 0,084-0,001 arasında bulunmuştur.

Tablo 22. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* Türlerin Proteolitik Aktiviteleri

<i>S.thermophilus</i>		<i>L. bulgaricus</i>	
Örnek Kodu	OD ₃₄₀ serbest amimo asit miktarları	Örnek Kodu	OD ₃₄₀ serbest amimo asit miktarları
B61Y1	-	B38Y17	0,428±0,05
B61Y2	0,084±0,01	B38Y18	0,345±0,03
B61Y3	0,072±0,01	B38Y20	0,395±0,01
B61Y4	-	B38Y21	0,458±0,03
B44Y8	-	B38Y22	0,514±0,05
B44Y9	-	B25Y26	0,322±0,05
B52Y11	-	B25Y28	0,547±0,08
B52S12	-	B25Y30	0,078±0,01
B52Y13	-	B25Y32	0,175±0,01
B38Y14	-	B25Y33	0,282±0,01
B38Y15	0,064±0,01	B25Y34	0,243±0,02
B38Y16	-	B25Y35	0,317±0,05
B24Y23	0,044±0,01	B25Y36	0,282±0,03
B69Y39	-	B25Y37	0,312±0,01
B69Y40	0,172±0,01	B25Y38	0,332±0,01
B69Y41	-	B69Y53	0,269±0,01
B69Y42	-	B69Y55	0,389±0,04
B69S44	-	B69Y56	0,096±0,01
B69Y45	-	B23Y58	0,311±0,01
B69Y46	-	B23Y59	0,337±0,01
B69Y48	-	B23Y60	0,144±0,01
B69Y49	0,032±0,01	B52Y61	0,247±0,01
B69Y50	-	B52Y64	0,323±0,02
B16Y73	-	B52Y65	0,406±0,03
B16Y74	0,042±0,01	B12Y66	0,468±0,05
		B12Y67	0,299±0,02
		B12Y68	0,446±0,03
		B12Y69	0,26±0,01
		B12Y70	0,312±0,02
		B12Y71	0,299±0,01
		B12Y72	0,238±0,01
		B16Y75	0,38±0,02
		B16Y76	0,431±0,03
		B16Y77	0,452±0,03
		B16Y78	0,332±0,02

Yapılan bir araştırmada *L. bulgaricus* suşlarında proteolitik aktivite OPA metodu kullanılarak 0.saatten başlayıp 2 saat aralıklarla 12 saat boyunca ölçülmüştür. Araştırmaya göre *L. bulgaricus* suşlarında proteolitik aktivite 12 saate kadar artış göstermektedir ve bir tane *L. bulgaricus* suşu en yüksek proteolitik aktivitesinin 0.363 olarak belirlenmiştir (Hou vd. , 2015).

Shihata, & Shah (2000) yapmış olduğu çalışmada 6 *S. thermophilus* suşu, 5 *Lb. bulgaricus* suşu, 12 *L. asidophilus* suşu ve 3 *Bifidobakterium* spp. suşlarında 6 saat inkübasyon uygulanarak OPA metodu ile proteolitik aktiviteleri araştırılmış ve absorbans değerleri 340nm de ölçülmüştür. Araştırmaya göre *S. thermophilus* suşları 0.10-0.30 arasında olduğu, *L. bulgaricus* suşları 0.10-0.20 arasında olduğu, *L. asidophilus* suşları 0.05-0.20 ve *Bifidobakterium* spp. suşları 0.01-0.20 arasında olduğu belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada ise *L. bulgaricus* suşları ve *S. thermophilus* suşlarının proteolitik aktivitesi araştırılmıştır. Araştırmaya göre *S. thermophilus* suşlarında -5, -2, ve 18 nmol·g⁻¹ for 10⁷ UFC·mL⁻¹ sonuçları elde edilmiştir. *L. bulgaricus* suşlarında 153, 263, 18 ve -2 nmol·g⁻¹ for 10⁷ UFC·mL⁻¹ sonuçları elde edilmiştir (Courtin, & Rul, 2004).

Diğer bir çalışmada ise *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarının proteolitik aktiviteleri 2 mL⁻¹ 'de tirozin (mg) miktarları araştırılmıştır. Araştırmaya göre geleneksel yoğurtlardan izole edilen *L. bulgaricus* türlerinin proteolitik aktivitesi en zayıf 0.33-0.47 mg tirozin eşdeğerini olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte *L. bulgaricus* türlerinin proteolitik aktivitesi en yüksek 0.64-0.86 mg tirozin eşdeğerini olarak belirlenmiştir. *S. thermophilus* türlerinde ise proteolitik aktivitesi en yüksek yaklaşık değerini 0.24-0.30 mg tirozin eşdeğerini olarak belirlenmiştir (Ayhan vd. , 2005).

***L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşların faj dirençliliğinin belirlenmesi.**

Yoğurt başlatıcı kùltürlerinin teknolojik özellikleri açısından en önemli niteliklerinden birisi olan faj dirençliliği geleneksel yoğurt izolatları açısından test edilmiştir. Bu kapsamda *S. thermophilus* fajı olarak sırasıyla ΦB3S10, Φ7095-53, Φ46.1, Φ1B-3A ve Φ231-50 kullanılırken, *L. bulgaricus* faj olarakta sırasıyla Φ231LP8, Φ231LP24, ΦLPAA, ΦX19 ve ΦVILA kullanılmıştır (şekil 30). Bu fajlar üzerinde sùt ve yoğurt izolatu olan 67 adet *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşları ile karşılaştırma yapılmıştır. *L. bulgaricus* suşlarında Φ231L-P8, Φ 231LP-24, ΦLbA-A, ΦV1-X19 ve ΦV1L-A fajlarına karşı sırasıyla %50, %54, %37, %48 ve %29 'luk bir dirençlilik tespit edilmiştir. İzole edilen 36 adet *S. thermophilus* suşunda ise, ΦB3S-10, Φ709-X3, Φ231-X23, Φ1B3A ve Φ231-X7 fajlarına karşı sırasıyla %16, %19,%16, %25 ve %19 dirençlilik gözlemlenmiştir.



Şekil 28. İzolataların fajlara karşı dirençli(B) ve duyarlı(A) olduklarını gösteren petri.

Yoğurta başlangıç kültür olarak kullanılan *S. thermophilus*'un faj enfeksiyonları endüstride büyük ölçüde sorun oluşturduğu bilinmektedir. Bu kapsamda 1998-2000 yılları arasında Arjantin yoğurt fabrikasında sorun (asitlendirme) oluşturan partiden 11 litik faj izole ederek muhtemel konakçısı olabilecek *S. thermophilus* suşları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda 4,5 ve Sth10 suşları $\Phi 1$ ve $\Phi 2$ 'ye karşı hassasiyet göstererek faj varlığında canlılığı kaybetmiştir. Ac1 suşu ise $\Phi 1$ de gelişim göstererek dirençli olmuştur. Bu durumda aynı yerden izole edilen suşları dirençliliği ya da konakçısı olma durumu fajın çeşidine göre değişkenlik göstermektedir (A Quiberoni vd. , 2003). Yapılan tez çalışmasında ise, B61Y3, B61Y4, B61Y5, B61Y6, B69Y48 ve B69S44 suşları sırasıyla *S. thermophilus* fajlarına ($\Phi B3S-10$, $\Phi 709-X3$, $\Phi 231-X23$, $\Phi 1B3A$ ve $\Phi 231-X7$) karşı direnç gösterirken, B69Y50, B69Y45, B69Y43, B69Y42, B69Y41, B69Y40, B25Y24, B38Y16, B38Y14, B52Y13, B52Y11, B44Y9, B44Y8 VE B61Y1 suşları ise bu 5 faja karşı direnç göstermemiştir (Tablo 24). *L. bulgaricus* suşlarının 5 farklı bakteriyofaja karşı dirençliliği araştırılmıştır ve araştırma sonuçları Tablo 23'de verilmiştir. Araştırmaya göre B69Y53, B69Y54, B23Y57, B52Y61, B25Y27, B25Y31, B25Y32, B25Y34, B25Y35, B38Y17 suşları 5 faja karşı direnç göstermiştir. B16Y77, B16Y78, B12Y68, B25Y26, B38Y21, B23Y59 ve B52Y63 suşları ise 5 faja karşı direnç göstermemiştir.

Bazı suşların reseptörlerindeki bazı modifikasyonlarla virülant fajlara uzun süre hayatta kalabilme durumu söz konusu olabilmekte ve bu durumda suşa bağımlılık göstermektedir (Andrea Quiberoni, Moineau, Rousseau, Reinheimer, & Ackermann, 2010). Yapılan bir çalışmada 14 tane *S. thermophilus* suşu $\Phi COQ210$ ve $\Phi FcSth10$ fajlarına karşı %78 direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir (Binetti, Del Río, Martín, & Alvarez, 2005). Yapılan bu çalışmada ise test edilen *S. thermophilus* suşu $\Phi 1B3A$ fajına karşı %25 direnç göstererek yapılan çalışmadan düşük düşük çıkmıştır.

Tablo 23. *L. bulgaricus* Suşlarının Bakteriyofaj Dirençliliği

Bakteri Kodları	Bakteriyofaj Kodları				
	Φ231LP8	Φ231LP24	ΦLPAA	ΦX19	ΦVILA
B16Y75	-	-	+	*	*
B16Y76	*	-	-	-	*
B16Y77	+	+	+	+	+
B16Y78	+	+	+	+	+
B69Y53	-	-	-	-	-
B69Y54	-	-	-	-	-
B69Y55	*	+	-	+	*
B69Y56	+	-	*	*	*
B23Y57	-	-	-	-	-
B23Y59	+	+	+	+	+
B52Y61	-	-	-	-	-
B52Y62	+	+	+	-	+
B52Y63	+	+	+	+	+
B52Y64	-	-	+	+	*
B52Y65	*	*	*	*	*
B12Y66	+	-	-	+	+
B12Y68	+	+	+	+	+
B12Y70	*	*	-	-	*
B12Y71	-	-	+	-	*
B12Y72	+	*	+	*	+
B25Y26	+	+	+	+	+
B25Y27	-	-	-	-	-
B25Y28	-	-	+	-	-
B25Y29	+	+	*	*	+
B25Y30	*	*	*	*	*
B25Y31	-	-	-	-	-
B25Y32	-	-	-	-	-
B25Y33	*	*	*	*	*
B25Y34	-	-	-	-	-
B25Y35	-	-	-	-	-
B25Y37	*	*	+	+	+
B25Y38	+	-	+	-	+
B38Y17	-	-	-	-	-
B38Y18	-	-	+	-	+
B38Y21	+	+	+	+	+
B38Y22	+	+	+	-	*

(-) Bakteri bakteriyofaja karşı dirençli.

(+)Bakteri bakteriyofaja karşı direnç göstermedi.

(*) Bakteriyofaj bakteri ile sürekli olarak muamele edilirse starter kültür olarak kullanılamaz.

Diğer bir çalışmada ise Finlandiya’ da peynir üretiminin gerçekleştirdiği işletmelerde sorun oluşturan 9 adet *S. thermophilus* fajlarının homolog ve heterolog konakçılarında plak oluşturma etkinlikleri araştırılmıştır. Araştırmaya göre, çalışmada kullanılan Φ FK10 ile Φ FK₇₄ fajları heterolog konakçılarda daha yüksek plak etkinliği gösterildiği belirlenmiştir(Kivi, Peltomäki, Luomala, & Sarimo, 1987).

Tablo 24. *S. thermophilus* Suşlarının Bakteriyofaj Dirençliliği

Bakteri Kodları	Bakteriyofaj kodları				
	Φ B3S10	Φ 7095-53	Φ 46.1	Φ 1B3A	Φ 231-50
B61Y1	+	+	+	+	+
B61Y2	*	*	-	-	+
B61Y3	-	-	-	-	-
B61Y4	-	-	-	-	-
B61Y5	-	-	-	-	-
B61Y6	-	-	-	-	-
B61Y7	*	+	+	*	*
B44Y8	+	+	+	+	+
B44Y9	+	+	+	+	+
B52Y11	+	+	+	+	+
B52Y13	+	+	+	+	+
B38Y14	+	+	+	+	+
B38Y16	+	+	+	+	+
B24Y23	+	+	+	-	*
B25Y24	+	+	+	+	+
B69Y39	+	+	+	+	*
B69Y40	+	+	+	+	+
B69Y41	+	+	+	+	+
B69Y42	+	+	+	+	+
B69Y43	+	+	+	+	+
B69S44	-	-	-	-	-
B69Y45	+	+	+	+	+
B69Y46	+	-	+	+	+
B69Y48	-	-	-	-	-
B69Y49	+	*	*	+	*
B69Y50	+	+	+	+	+
B38Y15	*	-	*	*	-
B16Y73	*	*	*	*	*
B16Y74	*	*	*	+	*
B69Y52	*	*	+	-	*

(-) Bakteri bakteriyofaja karşı dirençli.

(+)Bakteri bakteriyofaja karşı direnç göstermedi.

(*) Bakteriyofaj bakterisi ile sürekli olarak muamele edilirse starter kültür olarak kullanılamaz.

Suşların fenol-sülfirik asit Testi ile EPS üretim miktarının belirlenmesi.

Tez kapsamında incelenen *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* izolatları modifiye BHI ortamında 37 °C geliştirilerek EPS üretim yeteneği test edilmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 25’de verilmiştir. Yapılan birçok çalışmada karbon kaynağı olarak farklı şeker grupları kullanılmaktadır. Fakat tez kapsamında yoğurt bakterileri (*L. bulgaricus* ve *S.thermophilus*) üzerinde durulduğu için karbon kaynağı olarak laktoz kullanılmıştır. Bu sayede yoğurtta fermantasyonu başlatan starter kültürlerin laktozu kullanarak EPS üretmesi sağlanmıştır. Genel itibariyle test edilen *L. bulgaricus* suşlarında en yüksek EPS üretimi B12Y71 (yoğurt kaynaklı izolat) suşu ile 859 µg/10⁷ kob olarak belirlenirken, en düşük üretimi B38Y18 (yoğurt kaynaklı izolat) suşu ile 73 µg/10⁷ kob olduğu tespit edilmiştir. *S. thermophilus* suşlarındaki en yüksek EPS eldesi 575 µg/10⁷ kob ile B38Y14 (yoğurt kaynaklı izolat) suşu tespit edilirken, en düşük EPS eldesi 9 µg/10⁷ kob ile B38Y16 (yoğurt kaynaklı izolat) suşunda gerçekleşmiştir.

Yapılan bir çalışmada Şentürk, Dertli, Erten, & Şimşek (2020) araştırma kapsamında kullanılan tarhana izolatları Pamukkale üniversitesi kültür koleksiyonunda temin edilmiştir. Test edilen suşlarda 18 tane LAB suşu EPS üreticisi olarak seçilmiş ve bu suşlar GTG5 primeri kullanarak moleküler yöntemlerle ayırt edilmiştir. Daha sonra bu suşların farklı koşullarda EPS üretimini incelemişlerdir. EPS üretimi için; inkübasyon sıcaklığını 20°C, 30 °C ve 37 °C, karbon kaynağını sükroz, maltoz, laktoz ve fruktoz, pH 4-5-6-7 ve inkübasyon süresini de 24-36-48h arasında değiştirerek *L. plantarum* suşlarındaki EPS üretimlerinde nasıl bir değişim olduğunu araştırmışlardır. Çalışma sonunda fermente üründen izole edilen LAB türü olan *L. plantarum* suşlarında 37 °C’ de EPS üretimi 0-250 µg/mL, karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında 500-1100 µg/mL, pH 7’de 20-700 µg/mL arasında bulunurken, 24 h sonra 100-1200 µg/mL arasında EPS üretimi gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise, *S.thermophilus* suşları laktozlu ortamda pH 7’de 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda EPS üretimi *S. thermophilus* suşlarında 73-859 µg/10⁷ kob arasında bulunurken, *L. bulgaricus* suşlarında 9-575 µg/10⁷ kob arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere EPS üretimi yapılırken geliştirilen ortamın bileşiminin ve inkübasyon şartlarının kritik öneme sahip olduğu tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada ise, Bayburt ‘tan geleneksel ev tipi yoğurtlar toplanarak analize tabi tutulmuştur. İçlerinde *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*’un da bulunduğu toplam 21 tane LAB suşu izole edilmiştir. Çalışma sonunda izole edilen *L. bulgaricus* Y39 suşunda 1200 µg/10⁷ kob tespit edilirken, *S. thermophilus* Y102 suşunda 900 µg/10⁷ kob tespit edilmiştir (İspirli, & Dertli, 2018). Yapılan bu çalışmada ise, EPS üretimi *S. thermophilus* suşlarında 73-859 µg/10⁷ kob arasında bulunurken, *L. bulgaricus* suşlarında 9-575 µg/10⁷ kob arasında tespit edilmiştir.

Ispirli, & Dertli (2017) yaptıkları çalışmada geleneksel 4 farklı kırmızı etten dört farklı LAB türü izole edilmiştir. Çalışma kapsamında tanımladığı suşlardan EPS üretimi gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonucunda *L. fermentum* suşlarında EPS üretimi 250-1900 µg/10⁷ kob arasında tespit edilmiştir. Bu tez çerçevesinde incelenen *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarında ise, 9- 859 µg/10⁷ arasında olduğu belirlenmiştir.

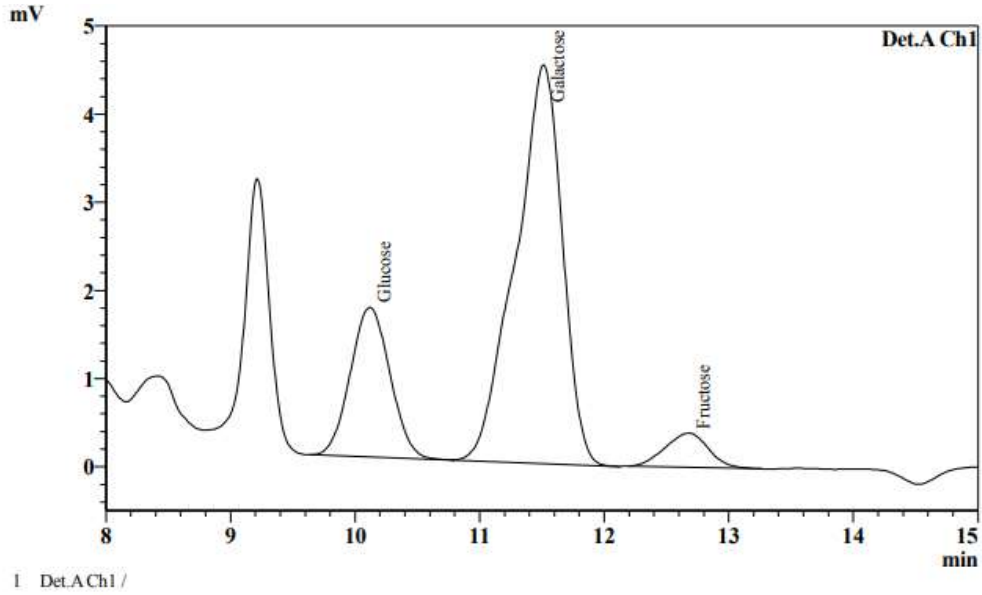
Tablo 25. Suşların Fenol-Sülfirik Asit Testi ile EPS Üretim Miktarı

<i>L. bulgaricus</i>		<i>S. thermophilus</i>	
Örnek Kodu	EPS Üretim Miktarı (µg/10 ⁷ kob)	Örnek Kodu	EPS Üretim Miktarı (µg/10 ⁷ kob)
B25Y33	402,0000±5,3	B61Y5	241,71±3,5
B25Y32	129,3529±7,2	B69Y41	260,24±5,6
B52Y65	147,59±5,2	B69Y42	50,82±2,7
B25Y36	154,35±4,3	B69Y45	34,65±2,3
B12Y67	86,12±6,7	B52Y11	149,65±4,9
B38Y18	73,47±5,4	B61Y7	41,71±3,2
B25Y35	265,8235±4,5	B38Y16	9,35±4,6
B52Y64	789,0588±8,2	B61Y4	109,94±4,7
B25Y79	79,35±6,2	B44Y9	27,59±2,5
B25Y26	489,9412±7,2	B69Y50	399,94±5,2
B69Y55	208,1765±5,7	B69Y48	124,94±5,2
B12Y66	95,82±7,3	B61Y2	133,18±4,7
B12Y68	787,2941±7,5	B61Y6	78,47±3,3
B25Y38	265,53±4,8	B69Y39	175,24±5,6
B38Y22	476,4118±6,5	B24Y23	160,24±5,4
B25Y28	251,1176±4,8	B61Y3	76,71±3,5
B16Y77	187,2941±4,5	B25S25	129,35±5,4
B25Y34	233,18±5,1	B69Y40	92,88±4,6
B12Y70	140,24±4,2	B16Y74	143,47±5,3
B16Y78	530,8235±6,5	B69Y43	199,94±5,6
B38Y20	339,0588±5,6	B69Y52	505,53±6,2
B69Y54	83,47059±2,8	B25Y24	209,06±5,7
B12Y69	311,7059±5,1	B69Y41	83,18±3,2
B38Y17	829,3529±6,3	B44Y8	256,12±5,5
B16Y75	744,9412±5,7	B61Y4	48,18±2,4
B12Y71	859,6471±8,3	B61Y1	98,76±3,8
B69Y56	603,7647±7,5	B38Y14	575,88±6,9
B44Y10	282,59±3,6	B16Y73	172,29±5,2
B38Y15	335,53±4,7		
B25Y37	424,9412±6,4		
B52Y61	535,5294±7,1		
B38Y21	383,1765±5,6		

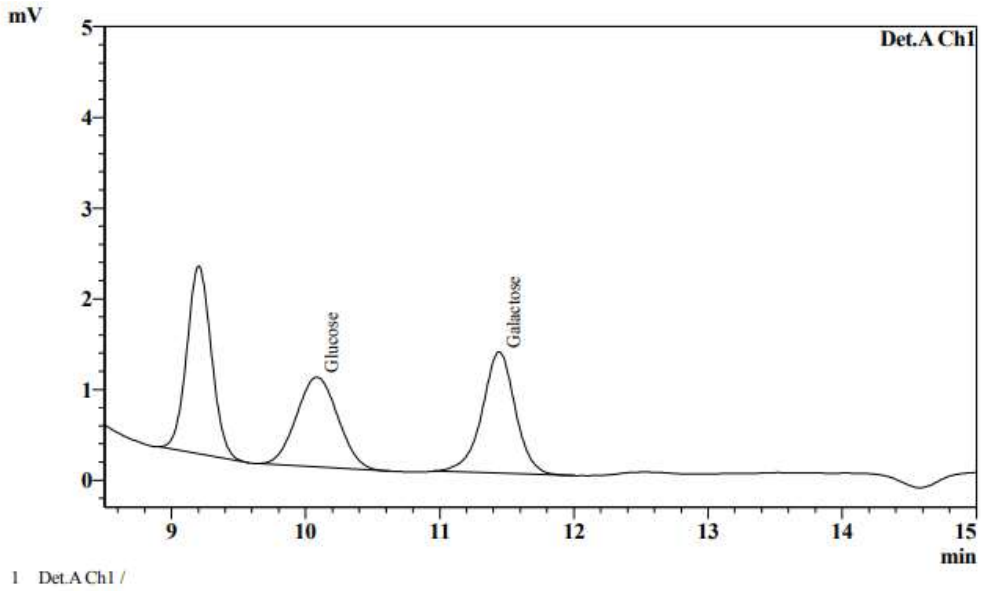
Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi.

Modifiye Laktozlu BHI ortamında geliştirilen izolatların EPS üretiminden sorumlu şeker gruplarını tespit etmek için HPLC işlemi uygulanmıştır. Çalışma sonunda test edilen *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarında şeker monomerlerinin oransal açıdan ve şeker

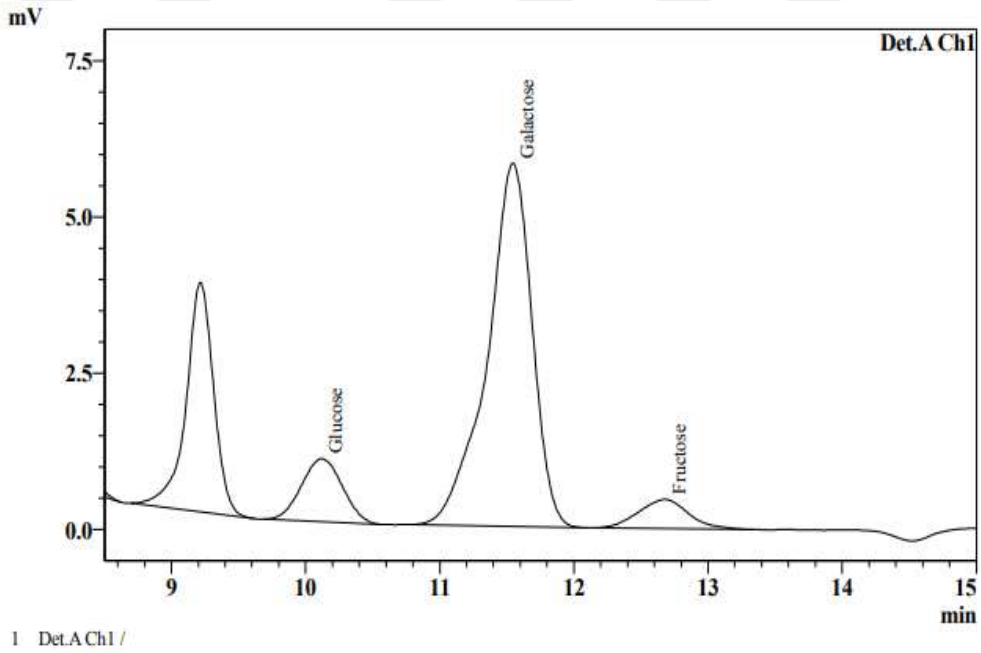
ünitelerini oluşturan birimler açısından farklılık gösterdiği ve temel olarak glukoz ve galaktozdan oluştuğu tespit edilirken, bazılarında fruktozunda yapıda yer alabildiği ortaya konmuştur. Örneğin test edilen suşlardan *L. bulgaricus* B12Y68 suşunun EPS yapısında glukoz, galaktoz ve fruktozun alıkonma sürelerini sırasıyla (10.115, 11.541 ve 12.673) dk tespit edilmiştir. Suşlarda glukoz, galaktoz ve fruktozun alıkonma süreleri sırasıyla (10.113, 11.509, 12.675) dk olmak üzere suşlarda monosakkaritler belirlenmiştir. *S. thermophilus* B61Y5 suşunda ise EPS'nin glukoz ve galaktoz birimlerinden oluştuğu alıkonma süreleri sırasıyla 10.079 dk ve 11.438 dk'da çıkan piklerden tespit edilmiştir. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* araştırılan suşların HPLC kromatogramları Şekil 31-33'de verilmiştir. Genel itibariyle izolatlarda yer alan şeker üniteleri Tablo 26'da verilmiştir. Suşların EPS monosakkarit kompozisyonları ise Şekil 31-33 arasında verilmiştir.



Şekil 29. *L. bulgaricus* B16Y75 suşunun ürettiği EPS'in HPLC kromatogramı.



Şekil 30. *S. thermophilus* B61Y5 suşunun ürettiği EPS'in HPLC kromatogramı.



Şekil 31. *L. bulgaricus* B12Y68 suşunun ürettiği EPS'in HPLC kromatogramı.

Şentürk vd. (2020), tarhanadan izole ettiği *L. plantarum* suşlarının EPS üretiminde sorumlu şeker gruplarının incelediği çalışmada, HPLC analizleri sonucunda *L. plantarum* PFC309, PFC310, PFC312 ve PFC313 suşlarının glukoz ve galaktoz üniterlerinden meydana geldiğini tespit ederken, *L. plantarum* PFC308 ve PFC311 glukoz ve galaktozun yanısıra fruktozda ürettiğini HPLC metodu ile tespit etmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, bütün *S.thermophilus* suşlarında glukoz ve galaktoz tespit edilmişken bazı suşlarda ise (B38Y15, B61Y4 ve B25Y24) glukoz ve galaktozdan başka fruktoz monomerine de tespit edilmiştir. Ayrıca bu durum *L. bulgaricus* suşları içinde geçerli olmaktadır.

Petry, Furlan, Crepeau, Cerning, & Desmazeaud (2000) yaptığı çalışmada ise, geleneksel ev tipi yoğurtlatıdan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* izole etmiş ve bu suşların ürettiği EPSlerin yapısal karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışma sonunda EPS'lerin yapısal analizi sonucunda *L. bulgaricus* Y39 ve *S. thermophilus* Y102 'nin glukoz ve galaktoz içeren heteropolimerik EPS ürettiğini saptamışlardır. Yapılan tez çalışmasında ise, test edilen tüm suşların glukoz ve galaktoz ürettiğini tespit etmenin yanı sıra bazı suşların glukoz, galaktoz ve fruktoz üretmesi dikkat çekmektedir. Bu durumun tam olarak aydınlatılması adına ilerleyen çalışmalarda belirlenen suşların NMR spektroskopisinde incelenmesi düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, Yunan fermente süt ürününden izole edilen *L. bulgaricus* CNRZ 1187 suşu ve Fransa 'da dondurularak kurutulmuş kültür koleksiyonundan EPS üreten *L. bulgaricus* CNRZ 416 suşu kullanılarak monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonunda laktoz ilaveli süt ortamında *L. bulgaricus* CNRZ1187 suşunun EPS kompozisyonunda galaktoz, glukoz ve mannozun varlığı tespit edilmiştir. CNRZ suşunda ise bunlara ilaveten ramnoz da tespit edilmiştir (Petry vd. , 2000)Yapılan çalışma sonunda ise, *L. bulgaricus* suşlarında şeker grupları olarak glukoz, galaktoz ve fruktoz tespit edilmiştir.

Grobber vd. (1995), yaptığı çalışmada *L. bulgaricus* NCFB2772 suşunu laktozlu ortamda inkübasyona bırakarak hücre dışı polisakkarit üretmiştir. Analiz sonucunda hücre dışı polisakkarit kimyasal olarak tanımlandığında şeker gruplarında glikoz, galaktoz ve ramnozun varlığını rapor etmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, *L. bulgaricus* suşlarının glikoz galaktoz ve fruktoz monomerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Genel olarak yapılan çalışmalarda glukoz ve galaktoz ortak şeker grubu olarak görülürken, diğer şeker grupları değişkenlik göstermektedir. Glikoz ve galaktoz birimlerinin açığa çıkması, yoğurt bakterilerinin ürettiği β -galaktozidaz enziminin süt ortamında bulunan laktozun (süt şekeri)glukoz ve galaktoza parçalanmasıyla açıklanabilmektedir. Bu öngörüğü desteklemek için ilerleyen aşamalarda tez kapsamında incelenen izolatların β -galaktozidaz aktivitesinin araştırılması hedeflenmektedir.

Tablo 26. EPS'lerin Monosakkarit Kompozisyonunun Belirlenmesi

<i>L. bulgaricus</i>				<i>S. thermophilus</i>			
Bakteri Kodu	Glukoz	Galaktoz	Fruktoz	Bakteri Kodu	Glukoz	Galaktoz	Fruktoz
B12Y66	+	+	+	B16Y73	+	+	-
B25Y38	+	+	-	B24Y23	+	+	-
B12Y68	+	+	+	B69Y48	+	+	-
B12Y69	+	+	+	B38Y15	+	+	+
B12Y70	+	+	+	B69Y50	+	+	-
B12Y71	+	+	+	B61Y5	+	+	-
B16Y75	+	+	+	B61Y2	+	+	-
B16Y77	+	+	+	B69Y43	+	+	-
B16Y78	+	+	+	B61Y6	+	+	-
B69Y54	+	+	+	B69Y41	+	+	+
B44Y10	+	+	+	B69Y52	+	+	-
B25Y28	+	+	-	B69Y39	+	+	-
B52Y61	+	+	+				
B38Y18	+	+	-				
B38Y20	+	+	+				
B38Y21	+	+	+				
B38Y22	+	+	+				
B69Y56	+	+	-				
B25Y33	+	+	+				
B25Y34	+	+	-				
B25Y35	+	+	+				
B25Y37	+	+	-				

BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuç ve Öneriler

Yoğurt tüketimi ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada her geçen gün artmaktadır. Yoğurt üretimi *S. thermophilus* ile *L. bulgaricus* türlerinin simbiyotik ilişkisi ile gerçekleşmektedir. Bu yoğurt kültürleri başlatıcı kültürler olarak yoğurt üretiminde kullanılmaktadır ve başlatıcı kültürler yoğurdun kalitesini belirlemektedir. Tez çalışmasında ilk aşamada Türkiye'nin 10 farklı bölgesinden (Bayburt, Bursa, Bingöl, Malatya, Kayseri, Ordu, Erzurum, Erzincan, Trabzon ve Elazığ) ve inek, manda, keçi ve koyunlardan geleneksel olarak üretilen yoğurtlar toplanmıştır. Toplanan yoğurtlardan dilüsyon hazırlanıp ekim işlemi yapılmıştır. Her petriden 3 farklı koloni alınarak saflaştırılan kültürler fenotipik tanımlamak için koloni morfolojisi

Fenotipik olarak tanımlanan türler moleküler çalışmalar için *S. thermophilus* türleri fenol: kloroform: isoamil alkol kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *L. bulgaricus* türleri ise DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonundan sonra incelenmiştir. 171 *S. thermophilus* ve 115 *L. bulgaricus* olduğu düşünülen türler ilk aşamada özgü primerleri ile kontrolü gerçekleştirilmiştir. *S. thermophilus* türlerini belirlemek amacıyla P1 ve P2 primerleri kullanılarak *S. thermophilus* türlerine özgü hedef gen bölgesi çoğaltılmıştır. *L. bulgaricus* türlerini belirlemek amacıyla delF188 ve delR1042 primerleri kullanılarak *L. bulgaricus* türlerine özgü hedef gen bölgesi çoğaltılmıştır. PCR ürünlerini kontrol etmek amacıyla %1 agaroz jeli ile TBE tamponu kullanılarak jel elektroforez işlemi uygulanmıştır. Özgü primerler ile kontrol edilen izolatlardan 96 *L. bulgaricus* ile 105 *S. thermophilus* türleri pozitif sonuç vermiştir. Özgü primerler ile pozitif sonuç veren izolatlarından farklı suşları belirlemek amacıyla GTG5 primeri kullanılarak RAPD profilleri belirlenmiştir. RAPD-PCR ile 34 *S. thermophilus* suşu ile 45 *L. bulgaricus* suşu farklı olarak belirlenmiştir. RAPD-PCR tekniği ile farklı suşlar seçilerek takiben 16S PCR işlemi uygulanmıştır. 16S rRNA PCR ile her bir bakteri türüne özgü olan 16S bölgesi çoğaltılmaktadır. 16S bölgesi çoğaltılan izolatlar sekans analizi yapılmıştır. Sekanslama işleminden sonra *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* olduğu belirlenen kültürler suş seviyesinde ayırım gerçekleştirilmek amacıyla MLST tekniği kullanılmıştır. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* suşlarında 3'er MLST bölgesi (rpoB, recA ve pyrG) ampilifiye edilmiş ve suşlar tiplendirilmeye çalışılmıştır. *S. thermophilus* izolatlarının allel tipleri belirlenmiştir ve pyrG gen bölgesi ile 5 farklı allel tipi, recA gen bölgesinin 4 farklı allel tipi ve pro-B gen bölgesi 4 farklı allel tipi

ortaya çıkmıştır. *L. bulgaricus* suşları MLST tiplendirmesinde ilgili veri tabanında yeterli MLST verisi olmadığı için tiplendirme işlemi gen bölgelerinin sekansları ile oluşturulan filogenetik dendogram ile gerçekleştirilmiştir.

Genotipik olarak suşlara ayrılan 34 *S. thermophilus* ve 45 *L. bulgaricus* suşlarının başlatıcı kültür olarak kullanılması için teknolojik özellikleri araştırılmıştır. Yoğurt başlatıcı kültürlerde aranan en önemli özelliklerden biri sütün asitliğinin daha kısa sürede düşürmesidir. Yoğurt asitliğinin yavaş düşmesi fermentasyon süresini uzatmaktadır. Bu tez kapsamında tanımlanan izolatların % laktik asit üretim aktiviteleri ve pH geliştirme aktiviteleri incelenmiştir. İzole edilen suşlarda ilk olarak asit geliştirme özelliği araştırılmıştır. Skim Milk Besiyeri içerisine inoküle edilen suşlar 10 saat boyunca 2 saat aralıklarla pH değerleri ölçülmüştür. Çalışmaya göre *S. thermophilus* suşları 4. Saate kadar Δ pH değerinde artış görülmektedir ve 4. saatin sonunda suşların Δ pH değerinde azalma görülmektedir. *S. thermophilus* suşlarında 2.saat, 4. saat, 6. saat, 8. saat ve 10. saatte en yüksek Δ pH değerleri sırasıyla 1.74, 2.42, 2.42, 2.21 ve 1.79 olarak ölçülmüştür. *L. bulgaricus* suşlarında ise 6.saate kadar Δ pH değerinde artış görülmektedir ve 6. saatin sonunda suşların Δ pH değerinde azalma görülmektedir. *L. bulgaricus* suşlarında 2.saat, 4. saat, 6. saat, 8. saat ve 10. saatlerde en yüksek Δ pH değerleri sırasıyla 1.15, 2.33, 2.54, 2.49 ve 2.12 olarak ölçülmüştür.

İzole edilen 36 *L. bulgaricus* ve 31 *S. thermophilus* türlerinde % laktik asit miktarı hesaplanmıştır. *L. bulgaricus* suşlarında % laktik asit değeri en yüksek %0,6 ve *L. bulgaricus* suşlarında % laktik asit değeri en düşük 0,1 olduğu belirlenmiştir. *S. thermophilus* suşlarında ise % laktik asit değeri en yüksek %0,38 ve *S. thermophilus* suşlarında ise % laktik asit değeri en düşük 0,21 olduğu belirlenmiştir.

Yoğurt başlatıcı kültürlerde aranan diğer bir özellik ise proteolitik aktivitedir. Yoğurt kültürlerinin gelişimleri esnasında sütte bulunan proteolite ihtiyaç duymaktadır. Fakat süt proteini büyük yapıda olduğu için *S. thermophilus* suşları proteini kullanamamaktadır. *L. bulgaricus* ise sütte bulunan büyük yapıdaki proteini parçalayarak *S. thermophilus*'un gelişimini teşvik etmektedir. Proteolitik aktivitenin gerçekleşmemesi ile sütün asitliği de artmamaktadır. Bununla birlikte proteolitik aktivite ile tekstüründe de iyileşmeler gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu tez kapsamında izolatların proteolitik aktiviteleri araştırılmıştır ve araştırmaya göre *L. bulgaricus* suşlarının en iyi proteolitik aktivite 0,547 olduğu belirlenmiştir. *S. thermophilus* suşlarının en iyi proteolitik aktivite 0,172 olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, *S. thermophilus* suşlarının *L. bulgaricus* suşlara göre düşük proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Süt endüstrisinde en önemli sorunlardan biri olan bakteriyofaj yoğurt oluşumu esnasında fermantasyon süresinin uzamasına veya ilerleyen sürede fermantasyonun tamamen durmasına neden olmaktadır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde toplam 37 tane *L. bulgaricus* ve 36 adet *S. thermophilus* suşlarında teknolojiye sorun oluşturan 5 farklı faja karşı dirençlilikleri incelenmiştir. Çalışmaya göre *L. bulgaricus* suşlarından 10 suş 5 faja karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *L. bulgaricus* suşlarından 7 suş 5 faja karşı direnç göstermemiştir. *S. thermophilus* suşlarında ise 6 suş 5 faja karşı direnç gösterirken 14 suş 5 faja karşı direnç göstermemiştir.

Yoğurt üretiminde yoğurt tekstürünün iyileştirilmesi amacıyla çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Fakat katkı maddelerinin kullanılması tüketiciler tarafından istenilen bir durum değildir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda ise LAB tarafından üretilen EPS'lerin fermente ürünlerin tekstürünü iyileştirmesinin yanında üretilen bu EPS sağlık üzerinde de iyileştirici etkilerinin bulunduğu belirlenmiştir. Bu nedenle katkı maddeleri kullanmak yerine iyi EPS üretimine sahip yoğurt kültürleri kullanılarak yoğurt üretilmektedir.

Bu tez kapsamında *L. bulgaricus* suşlarında en yüksek EPS üretimi $859 \mu\text{g}/10^7$ kob olarak belirlenirken, en düşük üretimi $73 \mu\text{g}/10^7$ kob olduğu tespit edilmiştir. *S. thermophilus* suşlarındaki en yüksek EPS eldesi $575 \mu\text{g}/10^7$ kob ve en düşük EPS eldesi $9 \mu\text{g}/10^7$ kob olduğu belirlenmiştir. Elde edilen EPS'lerin monosakkarit kompozisyonu HPLC ile belirlenmiştir. Çalışmaya göre suşlarda glikoz, galaktoz ve fruktoz monosakkaritler olduğu belirlenmiştir. 26 adet *L. bulgaricus* suşunda 17 suşta glikoz, galaktoz ve fruktoz olduğu tespit edilmiştir. 21 adet *S. thermophilus* suşlarında ise 2 suşta glikoz, galaktoz ve fruktoz olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer suşların hepsinde galaktoz ve bazılarında ise glikoz ve galaktoz olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında izolatlarından *L. bulgaricus* suşlarından; B12Y71, B16Y78, B12Y70, B12Y68, B16Y75, B25Y28, B38YY17, B16Y77, B25Y35, B52Y61, B52Y64, B25Y26, B38Y21, B38Y22, B25Y34, B25Y38, B69Y56 ve B52Y65 suşlarının pH geliştirme, % laktik asit miktarı, proteolitik aktivitesi ve EPS üretim miktarı değerlendirildiğinde yoğurt üretiminde kullanım olanağının yüksek olduğu söylenebilir. Bunun yanı sıra B69Y53, B69Y54, B23Y57, B52Y61, B25Y27, B25Y31, B25Y32, B25Y34, B25Y35 ve B38Y17 suşlarında faj dirençliliği gösterdiği için faj enfeksiyonları ile karşılaşılan sorunlarda belirlenen *L. bulgaricus* suşları kullanılabilir. *S. thermophilus* suşlarında ise B44Y8, B69Y39, B16Y73, B69Y48, B24Y23, B69Y40, B52Y11, B61Y1, B38Y14 ve B61Y2 suşlarının pH geliştirme, % laktik asit miktarı, proteolitik aktivitesi ve EPS üretim miktarı değerlendirildiğinde yoğurt üretiminde kullanım olanağının yüksek

olduğu söylenebilir. Fakat tez çalışmasında OPA metodu ile gerçekleştirilen proteolitik aktivitede *S. thermophilus* suşlarının proteolitik aktivitelerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra *S. thermophilus* suşlarından B61Y3, B61Y4, B61Y5, B61Y6, B69S44 ve B69Y48 suşlarının kullanılan fajlara karşı dirençliliği olduğu belirlenmiştir. Yoğurt retiminde karşılaşılan faj enfeksiyonlarında belirlenen bu *S. thermophilus* suşları kullanılabilir.



Kaynakça

- Abu-Tarboush, H. (1996). Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *Journal of dairy science*, 79(3), 366-371.
- Acar Soykut, E. Y., & Tunail, N. T. D. (2007). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Virülemlerinin Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alınarak Tanımlanmaları ve Sınıflandırılmaları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiol. Aust*, 32(2), 90-94.
- Adolfsson, O., Meydani, S. N., & Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 245-256.
- Akın, N. (1997). Bioyoğurt, Bifiduslu Fermente Süt ve Yoğurt ile Bunların Konsantre Ürünlerindeki Laktoz, Glikoz, Galaktoz, L (+) ve D (-) Laktik Asit Miktarları. *GIDA*, 22(5).
- Akpinar, A., Yerlikaya, O., & Kiliccedil, S. (2011). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 675-682.
- Akpinar, A., Yerlikaya, O., & Kiliç, S. (2011). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 675-682.
- Alm, L. (1982). Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Journal of dairy science*, 65(3), 346-352.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., & Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22(5), 373-382.
- Aslim, B., & Beyatli, Y. (2004). Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(2), 257-263.
- Astrup, A. (2014). Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *The American journal of clinical nutrition*, 99(5), 1235S-1242S.
- Aswal, P., Shukla, A., & Priyadarshi, S. (2012). Yoghurt: Preparation, characteristics and recent advancements. *Cibtech Journal of Bio-Protocols*, 1(2), 32-44.
- Aydın Osmanoğlu, Ö. T. D., & Başak, O. Y. (2010). *Laktik asit bakterilerinde tür içi ve türler arası ayırmda 16S-ARDRA tekniğinin değerlendirilmesi*. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı,

- Ayhan, K., Durlu-Özkaya, F., & Tunail, N. (2005). Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International journal of dairy technology*, 58(3), 150-157.
- Baker, G., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.
- Binetti, A. G., Del Río, B., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2005). Detection and characterization of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages by use of the antireceptor gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(10), 6096-6103.
- Bottazzi, V. (1988). An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 303-315.
- Breslaw, E. S., & Kleyn, D. H. (1973). In vitro digestibility of protein in yogurt at various stages of processing. *Journal of food science*, 38(6), 1016-1021.
- Broadbent, J. R., McMahan, D. J., Oberg, C. J., & Welker, D. L. (2001). Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 433-439.
- Broadbent, J. R., McMahan, D. J., Welker, D., Oberg, C., & Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of dairy science*, 86(2), 407-423.
- Buttriss, J. (1997). Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 50(1), 21-27.
- Cai, H., Rodriguez, B. T., Zhang, W., Broadbent, J. R., & Steele, J. L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 153(8), 2655-2665.
- Cai, H., Rodríguez, B. T., Zhang, W., Broadbent, J. R., & Steele, J. L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 153(8), 2655-2665.
- Casalini, T., Rossi, F., Castrovinci, A., & Perale, G. (2019). A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7.
- Cebeci, A., & Gürakan, G. C. (2011). Comparative typing of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains using multilocus sequence typing and RAPD-PCR. *European Food Research and Technology*, 233(3), 377-385.
- Chammas, G. I., Saliba, R., Corrieu, G., & Béal, C. (2006). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *International journal of food microbiology*, 110(1), 52-61.
- Chandan, R. C., Gandhi, A., & Shah, N. P. (2017). Yogurt: Historical background, health benefits, and global trade. In *Yogurt in health and disease prevention* (pp. 3-29): Elsevier.
- Cheng, H. (2010). Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(10), 938-950.
- Chibeu, A. (2013). Bacteriophages in food safety. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex.

- Courtin, P., & Rul, F. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Le Lait*, 84(1-2), 125-134.
- Cremonesi, P., Vanoni, L., Morandi, S., Silvetti, T., Castiglioni, B., & Brasca, M. (2011). Development of a pentaplex PCR assay for the simultaneous detection of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum* in whey starter for Grana Padano cheese. *International journal of food microbiology*, 146(2), 207-211.
- Çakır, İ., & Çakmakçı, M. L. (2005). Gıdalarda patojen mikroorganizma aranmasında kullanılan moleküler genetik yöntemler. *Orlab On Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(12), 1-7.
- Dahiya, R., & Speck, M. (1968). Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal of dairy science*, 51(10), 1568-1572.
- De Brabandere, A. G., & De Baerdemaeker, J. G. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of food engineering*, 41(3-4), 221-227.
- De Giori, G., De Valdez, G., de Ruiz Holgado, A., & Oliver, G. (1985). Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 68(9), 2160-2164.
- de las Rivas, B., Marcobal, Á., & Muñoz, R. (2006). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*, 152(1), 85-93.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- Dede, N. A. (2010). Characterization of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* as lactic cultures isolated from traditional Turkish yogurts and subtyping of *Streptococcus thermophilus* using CRISPR analysis and MLST.
- Del Campo, R., Bravo, D., Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., García-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F.-J., Abaira, V., & Baquero, F. (2005). Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1), 547-549.
- Dertli, E. (2015). Isolation and identification of an exopolysaccharide producer *Streptococcus thermophilus* strain from Turkish yogurt. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 229-232.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Côté, G. L., Le Gall, G., & Narbad, A. (2018). Structural analysis of the α -D-glucan produced by the sourdough isolate *Lactobacillus brevis* E25. *Food chemistry*, 242, 45-52.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., & Sağıdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barekzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3), 50.
- Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

- Erkus, O., Okuklu, B., Yenidunya, A. F., & Harsa, S. (2014). High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yoghurts. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 348-354.
- FAO/WHO. (2011). FAO/WHO., 2001. Codex Standard for Fermented Milks, 243. In *GIDA*.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, 8(2), 44.
- Fisberg, M., & Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition reviews*, 73(suppl_1), 4-7.
- Furuncuoğlu, Y., Basar, M., Alici, S., & Sengul, C. (2014). Effects of a stanol-enriched yogurt on plasma cholesterol levels. *European Journal of General Medicine*, 11(4), 230-234.
- Gezginc, Y., Topcal, F., Comertpay, S., & Akyol, I. (2015). Quantitative analysis of the lactic acid and acetaldehyde produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* strains isolated from traditional Turkish yogurts using HPLC. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1426-1434.
- Grobben, G., Sikkema, J., Smith, M., & De Bont, J. (1995). Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(1), 103-107.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents*, 30(2), 118-128.
- Herdem, A. (2006). *Farklı yörelerden toplanan geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin bazı niteliklerinin belirlenmesi*. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Hossain, N. (2015). *Development of improved quality Yogurt in terms of texture, flavor, food value and low cost*. BRAC University,
- Hou, J.-c., Liu, F., Ren, D.-x., Han, W.-w., & Du, Y.-o. (2015). Effect of culturing conditions on the expression of key enzymes in the proteolytic system of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(4), 317-326.
- İspirli, H. (2016). *Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması Ve Ekzopolisakkarit (Eps) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi*. Bayburt Üniversitesi.
- İspirli, H., & Dertli, E. (2017). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut. *International journal of food properties*, 20(sup3), S2441-S2449.
- İspirli, H., & Dertli, E. (2018). Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13351.
- Karahan, L. E. (2016). Batman'da tüketime sunulan yoğurtların bazı kimyasal ve tekstürel özellikleri. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 6(2/2), 59-65.
- Kebede, A. (2005). *Microbial diversity of naturally fermented milk produced by smallholder milk producers in South Africa*. University of the Free State,
- Kılıç, S. (1991). Yoğurt Yapımında Yararlanılan *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*' un Proteolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi. *GIDA*, 16(4).
- Kivi, S., Peltomäki, T., Luomala, K., & Sarimo, S. (1987). Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Folia microbiologica*, 32(2), 101-106.

- Kizilaslan, N., & Solak, İ. (2016). Yoğurt ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*(12), 52-59.
- Köse, Ş., & Ocak, E. (2014). Yoğurtta lezzet bileşenlerinin oluşumu ve bu oluşum üzerine etki eden faktörler. *Akademik Gıda*, 12(2), 101-107.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Lick, S., Keller, M., Bockelmann, W., & Heller, J. (1996). Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(1), 74-77.
- Liew, S. C., Lu, L., & Zhang, S. (2015). A primer on physical-layer network coding. *Synthesis Lectures on Communication Networks*, 8(1), 1-218.
- Lin, T. Y. (2003). Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(1), 11.
- Louaileche, H., Bracquart, P., Saulnier, F., Desmazeaud, M., & Linden, G. (1993). Carbon dioxide effects on the growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3683-3689.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1-2), 1-17.
- Lu, W., Kong, W., Yang, P., & Kong, J. (2015). A one-step PCR-based method for specific identification of 10 common lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 41, 7-12.
- Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., & Oda, M. (2006). Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Journal of dairy science*, 89(8), 2873-2881.
- Mc Grath, S., Van Sinderen, D., & Fitzgerald, G. (2002). Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(1), 3-15.
- Mckinley, M. C. (2005). The nutrition and health benefits of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 1-12.
- Meydani, S. N., & Ha, W.-K. (2000). Immunologic effects of yogurt. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 861-872.
- Nagaoka, S. (2019). Yogurt Production. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 45-54): Springer.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(4), 355-364.
- Özer, B., & Özer, B. (2006). *Yoğurt bilimi ve teknolojisi*: Sidas Medya.
- Pala, V., Sieri, S., Berrino, F., Vineis, P., Sacerdote, C., Palli, D., Masala, G., Panico, S., Mattiello, A., & Tumino, R. (2011). Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *International journal of cancer*, 129(11), 2712-2719.
- Patel, A., & Prajapat, J. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1-8.
- Pescuma, M., Hébert, E., Mozzi, F., & Valdez, G. F. d. (2007). Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii*

- ssp. bulgaricus grown in a chemically defined medium. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1738-1746.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.-J., Cerning, J., & Desmazeaud, M. (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(8), 3427-3431.
- Petti, S., Tarsitani, G., & D'arca, A. S. (2008). Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci in vitro. *Archives of oral biology*, 53(10), 985-990.
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2012). Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 433-440.
- Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N., & Piva, G. (2007). Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(6), 472-479.
- Premi, L., Sandine, W., & Elliker, P. (1972). Lactose-hydrolyzing enzymes of *Lactobacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 24(1), 51-57.
- Quiberoni, A., Auad, L., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J., & Raya, R. (2003). Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. *Food Microbiology*, 20(4), 461-469.
- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G. M., Reinheimer, J., & Ackermann, H.-W. (2010). *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal*, 20(10), 657-664.
- Radke-Mitchell, L., & Sandine, W. (1984). Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review. *Journal of food protection*, 47(3), 245-248.
- Rajagopal, S., & Sandine, W. (1990). Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of dairy science*, 73(4), 894-899.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of biological research*, 1(4), 218-228.
- Roostita, R., & Fleet, G. (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International journal of food microbiology*, 31(1-3), 205-219.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
- Savaiano, D. A., AbouElAnouar, A., Smith, D. E., & Levitt, M. D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *The American journal of clinical nutrition*, 40(6), 1219-1223.
- Sert, S. (2002). *Genel mikrobiyoloji laboratuvar notları*: Atatürk Üniversitesi.
- Settachaimongkon, S., Nout, M. R., Fernandes, E. C. A., Hettinga, K. A., Vervoort, J. M., van Hooijdonk, T. C., Zwietering, M. H., Smid, E. J., & van Valenberg, H. J. (2014). Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus on the metabolite profile of set-yoghurt. *International journal of food microbiology*, 177, 29-36.

- Shihata, A., & Shah, N. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10(5-6), 401-408.
- Song, Y., Sun, Z., Guo, C., Wu, Y., Liu, W., Yu, J., Menghe, B., Yang, R., & Zhang, H. (2016). Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies bulgaricus isolated from naturally fermented dairy foods. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Soykut, E. A., & Tunail, N. (2009a). Süt Endüstrisinde Sorun Yaratan Termofilik Fajlar. *GIDA*, 34(2), 107-113.
- Soykut, E. A., & Tunail, N. (2009b). Termofilik Faj Taksonomisi. *GIDA*, 34(4), 251-258.
- Şentürk, D. Z., Dertli, E., Erten, H., & Şimşek, Ö. (2020). Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. *Food Science and Biotechnology*, 29(1), 121-129.
- Tamime, A., & Deeth, H. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of food protection*, 43(12), 939-977.
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology*: Elsevier.
- Tanigawa, K., & Watanabe, K. (2011). Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiology*, 157(3), 727-738.
- Tarrah, A., De Castilhos, J., Rossi, R. C., Duarte, V. D. S., Ziegler, D., Corich, V., & Giacomini, A. (2018). In vitro probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Frontiers in microbiology*, 9, 2214.
- Tavşanlı, H. (2015). *Geleneksel Tekniklerle Üretilen Yoğurtlardan ve Doğadaki Bitkisel Örneklerden Yoğurt Kültürlerinin İzolasyonu İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu*. (Doktora), Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı.
- Tayar, M., Anar, Ş., & Şen, C. (1993). Bursa'da tüketilen yoğurtların kalitesi. *GIDA*, 18(3).
- Tufail, M., Hussain, S., Malik, F., Mirza, T., Parveen, G., Shafaat, S., Wajid, A., Mahmood, R., Channa, R. A., & Sadiq, A. (2011). Isolation and evaluation of antibacterial activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus* from yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3842-3847.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5(1), 25-40.
- Ward, D., & Somkuti, G. (1995). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 330-335.
- Weimer, B. C., Oberg, C., Moyes, L., Brown, R., & Richardson, G. (1989). Comparison of classical ion exchange amino acid analysis and o-phthaldialdehyde methods to characterize proteolysis by *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 72(11), 2873-2876.
- Weinbrenner, D., Barefoot, S., & Grinstead, D. (1997). Inhibition of yogurt starter cultures by jensenin G, a *Propionibacterium* bacteriocin. *Journal of dairy science*, 80(7), 1246-1253.
- Xanthopoulos, V., Petridis, D., & Tzanetakis, N. (2001). Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus strains isolated from traditional Greek yogurts. *Journal of food science*, 66(5), 747-752.

- Yu, J., Sun, Z., Liu, W., Xi, X., Song, Y., Xu, H., Lv, Q., Bao, Q., Menghe, B., & Sun, T. (2015). Multilocus sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from naturally fermented dairy foods in China and Mongolia. *BMC microbiology*, 15(1), 236.
- Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. (2003). Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 49-69.
- Zemel, M. B., Thompson, W., Milstead, A., Morris, K., & Campbell, P. (2004). Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obesity research*, 12(4), 582-590.
- Zourari, A., Accolas, J., & Desmazeaud, M. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Le lait*, 72(1), 1-34.



EKLER

Ek-1. Kullanılan Kimyasallar

Fenolftalein	
İngredientler	Miktar (g/L)
Fenolftalein (Sigma) MW 318,32	10
%50 etanol	1 litreye tamamla

0.1 N NaOH	
İngredientler	Miktar (g/L)
NaOH (Merck) MW 40	4
Saf Su	1 litreye tamamla

0.32 mM Sodyum Fosfat Buffer (pH 7,2)	
İngredientler	Miktar (g/L)
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O MW 268,03	0.0849
Saf Su	1 litreye tamamla

0.75 M Triklorasetik Asit (TCA)	
İngredientler	Miktar (g/L)
TCA (Merck) MW 163.38	122.54
Saf Su	1 litreye tamamla

100 mM Sodyum Tetraborat	
İngredientler	Miktar (g/L)
Sodyum Tetraborat (Merck) MW	20.122
201.22	1 litreye tamamla
Saf Su	

%20 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	
İngredientler	Miktar (%)
SDS	20
Saf Su	100 ml ye tamamla

o-Fitalaldehit	
İngredientler	Miktar (mg/ml)
OPA	40
Metanol	1 ml

OPA Reagent	
İngredientler	Miktar (Dahiya & Speck)
100 mM Sodyum Tetraborat	25 ml
%20 SDS	2.5 ml
OPA	1 ml
β -mercaptoetanol	100 μ l
Saf Su	50 ml ye tamamla

Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol Kullanılarak DNA İzolasyonuunda kullanılan kimyasallar.

İngredientler	Miktar
TE(Tris EDTA)	450 μ L
%10 SDS	50 μ L
Proteinaz K	2 μ L
Fenol:kloroform:izoamil alkol	0,5 mL
5m sodyum asetat	50 μ L
İzopropanol	1 mL
%70 etanol	0.5 mL
Distile su	100 μ L

Ek-2. İzolat Kaynağı ve İzolat Kodları*S. thermophilus* Suşlarının İzolat Kaynağı ve İzolat Kodları

Menşei	Örnek Tipi	İzolat Kodu	İzolat Bölgesi
İnek	Yoğurt	B61Y1	Trabzon
İnek	Yoğurt	B61Y2	Trabzon
İnek	Yoğurt	B61Y3	Trabzon
İnek	Yoğurt	B61Y4	Trabzon
İnek	Yoğurt	B61Y5	Trabzon
İnek	Yoğurt	B61Y6	Trabzon
İnek	Yoğurt	B61Y7	Trabzon
İnek	Yoğurt	B44Y8	Malatya
İnek	Yoğurt	B44Y9	Malatya
Manda	Yoğurt	B52Y11	Ordu
İnek	Süt	B52S12	Ordu
Manda	Yoğurt	B52Y13	Ordu
İnek	Yoğurt	B38Y14	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y15	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y16	Kayseri
İnek	Yoğurt	B24Y23	Erzincan
Keçi	Yoğurt	B25Y24	Erzurum
Manda	Süt	B25S25	Erzurum
Koyun	Yoğurt	B69Y39	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y40	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y41	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y42	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y43	Bayburt
İnek	Süt	B69S44	Bayburt
İnek	Yoğurt	B69Y45	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y46	Bayburt
Manda	Yoğurt	B69Y47	Bayburt
Manda	Yoğurt	B69Y48	Bayburt
Manda	Yoğurt	B69Y49	Bayburt
Manda	Yoğurt	B69Y50	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y51	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y52	Bayburt
İnek	Yoğurt	B16Y73	Bursa
İnek	Yoğurt	B16Y74	Bursa

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* Suşların İzolat Kaynağı ve İzolat Kodları

Menşei	Örnek Tipi	İzolat Kodu	İzolat Bölgesi
İnek	Yoğurt	B44Y10	Malatya
İnek	Yoğurt	B38Y17	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y18	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y19	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y20	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y21	Kayseri
İnek	Yoğurt	B38Y22	Kayseri
İnek	Yoğurt	B25Y26	Erzurum
İnek	Yoğurt	B25Y27	Erzurum
Koyun	Yoğurt	B25Y28	Erzurum
Koyun	Yoğurt	B25Y29	Erzurum
Manda	Yoğurt	B25Y30	Erzurum
Manda	Yoğurt	B25Y31	Erzurum
Keçi	Yoğurt	B25Y32	Erzurum
Keçi	Yoğurt	B25Y33	Erzurum
Keçi	Yoğurt	B25Y34	Erzurum
Keçi	Yoğurt	B25Y35	Erzurum
Manda	Yoğurt	B25Y36	Erzurum
Manda	Yoğurt	B25Y37	Erzurum
Manda	Yoğurt	B25Y38	Erzurum
İnek	Yoğurt	B69Y53	Bayburt
İnek	Yoğurt	B69Y54	Bayburt
Koyun	Yoğurt	B69Y55	Bayburt
İnek	Yoğurt	B69Y56	Bayburt
İnek	Yoğurt	B23Y57	Elazığ
İnek	Yoğurt	B23Y58	Elazığ
İnek	Yoğurt	B23Y59	Elazığ
İnek	Yoğurt	B23Y60	Elazığ
İnek	Yoğurt	B52Y61	Ordu
Manda	Yoğurt	B52Y62	Ordu
Manda	Yoğurt	B52Y63	Ordu
Manda	Yoğurt	B52Y64	Ordu
Manda	Yoğurt	B52Y65	Ordu
İnek	Yoğurt	B12Y66	Bingöl
İnek	Yoğurt	B12Y67	Bingöl
İnek	Yoğurt	B12Y68	Bingöl
İnek	Yoğurt	B12Y69	Bingöl
İnek	Yoğurt	B12Y70	Bingöl
İnek	Yoğurt	B12Y71	Bingöl
İnek	Yoğurt	B12Y72	Bingöl
İnek	Yoğurt	B16Y75	Bursa
İnek	Yoğurt	B16Y76	Bursa
İnek	Yoğurt	B16Y77	Bursa
İnek	Yoğurt	B16Y78	Bursa
Manda	Yoğurt	B25Y79	Erzurum

Ek-3. Yoğurt Kültürlerinin 16S rRNA Sekans Sonucu

B44Y8: *Streptococcus thermophilus*

AGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTA
GCGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATT
TGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGG
CTCACCTAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAG
AGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTG
ATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTCGCTT

B25Y24: *Streptococcus thermophilus*

TCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGATAGCGGGGGATAACTAT
TGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTG
CTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACG
ATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACA
CTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTA
AAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTC

B69Y49: *Streptococcus thermophilus*

TCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGATAGCGGGGGATAACTAT
TGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTG
CTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACG
ATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACA
CTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTA
AAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTCGCTTTGAAACTGTCAAACCTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTG
GAATTCATGTGT

B69Y50: *Streptococcus thermophilus*

GCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGATAGCGGGG
GATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAG
GGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACC
TAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGG
AAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAG
TCTGAAGTTAAAGGCTG

B69Y51: *Streptococcus thermophilus*

TGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGATAGCGGGGGAT
AACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGG
CAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAG
GCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACT

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAA
GTTCACTGTGACGGTGCTTACCAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGA
AGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTCGCTTTGGAAACTGTCAA

B69Y52: *Streptococcus thermophilus*

CTTGCTCTTCTTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGG
ATAACTATTGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGG
GGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCT
AGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCG
GTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGG
AAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGT
CTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTCGC

B61Y7: *Streptococcus thermophilus*

GGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGGATAACTATTGG
AAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTC
CACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATA
CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTG
TGACGGTAGCTTACCAGAAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC
CGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGA

B25Y26: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGA
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAGGCGGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAACTGTCAATCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGACGAAACGCATTAAGCGCTCCGCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTGTGTACACCTAGAGATAGG
TGTTCCCTTCGGGGACGACAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACC CGGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA

B25Y27: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGA
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAGGCGGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG

ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGCAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTACACCTAGAGATAGG
TGGTTCCTTCGGGGACGCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA

B25Y28: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGA
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAGGCGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGCAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTACACCTAGAGATAGG
TGGTTCCTTCGGGGACGCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA

B25Y29: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGA
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAGGCGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGCAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTACACCTAGAGATAGG
TGGTTCCTTCGGGGACGCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT

GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA

B23Y57: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGA
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTAAAGGCGGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTACACCTAGAGATAGG
TGGTTCCTTCGGGGACGCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA

B23Y58: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGA
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTAAAGGCGGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTACACCTAGAGATAGG
TGGTTCCTTCGGGGACGCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA

B69Y55: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

AGTCGAGCGAGCTGAATTCAAAGATTCCCTTCGGGATGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGA

TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTGAAAGGCGGGCGTAAGCTGTCACCTTAGGATGAGCCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGA
AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGG
AACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGG
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGA
GGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGC
GCTAGGTGTTGGGGACTTTCCGGTTCTCAGTGCCGAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTACACCTAGAGATAGG
TGGTTCCTTCGGGGACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAA
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCT
CTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATG
GAAGTCTGCAATGCCAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCA



ÖZGEÇMİŞ

11 Haziran 1995 yılında Malatya ilinde doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Malatya’ da tamamladı. 2014 yılında Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümüne başlayıp 2018 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2018 yılında yılında Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.

