

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

SOĞUKTA BEKLETİLEN SÜTLERE AŞILANAN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN LİPOLİTİK AKTİVİTELERİ

120795

YÜKSEK LİSANS TEZİ

120795

HAZIRLAYAN : Eda ÖNDÜL
DANIŞMAN : Doç. Dr. Hayri COŞKUN

VAN-2002

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

SOĞUKTA BEKLETİLEN SÜTLERE AŞILANAN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN LİPOLİTİK AKTİVİTELERİ


YÜKSEK LİSANS TEZİ


HAZIRLAYAN: Eda ÖNDÜL

VAN-2002

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Hayri COŞKUN danışmanlığında, Eda ÖNDÜL tarafından hazırlanan "Soğukta Bekletilen Sütlere Aşıl原因 Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Lipolitik Aktiviteleri " isimli bu çalışma 03.07/2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıd. Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Yalçın Can SANCAK İmza: 

Üye: Doç. Dr. Hayri COŞKUN İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Yusuf ZENGİN İmza: 

Üye:..... İmza:

Üye:..... İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 14/08/2002 gün ve 2002/15-X sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nezaket ADIGÜZEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

SOĞUKTA BEKLETİLEN SÜTLERE AŞILANAN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN LİPOLİTİK AKTİVİTELERİ

ÖNDÜL, Eda

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hayri COŞKUN

Haziran 2002, 29 sayfa

Lipoliz; trigliseritlerin lipaz enzimi varlığında gliserol ve serbest yağ asitlerine parçalanması olayıdır. Sütte lipoliz, doğal kaynaklı lipaz ve mikrobiyal kaynaklı lipaz etkisiyle meydana gelmektedir.

Çalışma; soğukta bekletilen sütlere, süt teknolojisinde kullanılan bazı laktik asit bakterilerini aşilayarak, lipolize katkılarının olup olmadığını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla; özel bir üreticiden alınan sütler iki gün 3 ± 0.5 °C'de bekletilmiştir. Sütlere 0. gün, 1. gün ve 2. gün bazı kimyasal ve mikrobiyolojik analizler uygulandıktan sonra otoklav edilmiştir. Otoklav edilen sütlere *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1471, *Lactobacillus casei* 111, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 1000 ve *Lactobacillus helveticus* aşilayarak inkübasyona terk edilmiş ve inkübasyon boyunca belli aralıklarla pH, asitlik ve lipoliz (ADV) analizleri yapılmıştır. İnkübasyon sıcaklığı mezofilik bakteriler için 30 °C ve *L. helveticus* için 45 °C olarak uygulanmıştır. Benzer işlemler starter aşilaymaksızın kontrol sütleri için de tekrarlanmıştır. Deneme iki tekerrürlü olarak yürütülmüş ve tüm analizler paralelli yapılmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre; sütün soğukta bekletilmesiyle ADV değerlerinde artışlar gözlenmiştir. Buna ilaveten, soğukta bekletme süresi uzadıkça, dikkate alınan laktik asit bakterilerinin lipolitik faaliyetleri de artmıştır. Neticede; normalde lipolitik aktivite göstermeyen veya çok az miktarda lipolitik aktivite gösteren laktik asit bakterileri, sütün soğukta bekletilmesiyle daha fazla lipolitik aktivite göstermişlerdir. Bu sonuç belli ölçüde ürün kalitesini etkileyeceğinden, sütün taze olarak işlenmesinin gerekliliğini ön plana çıkarmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Süt, lipoliz, laktik asit bakterileri

ABSTRACT

THE LIPOLYTIC ACTIVITIES OF SOME LACTIC ACID BACTERIA IN COLD-STORED MILK

ÖNDÜL, Eda

Msc. Food Engineering Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hayri COŞKUN

June 2002,29 pages

Lipolysis is the hydrolysis of triglycerides to glycerol and free fatty acids at the presence of lipase enzyme. Lipolysis in milk occurs as the result of indigenous milk lipoprotein lipase and bacterial lipases.

This study was aimed to determine lipolytic activity of some lactic acid bacteria used in dairy technology in cold-stored milk. For this aim, milk was obtained from an individual producer and stored at 3 ± 0.5 °C for two days. First, milk samples were analyzed chemically and microbiologically and autoclaved after the storage of each day 0 (fresh milk), 1 and 2. After autoclaving, milk samples were cooled to fermentation temperature and inoculated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1471, *Lactobacillus casei* 111, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 1000 and *Lactobacillus helveticus*. Incubation temperature was 30 °C for mesophilic starters and 45 °C for *Lactobacillus helveticus*. During incubation period; pH, titratable acidity (%) and lipolysis as acid degree value (ADV) were carried out. Milk samples without inoculating lactic acid bacteria were used as control. The experiment was carried out with repetition, and all analyses were done in parallels.

According to the results obtained; an increase was observed in ADV values during cold-storage time of milk samples. In addition, the more storage time prolonged, the more lipolytic activity (as ADV) of the investigated lactic acid bacteria was obtained. From this result, it can be suggested that longer cold-storage time of milk can induce the free fatty acid accumulation in milk by lactic acid bacteria, which normally do not have lipase activity, and this phenomenon showed that milk should be freshly processed for better product quality, otherwise lactic acid bacteria can contribute or increase lipolysis affecting taste and flavor of some dairy products.

Key Words: Milk, lipolysis, lactic acid bacteria

ÖN SÖZ

Sütün yapısında doğal olarak bulunan lipaz enzimi (lipoprotein lipaz) ile süte değişik kaynaklardan bulaşmış mikroorganizmaların üretmiş oldukları extraselular lipaz enzimleri vasıtasıyla, sütün temel bileşenlerinden olan ve süt yağı olarak bilinen trigliseridler, gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolize olmaktadır. Böylece sütte serbest yağ asitleri artışına bağlı olarak ransit tad gelişmektedir. Serbest yağ asitleri peynir gibi bazı süt ürünlerinde tad ve aroma gelişimine yardımcı olmaktadır. Ancak fazla miktarlarda oluşumu ürünün duyuusal özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Diğer yandan bazı süt ürünlerinde starter bakteri olarak kullanılan kültürlerin lipaz aktivitesi olmadığı halde, lipoliz gelişmiş sütlerde lipolitik aktivitelerinin nasıl seyredeceği konusunu aydınlatmak üzere bu araştırma yapılmıştır.

Bu çalışmada soğukta depolanan inek sütlerinde; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1471, *Lactobacillus casei* 111, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 1000 ve *Lactobacillus helveticus* bakterilerinin lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma bu yönüyle, değişik süt ürünlerinde meydana gelen lipolize, starter bakterilerin de katkısı bulunup bulunmadığını ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır.

Çalışmanın her aşamasında önemli yardımlarını gördüğüm ve tecrübeleriyle bana yön veren sayın hocam Doç. Dr. Hayri COŞKUN' a, maddi desteğinden dolayı YYÜ Araştırma Fonu Başkanlığına, araştırmada kullanılan starter kültürleri temin eden İbrahim ÇAKIR' a ve emeği geçen herkese teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	4
2.1. Süt ve Lipoliz	4
2.2. Laktik Asit Bakterileri ve Lipoliz	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	8
3.1. Materyal	8
3.2. Yöntem	8
3.2.1. Denemenin kuruluşu	8
3.2.2. Uygulanan analizler	10
3.2.2.1. Kurumadde tayini	10
3.2.2.2. Yağ tayini	10
3.2.2.3. Asitlik tayini	10
3.2.2.4. pH tayini	11
3.2.2.5. Lipoliz tayini	11
3.2.2.6. Toplam aerobik mikroorganizma sayımı	11
3.2.2.7. Psikrotrof bakteri sayımı	12
3.2.2.8. Koliform grubu bakteri sayımı	12
3.2.2.9. İnokülantları da laktik asit bakteri sayımı	12
3.2.2.10. İstatistiksel analizler	12
4. BULGULAR	13
4.1. <i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1471'in Lipolitik Aktivitesi	13
4.2. <i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 1000'in Lipolitik Aktivitesi	14
4.3. <i>Lactobacillus casei</i> 111'in Lipolitik Aktivitesi	15
4.4. Mezofilik Bakteriler İçin Ele Alınan Kontrol Sütleri ve Lipoliz	17
4.5. <i>Lactobacillus helveticus</i> 'un Lipolitik Aktivitesi	18
4.6. <i>Lactobacillus helveticus</i> için Kullanılan Kontrol Sütleri ve Lipoliz	19
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	21
5.1. Mezofilik Laktik Asit Bakterileri ve Lipoliz	21
5.2. <i>Lactobacillus helveticus</i> ve Lipoliz	24
KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Laktik asit bakterilerinin lipolitik aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılan sütlere uygulanan işlemler	9
Şekil 5.1. Soğukta depolanmış sütlerde <i>L. lactis</i> 1471'in lipolitik aktivitesi.	22
Şekil 5.2. Soğukta depolanmış sütlerde <i>L. cremoris</i> 1000'in lipolitik aktivitesi	22
Şekil 5.3. Soğukta depolanmış sütlerde <i>L. casei</i> 111'in lipolitik aktivitesi	23
Şekil 5.4. Soğukta depolanmış sütlerde <i>L. helveticus</i> 'un lipolitik aktivitesi	24



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1471'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılan ve soğukta depolanan hammadde çiğ sütlerin özellikleri	13
Çizelge 4.2. Soğukta depolanan sütlerin <i>L. lactis</i> 1471 ile aşılansarak fermentasyon esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişmeler	14
Çizelge 4.3. <i>L. cremoris</i> 1000'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan hammadde çiğ sütlerin özellikleri	14
Çizelge 4.4. Soğukta depolanan sütlerin <i>L. cremoris</i> ile fermentasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişmeler	15
Çizelge 4.5. <i>L. casei</i> 111'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan hammadde çiğ sütün özellikleri	16
Çizelge 4.6. Soğukta depolanan sütlerin <i>L. casei</i> 111 ile aşılansarak inkübasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişmeler	16
Çizelge 4.7. Mezofilik bakterilerin lipolitik aktivitelerini kıyaslamak amacıyla soğukta depolanan ve kontrol olarak kullanılan sütlerin özellikleri	17
Çizelge 4.8. Mezofilik bakteriler için kontrol amaçlı kullanılan ve kültür aşılansızın inkübe edilen sütlerde ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişmeler	18
Çizelge 4.9. Kontrol amaçlı kullanılan süt ile <i>L. helveticus</i> 'un lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan hammadde çiğ sütün özellikleri	18
Çizelge 4.10. Soğukta depolanan sütlerin <i>L. helveticus</i> ile aşılansarak inkübasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişmeler	19
Çizelge 4.11. <i>L. helveticus</i> için kontrol amaçlı kullanılan ve kültür aşılansızın inkübe edilen sütlerde ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişmeler	20

KISALTMALAR DİZİNİ

KM	Kuru madde
TA	Titrasyon Asitliği
ADV	Asitlik Derecesi Değeri
LAB	Laktik Asit Bakterileri
Cfu(kob)	Koloni Oluřturan Birim



1. GİRİŞ

Bilindiği üzere lipoliz, trigliseritlerin lipaz enzimi varlığında yağ asitleri ve gliserole parçalanmasına denmektedir. Böylece lipolitik parçalanma ile ortamda serbest yağ asitleri miktarı artmaktadır.

Sütte meydana gelen serbest yağ asitleri artışı sadece lipoliz neticesinde olmamaktadır. Sütte serbest yağ asitlerinin birikimi esas olarak üç kaynaktan ileri gelmektedir. Bunlar kandan direkt süte geçen serbest yağ asitleri, süt hücrelerinde esterleşmeyen yağ asitleri ve nihayet trigliseritlerin parçalanması sonucu oluşan yağ asitleridir. Fakat serbest yağ asitleri birikiminde lipazın aktivitesi önemli bir role sahiptir (Metin, 1999).

Süt ve ürünlerinde meydana gelen serbest yağ asitleri büyük ölçüde sütte bulunan doğal lipazın etkisiyle oluşmaktadır (Anonim, 1991). Sütte bulunan doğal lipaz, lipoprotein lipaz olarak adlandırılmakta ve çoğu kazein misellerine bağlı olmakla birlikte (plazma lipazı) bir kısmı da serumda yağ kürecik membranında (membran lipazı) bulunmaktadır (Metin, 1999). Sağılan süt hiçbir fiziki etki altında kalmadan (çalkalama v.s) soğutulur ve soğukta bekletilirse, bu esnada özellikle membran lipazın etkisiyle "kendiliğinden lipoliz" denen lipolitik parçalanma meydana gelmektedir. Burada etkili olan mekanizma; sütün soğutulmasıyla yağ küreciklerinin dış kısmında bulunan erime noktası yüksek ve çoklu doymamış lipidlerin hacmini azaltmakta ve kristalleşmeye neden olmaktadır. Böylece kürecik içinde bulunan sıvı haldeki yağ asitleri zar dışına çıkarak kürecik yüzeyine toplanmakta ve enzimlerle temasa geçmektedir. Böylece bozulma başlamaktadır (Gönç ve Gahun, 1979). Eğer süt sağımdan sonra aşırı çalkalama ve homojenizasyon gibi değişik mekaniki etkilere maruz kalırsa bu defa plazma lipazı devreye girerek süt yağını parçalanmasını daha da hızlandırmakta ve buna da "teşvik edilen lipoliz" adı verilmektedir. Çünkü teşvik edilen lipolizde trigliseriti koruyan membran hasar görmektedir. Gerek kendiliğinden olan lipoliz ve gerekse teşvik edilmiş lipoliz ayrı ayrı meydana geldiği gibi aynı anda da meydana gelebilmektedir. Neticede özellikle içme sütleri ile diğer bazı sıvı süt ürünlerinde istenmeyen olumsuzluklara neden olmaktadır. Süt lipazının etkisiyle meydana gelen bu olumsuzluğa hidrolitik ransidite veya kısaca ransidite adı verilmektedir (Olivecrona, 1980; Atamer, 1993).

Süt yağının parçalanmasına süte değişik kaynaklardan bulaşan bazı mikroorganizmaların ürettiği lipaz enzimleri de etki etmektedir. Bunlar arasında bazı mayalar ve küfler ile bakteriler yer almaktadır. En önemli lipaz kaynağının ise bazı psikrotrofik bakteriler (*Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter* türleri) olduğu bildirilmektedir. Sütün doğal lipazı pastörizasyon sıcaklığında inaktif olduğu halde, psikrotrof bakterilerin salgılamış oldukları lipaz enzimleri pastörizasyon sıcaklığında aktif kalabilmektedir (Kılıç ve ark., 2000). Isı işlemi sonrası sütte kalan bakteriyel kaynaklı lipazlar daha sonraları bazı duyuşal sorunlara neden olabilmektedirler. Özellikle peynire işlenecek sütlerde psikrotrofik mikroorganizma sayısı 10^6 cfu/ml'ye vardığında, ürettiği lipaz ve özellikle de lipaz enzimleri, üründe sonraları lipolitik bozulmalara neden olmaktadır. Bu bakımdan psikrotrofik bakterilerin ürettiği lipazlar önem taşımaktadır. Çünkü salgılanan proteinaşlar suda eridiklerinden peynir altı suyu ile beraber

uzaklaştığı halde, lipazlar yağ globulüne yapışmakta ve peynirde konsantre olmaktadır. İşte bu enzimler ileri ki safhalarda önemli tat ve aroma bozukluklarına neden olmaktadır (Fox, 1989).

Soğutulmuş sütün tekrar ılıtılması lipolizi hızlandırmaktadır. Örneğin soğutulmuş akşam sütüne, ılık sabah sütü ilave edildiğinde sıcaklık motivasyonu oluşmakta ve bu da lipolizi hızlandırmaktadır. Diğer yandan yem ve yemin bileşimi de lipolize etki etmektedir. Bilhassa kuru ve karbonhidratlı yemler sütte ransiditeyi artırmaktadır. Böylece yeme bağlı olarak laktasyonun ilerlemesiyle sütte lipoliz artmaktadır. Ayrıca akşam sağılan sütlerde sabah sağılanlara göre daha fazla serbest yağ asidi bulunmaktadır. Bunun büyük ölçüde yağ oranı ile ilgisi olduğu sanılmaktadır. Sütte somatik hücre sayısı 800.000 hücre/ml olduğurda, ortamdaki serbest yağ asitleri miktarı artmaktadır. Bunun anlamı mastitisli sütlerde ransidite meydana geldiğidir. İlaveten, süt hayvanının kızgınlık gösterdiği dönemlerde kanda lipaz seviyesi artmakta ve bu da süte yansımaktadır. Sağımın makineyle yapılması, tanka pompalanması, boru uzunluğu ve boruların kıvrımlılığı sütü köpüklendirdiğinden sütte ransiditeyi artırmaktadır. En önemlisi de süte uygulanan homojenizasyon işlemi yağ kürecik membranını hasara uğrattığından, lipazın etki alanını daha da genişletmektedir (Weinrauch, 1988). Yukarıda sayılan etkiler neticesinde ortamda miktarı artan 4, 6, 8, 10 ve 12 karbonlu yağ asitleri sütte ve tereyağında acılaşmaya neden olmaktadır (Gönç ve Gahun, 1979; Anonim, 1991).

Görüldüğü üzere sütte meydana gelen lipolize veya daha genel anlamda sütte serbest yağ asidi birikimine, birçok faktör etki etmektedir. İşte bu faktörlerden bir diğeri de süte değişik amaçlarla katılan laktik asit bakterileridir. Literatür bildirişleri bölümünde laktik asit bakterileri ve süt ve ürünlerinde lipoliz konularında detaylı bilgilere yer verilmiştir.

Araştırmaya konu olan laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus helveticus* değişik peynirlerde starter olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler peynirlerde daha çok asit üretiminden ve proteolitik parçalanmadan sorumludurlar (Tekinşen ve Atasever, 1994). Sözkonusu laktik asit bakterilerinin proteolitik aktiviteleri hakkında yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Visser, 1993; Monnet ve ark, 1987; Law, 1984; Khalid ve Marth, 1990). Fakat adı geçen bakterilerin lipolitik aktiviteleri hakkında mevcut bilgiler sınırlı düzeydedir. Bununla birlikte laktik asit bakterilerinin az da olsa serbest yağ asidi düzeyine katkıda buldukları söylenmektedir. Laktik asit bakterilerinin intraselular lipaz ürettikleri için lipolitik aktivitelerinin düşük olduğu ifade edilmektedir (Yaygın, 1999). Sütte doğal halde bulunan lipaz ile bakteriyel lipaz enzimleri sayesinde trigliseritlerin kısmi parçalanması, starter bakterilerin lipazlarına substrat olarak zemin hazırlamakta ve böylece laktik asit bakterileri de lipolizi hızlandırmada etkili olmaktadır (Law, 1984). Öte yandan ransit tat gelişmiş sütlerde *Streptococ* türü laktik asit bakterilerinin gelişme gösteremediği ve bunun büyük ölçüde ortamda yağın hidrolizi sonucu biriken serbest yağ asitlerinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (Sellars ve Babel, 1985). Görüldüğü üzere laktik asit bakterilerinin lipolitik faaliyetleri ve etkileşimleri hususlarındaki bilgiler farklılık arz etmektedir.

Aslında lipoliz ürün bazında önem taşımaktadır. Örneğin süt yağının parçalanması tereyağı, içme sütleri ve sütozunda istenmediği halde peynirde kısmen arzu edilmektedir. Bu anlamda lipoliz birçok ülkede sorun olarak görülmemektedir

(Anonim, 1991). Fakat gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelerde sütün üretiminden tüketimine kadar geçen süreçte hijyenik problemler söz konusudur. Özellikle sütün sağımında ve depolanmasında sorunlar yaşanmaktadır. İşte bu sorunlar sütteki ransiditeyi daha da artırmaktadır. Artan ransiditeyle sütteki serbest yağ asidi miktarı da artacağından, ürünün tadının olumsuz etkilenmesi söz konusu olacaktır. Hatta ransidite düzeyine bağlı olarak laktik asit bakterilerinin gelişmesi de etkilenecektir. Sütün 2-6 °C'ye soğutulup bekletilmesi, ona bulaşan mikroorganizmaların gelişmesini önlemek açısından önemlidir. Fakat bu bekletme uzun süreli olmamalıdır. Sağım anındaki sütün serbest yağ asitliği ve sütün soğutulması ile ortaya çıkan serbest yağ asitliğinin, laktik asit bakterilerini nasıl etkilediği konusundaki çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada; laboratuvara getirilen inek sütleri iki gün soğukta bekletilerek bu süre zarfında lipolizdeki değişim gözlenmiştir. Ayrıca her bir gün sonunda bu sütün araştırmada dikkate alınan bakteriler aşılansarak fermentasyona tabi tutulmuş ve soğukta bekletilen sütte gelişen lipolizin aşılansan bakterilerin lipolitik aktivitelerini hangi yönde etkilediği araştırılmıştır. Elde edilecek sonuçlar, dikkate alınan laktik asit bakterilerinin lipolitik faaliyetlerini ortaya koyması ve daha ileride peynirler üzerindeki etkisinin araştırılması bakımından önem taşımaktadır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Süt ve Lipoliz

Son yıllarda sütün değişik koşullar altında depolanması ve meydana gelen lipoliz üzerinde yapılmış önemli çalışmalar mevcuttur.

Castagnetti ve ark. (1987), farklı üretim merkezlerinden aldıkları 621 tank sütünde, Lipo-R metodu ile serbest yağ asitleri ve lökosit sayılarını belirlemişlerdir. Alınan örneklerde ortalama serbest yağ asitleri miktarı 0.59 ± 0.17 mEq/l süt şeklinde bulunmuştur. Soğutulmuş süt örneklerinin serbest yağ asidi miktarı, soğutulmamış süt örneklerine göre daha yüksek bulunmuştur.

Lukasova (1987), taze inek sütüne lipolitik mikroorganizma karışımından oluşan kültür inoküle etmiş ve araştırma sonunda toplam bakteri sayısının 9.6×10^5 cfu/ml'den 6.6×10^7 cfu/ml'ye, lipolitik bakteri sayısının 2.1×10^3 cfu/ml'den 5.4×10^6 cfu/ml'ye yükseldiğini tespit etmiştir. Diğer yandan normal sütte 7.8 mmol/kg olan serbest yağ asidi miktarı 4 °C de 48 saat bekletilmesi ile 14.7 mmol/kg'a, oda sıcaklığında aynı sürede bekletilmesi ile de 29.8 mmol/kg'a çıktığı belirlenmiştir. Sonuçta lipolizin depolama süre ve sıcaklığından oldukça etkilendiği saptanmıştır.

Needs (1992), çiğ koyun sütündeki yağın stabilitesi üzerine uzun süre derin dondurarak saklamanın etkilerini; serbest yağ asitleri konsantrasyonu, lipoprotein lipaz aktivitesi ve çözücü ile ekstrakte edilebilir yağın ölçümü yoluyla tayin etmiştir. Araştırmada 3 sürüden alınan porsiyon halindeki sütler; -12, -20 ve -27 °C de dondurulmuş ve depolanmıştır. Sütlerin 6 aylık depolama süresi boyunca serbest yağ asitlerinde dereceli bir artış olduğunu, 6 ay depolamadan sonra analiz edilen örneklerde lipaz aktivitesinin taze sütteki başlangıç değerine göre -12 °C'de saklananlarda % 2, -20 °C'de saklananlarda % 11, -27 °C'de saklananlarda % 24 artış gösterdiğini ortaya koymuştur.

So ve ark. (1992), süt çiftliklerinden aldıkları çiğ sütlerde; toplam bakteri ve psikrotrofik bakteri sayılarını belirledikten sonra psikrotrofik mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini teşhis etmişlerdir. Yapılan analizler neticesinde çiğ sütteki ortalama toplam bakteri sayısı 2.6×10^6 /ml, ortalama psikrotrofik bakteri sayısı 1.2×10^6 /ml olarak bulunmuştur. Çiğ süttten rastgele izole ettikleri 300 psikrotrofik koloni arasında 147'sinin *Pseudomonas*, 84'ünün *Flavobacterium*, 18'inin *Aeromonas*, 16'sinin *Streptococcus*, 15'nin *Acinetobacter*, 11'nin *Alcaligenes*, 4'ünün *Enterobacter*, 4'ünün *Micrococcus* ve 4'ünün *Bacillus* cinslerinden olduğu ortaya konmuştur. Bu koloniler arasında 117'sinin proteolitik, 156'sının lipolitik aktivite gösterdiğini; 73'ünün ısıya dayanıklı proteinaz, 18'inin ısıya dayanıklı lipaz enzimi salgıladıklarını belirtmişlerdir. Proteolitik ve lipolitik enzimler salgılayan psikrotrofların dominant olarak *Pseudomonas* olduğu belirtilmiştir.

Christen ve Chowming (1994), çiğ süt kalitesi ve lipoliz arasındaki ilişkiyi belirlemek için 31 çiğ süt örneğini, ekstraksiyon-titrasyon metodu ile serbest yağ asitleri yönünden analize tabi tutmuşlardır. Somatik hücre sayısı, bakteri sayımı, protein ve yağ gibi diğer kalite özelliklerinin de tayin edildiği araştırmada; çiğ sütte somatik hücre sayısı ve lipolitik bakteri sayılarının önemli derecede serbest yağ asitleri değeri ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Guul-Simonsen ve Christensen (1995), 70 inekten aldıkları çiğ sütü iki gruba bölerek farklı derecelerde soğutmuşlardır. Birinci grubu çok sürekli-soğutma ile 2.5 °C'ye, ikinci grubu ise bir buçuk saat içerisinde kesikli soğutma ile 4 °C'ye soğutmuşlardır. Sütün asitlik derecesi değerinde artma ve bakteriyel gelişme ikinci gruba göre birinci grupta daha yavaş olarak saptanmıştır.

Jandal (1996), Awassi koyun sütünde 5 °C'de 24 saat depolamadan sonra kullanılan bazı kimyasalların (bakırsülfat, kurşun nitrat, gümüş nitrat ve NaCl), pH değişimlerinin, çalkalamanın (5 veya 10 dak.), pastörizasyonun (71°C de 15 sn), kaynatmanın (100°C), ısıtmanın (20 veya 50°C) ve soğutmanın (5 °C) lipolize etkisini araştırmıştır. Kontrol inek sütünde serbest yağ asidi derecesinin 0.36 mEq/lt, koyun sütünde ise bu değer 0.49 mEq/lt olduğu belirlenmiştir. Soğutulmuş koyun ve inek sütlerinde bu değer 0.23 ve 0.13 mEq/ml olduğu belirlenmiştir. Kaynatma ve pastörizasyon ile koyun sütündeki lipolizin sırasıyla 0.12 ve 0.08 mEq/ml'e düştüğü ve çalkalamanın inek sütüne göre koyun sütünde daha çok lipoliz artışına neden olduğu, koyun sütüne katılan Cu SO₄, Pb(NO₃)₂, AgNO₃, NaCl gibi kimyasal maddelerin lipolizi sırasıyla 1.14, 0.98, 0.79, 0.65 mEq/ml artırdığı, asit ve alkalilendirilmiş koyun sütünde lipolizin 0.14 ve 0.57 mEq/ml, inek sütünde 0.11 ve 0.74 mEq/ml olduğu ortaya konmuştur. Netice olarak; Awassi sütünde lipolizin çalkalama, alkali şartlar ve kimyasal ilavesi ile arttı; ısıtma, kaynatma, pastörizasyon ve asidifikasyon yoluyla da azaldığı belirtilmiştir.

Panfil-Kuncewicz ve ark. (1998), UHT sütün depolanması döneminde yağ fraksiyonunda meydana gelen hidrolitik değişimlerin derecesi ve nedenlerinin, sütün mikrobiyolojik kalitesine özellikle lipolitik-psikrotrofik bakterilere bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, UHT sütün yağ fraksiyonunda meydana gelen lipolitik değişim seviyelerini depolama şartları (süre ve sıcaklık) ve kullanılan sterilizasyon metodunun tayin ettiğini bildirmişlerdir.

Sütün tabii lipazı ve mikrobiyal lipazları tarafından trigliseritlerin parçalanması suretiyle gliserol ve serbest yağ asidi üretimi gerçekleştirilmektedir. Yağ asitleri, kültür katılmış ve yağsız süt ürünlerinde önemli aroma kaynağıdır. Bununla birlikte bu etmenler sütte anormal derecede fazla olduğu zaman üründe ransit tat oluşmaktadır. Cheddar peyniri ve yoğurt gibi ürünlerde, amino asitlerin parçalanması sonucu üretilen yağ asitleri, süt yağından oluşana göre daha fazladır (Frank ve Marth, 1988).

2.2. Laktik Asit Bakterileri ve Lipoliz

Araştırmaya konu olan ve kok şeklinde laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oval hücreli ve 0.5-1.0 µm çapındadır. Genellikle ikiye ya da kısa zincirler halinde bulunurlar. Hareketli formları nadiren gözlenir. Mikroaerofiliktirler. Glukoz buyyonda son geliştiği pH aralığı 4.0-4.5 şeklindedir. Proteolitik olarak aktif bir bakteridir. Bazı türleri birçok G(+) bakteriyi inhibe eden Nisin adında bir antibiyotik üretir. Optimum 30 °C'de gelişir. Çiğ süt ve süt ürünleri izole edildiği kaynaklar arasındadır. Sütte % 0.5-0.7 oranında L(+) laktik asit üretir. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ise hücre yapısı yuvarlak ve oval biçimdedir. Hücre çapları 0.6-1.0 µm arasındadır. *L. lactis*'ten farkı D-isoasparagin içermesidir. Gelişme gösterdiği son pH aralığı 4.0-4.5'tir. Sütte % 0.5-0.7 L(+) laktik asit üretir.

Proteolitik bakımdan aktiftir. Optimum gelişme sıcaklığı 28-33 °C 'dir. 40 °C 'de gelişme göstermez. İzole edildiği kaynaklar çiğ süt ve süt ürünleridir. Bazı suşları hidrojen peroksit üretir (Sneath ve ark., 1986; Kılıç, 2001).

Çubuk şeklinde olan bakterilerden *Lactobacillus helveticus* başta ekşimiş süt olmak üzere Emmental ve Gruyere peynirlerinde doğal olarak bulunmaktadır. En iyi gelişmeyi 45 °C de göstermektedir. 15 °C 'de gelişme göstermemektedir. Maksimum gelişme gösterdiği sıcaklık 50-52 °C 'dir. Bakteri 0.6-1.0 µm çapında, 2-6 µm uzunluğunda tekli veya zincir şeklindedir. Homofermentatif bir bakteri olup *Str. thermophilus* ile birlikte Emmental ve Parmesan gibi peynirlerin yüksek derecede pişirilen telemesinde kullanılan kültürlerde yer alır. *Lactobacillus casei* ise streptobacterium grubu içinde yer alır. Bakteri homofermentatif olup optimum 28-32 °C 'de gelişme gösterir. Düşük sıcaklıklarda (6-7 °C) yaşamını sürdürebilen *Lb. casei* sütün bulunduğu her yerden izole edilebilir. Hücre çapı 1.5 µm'den daha küçük, uçları uzun veya kısa çubuk şeklindedir. Flagellasız ve hareketsiz bir bakteridir. Ayrıca zincir oluşturabilmektedir. Bazı peynirlerin yapımı için diğer laktik asit bakterileri ile birlikte kültür hazırlanmasında kullanılır. 45 °C 'de gelişme göstermez (Kılıç, 2001).

Araştırmada kullanılan ve yukarıda genel özellikleri belirtilen laktik asit bakterilerinin lipolitik aktiviteleri konusundaki bilgiler sınırlı düzeydedir. Bu belkide onların daha çok proteolitik olma özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Fakat starter kültür bakterileri özellikle hidrolize olmuş süt yağında mono ve digliseritlerden serbest yağ asidi üretebilmektedirler. Olgunlaşmış peynirlerde, starter kültürler yağı zayıf da olsa hidrolize ederler. Diğer yandan yoğurt kültürlerinin aktif stoplazmik lipaza sahip oldukları bildirilmekte ve bunun da yoğurdun depolanması esnasında serbest yağ asitlerine etki ettiği sanılmaktadır (Frank ve Marth, 1988). Öte yandan Tamime ve Deeth (1980), yoğurdun çoğu uçucu asit içeriğinin yağsız süt bileşenlerinden ortaya çıktığını ifade etmektedirler.

Lactobacillus plantarum 2739 suşundan 65 kDa 'lık bir intraselüler lipaz saflaştırılmıştır. Elde edilen lipazın pH 7.5'de ve 35 °C'de optimal aktivite gösterdiği, 65 °C'de ısıya dirençli olduğu fakat 75 °C'de iki dakikada dönüşümsüz olarak inaktive olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan lipazın trigliseritleri hidrolize ettiği saptanmıştır (Gobbetti ve ark., 1996).

Sousa ve Malkata (1997), yaptıkları bir çalışmada; sütün pastörize edilmesinin, rennet ve starter kültür ilavesinin peynirde lipolize etkisini araştırmışlardır. Sonuçta starter katılmayan çiğ süttten, pastörize edilmiş ve starter ilave edilmemiş süttten, pastörize edilmiş ve starter ilave edilmiş süttten yapılan taze peynirlerde serbest yağ asitleri miktarını sırasıyla 3538, 3002, 3283 mg/kg olarak bulmuşlardır. Bu değerleri 68 gün sonunda yine aynı peynirler için sırasıyla 6517, 8115 ve 4847 mg/kg olarak belirlemişlerdir.

Lactobacillus delbruecki subsp. *bulgaricus* B 397, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* T12 ve *Lactobacillus plantarum* 2739 suşlarının lipolitik ve proteolitik aktiviteleri üzerine sıcaklık, pH, NaCl ve su aktivitesinin incelendiği bir çalışmada; *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* B 397'nin lipaz ve esteraz aktivitesinin, peynirdeki mevcut ortam koşulları tarafından önemli bir şekilde engellendiği saptanmıştır (Gobbettia ve ark., 1999).

Laktik asit bakterileri sadece intraselüler lipaz enzimi meydana getirdikleri için çok az lipolitik aktiviteye sahiptirler. Yapılan çalışmalarda en fazla lipolitik

aktiviteye sahip olan laktik asit bakterisinin *Leuconostoc dextranicum* olduğu, yoğurt bakterileri olan *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'un çok sınırlı bir lipolitik aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Lipolitik özellik gösteren enzimler sitoplazma içinde bulunur ve hücre otoliz olduğu zaman ortaya çıkar. Ayrıca laktozun fermentasyonu sırasında çok az miktarda da düşük moleküllü yağ asitleri ortaya çıkabilmektedir (Yaygın, 1999).

Laktik asit bakterilerinin çok zayıf lipolitik aktiviteye sahip oldukları belirtilmekte fakat hidrolize olmuş yağı daha kolay parçalayabildikleri ifade edilmektedir. Öte yandan Streptokok ve Laktobasillerin de stoplazmik orjinli lipaz ve esteraz sistemlerinin olduğu belirtilmektedir. Laktobasiller ve *Streptococcus thermophilus*' un çok düşük lipolitik aktivite gösterdiği, buna karşın mezofilik Streptokoklar ile *Leuconostoc*'ların genelde biraz daha fazla lipolitik olarak aktif oldukları belirtilmiştir. Bu bakterilerin pastörize süttten yapılan peynirlerde lipolizden sorumlu oldukları belirtilmektedir (Choisy ve ark., 1987).

Yapılan birçok çalışma neticesinde ransidite gelişmiş sütte başta *Streptococcus lactis* olmak üzere laktik asit üreten streptokokların gelişmesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu etkinin ortamda bulunan serbest yağ asitlerinden meydana geldiği sanılmaktadır (Sellars ve Babel, 1985).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada süt materyali olarak, özel bir üreticiden sağlanan çiğ inek sütü kullanılmıştır. Sabah sağımıyla alınan inek sütleri, bekletilmeden laboratuvara getirilmiş ve gerekli analizlere tabi tutulmuştur. Starter bakteri olarak kullanılan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1471, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 1000 ve *Lactobacillus casei* 111 kültürleri Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi laboratuvarından temin edilmiştir. *Lactobacillus helveticus* ise Chr. Hansen firmasından sağlanmıştır. Kültürler Sellars ve Babel'e (1985) göre aktive edilmiştir.

3.2. Yöntem

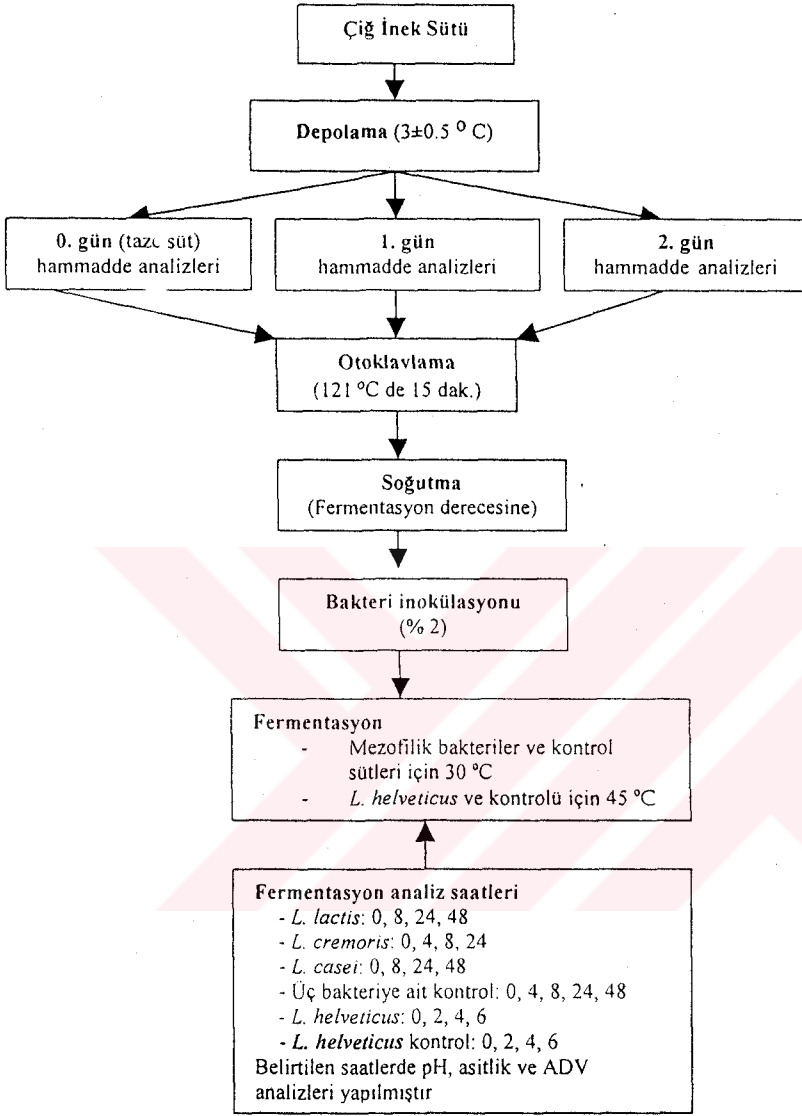
3.2.1. Denemenin kuruluşu

Laboratuvara getirilen inek sütü üç gruba ayrılmış ve birinci grup sütün (0. gün) pH, titre edilebilir yüzde asitlik (% TA), kurumade (% KM), yağ (%), ADV (asitlik derecesi cinsinden lipoliz değeri), genel mezofilik aerobik mikroorganizma sayımı, psikrotrofik mikroorganizma sayımı ve koliform grubu sayımları yapıldıktan sonra 120 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Otoklavdan sonra süt 30 °C'ye soğutulmuş ve % 2 oranında *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1471 ile inoküle edilerek iyice karıştırılmıştır. İnokulumdaki bakteri sayısı yaklaşık 5.04×10^8 cfu/ml şeklindeydi. *L. lactis* 1471 ile aşılanan süt daha sonra 30 °C'de 48 saat inkübasyona terk edilmiştir. İnkübasyonun 0., 8., 24. ve 48. saatlerinde örnekler alınarak pH, TA (%) ve ADV yönünden analiz edilmiştir (Şekil 3.1). İkinci grup süt 3 ± 0.5 °C'de 24 saat (1 gün) buzdolabında bekletildi ve birinci grup süte uygulanan analizlerden sonra aynı şartlarda otoklav edildi. Sonra diğer işlemler yukarıdaki gibi tekrarlandı. Üçüncü grup süt ise 3 ± 0.5 °C'de 48 saat (2 gün) bekletildikten sonra yukarıdaki işlemlerin aynısı tekrar edildi.

Yukarıdaki işlemler diğer laktik asit bakterileri için de uygulandı. Bununla birlikte *L. cremoris* 1000, 30 °C'de 24 saat inkübe edildi ve inkübasyonun 0., 4., 8. ve 24. saatlerinde örnek alındı ve analiz edildi. İnokulum miktarı % 2 olup, mililitresinde yaklaşık 5.70×10^8 cfu bakteri bulunmaktaydı.

Lactobacillus casei 111 ise 30 °C de 48 saat inkübe edildi ve inkübasyonun 0., 8., 24. ve 48. saatlerinde örnekler alınarak analiz edildi. *L. casei* için inokulum miktarı % 2 şeklindeydi. İnokulum 1.80×10^8 cfu/ml bakteri içermekteydi.

Kontrol amacıyla; 30 °C'de inkübe edilen laktik asit bakterileri (*L. lactis* 4171, *L. cremoris* 1000 ve *L. casei* 111) için alınan süt yine gerekli analizleri yapıldıktan sonra otoklav edilmiş ve 30 °C'ye soğutulularak bu sıcaklıkta herhangi bir laktik asit bakterisi ilave edilmeksizin 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 4., 8., 24. ve 48. saatlerinde örnekler alınarak pH, TA (%) ve ADV yönünden analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. Laktik asit bakterilerinin lipolitik aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılan sütlere uygulanan işlemler

Lactobacillus helveticus termofilik bir bakteri olduğundan otoklavdan sonra 45 °C'de inkübasyona tabi tutuldu. Bu bakteri ile inokule edilen sütlerden inkübasyonun 0., 2., 4. ve 6. saatlerinde örnekler alınarak gerekli analizler yapıldı. İnokulum miktarı % 2 şeklindeydi. İnokulumun bir mililitresinde 5.00×10^8 cfu bakteri bulunmaktaydı.

L. helveticus bakterisi için yürütülen kontrol çalışmasında; alınan süte uygulanan analizlerden sonra otoklav edilmiş ve 45 °C'ye soğutulmuş bu sıcaklıkta

inokülasyonsuz inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 2., 4. ve 6. saatlerinde örnekler alınarak analizleri yapılmıştır.

Herbir bakteri ve herbir kontrol çalışması için aynı kaynaktan elde edilen süt kullanılmış ve her bir çalışma müstakil olarak yürütülmüştür. *L. helveticus*'un lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılan süt ile bu bakteriye ait kontrol amaçlı süt aynı günde alınmıştır. Çalışma 2 (iki) tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler paralelli yapılarak ortalamaları alınmıştır.

Gerek hammadde süte ve gerekse inkübe edilen süte uygulanacak analizler aşağıdaki gibi yapılmıştır.

3.2.2 Uygulanan analizler

3.2.2.1. Kurumadde tayini

Kurumadde tayininde kullanılan kurutma kapları 105 °C'deki kurutma dolabında 1 saat tutulup desikatöre alınarak soğuması sağlandı. İyice karıştırılmış süt örneklerinden yaklaşık 5 ml kadar tartılıp 105 °C'de kurutma dolabında kurutuldu. Örnekler sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutma işlemine devam edildi. Sabit ağırlığa gelen örneklerin son tartımı yapılarak, hesaplama yoluyla % kuru madde oranları belirlendi (Kurt ve ark., 1993).

3.2.2.2. Yağ tayini

Sütlerde yağ tayini Gerber metodu ile belirlendi. Van Gulik bütirometrisine önce 1.50 özgül ağırlıklı sülfürik asitten 10 ml eklendi, sonra üzerine 11 ml süt örneği hafifçe ilave edilerek üzerine 1 ml amil alkol kondu. İyice karıştırıldıktan sonra bütirometreler 5 dakika santrifuj edildi. Bütirometre tıpası yardımı ile % yağ miktarları okundu (Kurt ve ark., 1993).

3.2.2.3. Asitlik tayini

Süt örneklerinden 17.6 ml süt, pipet yardımı ile alınarak 2-3 damla fenolftalein indikatörü eşliğinde 0.1 N' lik sodyum hidroksit çözeltisi ile değişmeyen pembe renk elde edilinceye kadar titre edildi. Harcanan sodyum hidroksit miktarı aşağıdaki formülde yerine konarak laktik asit cinsinden titre edilebilir asitlik değeri yüzde olarak hesaplandı (Kurt ve ark., 1993).

$$\text{Titrasyon asitliği (\%)} = \frac{C \times 0.009 \times 100}{S}$$

C: Titrasyonda kullanılan 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi (ml)

S: Titrasyonda kullanılan süt miktarı (ml)

3.2.2.4. pH tayini

Örneklerin pH ölçümleri pH metre (Hanna, 8521) yardımıyla yapıldı. Ölçümden önce pH metre tampon çözeltiler yardımıyla standardize edildi ve süt örnekleri içine daldırılarak pH değerleri okundu.

3.2.2.5. Lipoliz tayini

50 ml'lik bir şırınga kullanılarak, 35 ml süt özel hazırlanmış bütirometreye yerleştirildi. Süt üzerine 10 ml BDI reagent (30 g Triton X-100 ve 70 g sodyum tetra fosfat'ın 1 litre distile sudaki solusyonu) ilave edilerek karıştırıldı ve bütirometreler hafif kaynayan suyun içerisine konarak 15 ve 20 dakika karıştırılmak suretiyle bekletildi. Sonra bütirometreler Gerber santrifüjünde 1 dakika santrifüj edildi ve yağın ölçülü kısma gelmesini sağlamak amacıyla sulu metanol (metanol eşit miktarlarda su ile karıştırıldı) ilave edildi. Tekrar 1 dakika santrifüj edildi ve butirometrenin üst kısmında yer alan yağ bir şırınga yardımıyla alınarak 50 ml'lik bir behere alındı. Beher içindeki yağın tartımı yapıldıktan sonra donmaması için üzerine 5 ml yağ solventi (bunun için 35 ° C'de 4 kısım petrolyum eter, 1 kısım n-propanol ile karıştırıldı) ilave edildi. Sonra üzerine 5 damla %1'lik fenolftalein (% 1 fenolftalein = 1 g, 100 ml saf metanolde çözüldü) ilave edilerek, 0.02N alkolik KOH ile sabit donuk renk elde edilinceye kadar titre edildi. Harcanan KOH miktarı aşağıdaki formülde yerine konarak lipoliz değeri bulundu. Titrasyon için 5 ml'lik hassas mikrobüret kullanılmıştır. Ayrıca 5 damla fenolftalein içeren yağ solventi standart potasyum hidroksit ile titre edilmiş ve bu değer örnek için harcanan potasyum hidroksit değerinden çıkarılmıştır. Lipoliz oranı, ADV (Acid Degree Value) yani asitlik derecesi olarak ifade edilmiştir (Case ve ark., 1985). Hesaplamada aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$ADV = \frac{(A-B) \times N \times 100}{Y}$$

- A= Örnek için harcanan KOH (ml)
 B= Kontrol için harcanan KOH (ml)
 N= KOH' un normalitesi
 Y= Örnekten elde edilen yağın ağırlığı (g)

3.2.2.6. Toplam aerobik mikroorganizma sayımı

Toplam aerobik mikroorganizma sayımı, Plate Count Agar (PCA) (Merck) kullanılarak yapıldı. Süt örneklerinden uygun dilüsyonlar hazırlandı ve dilüsyonlardan steril petri kutularına 1'er ml pipetlendi. Daha önceden otoklavlanıp 45 °C' ye soğutulan PCA'dan yaklaşık 15 ml petrilere dökülüp karıştırılarak

yayılması sağlandı. Agar katılaştıktan sonra petri kutuları ters çevrilerek 35 °C 'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda petride gelişen koloniler sayılarak kaydedildi (Özdemir ve Sert, 1991).

3.2.2.7. Psikrotrofik bakteri sayımı

Psikrotrofik mikroorganizma sayımı, Plate Count Agar (PCA) (Merck) kullanılarak yapıldı. Uygun dilüsyonlardan ekimi yapılan petrilere yaklaşık 15 ml PCA döküldü. Agar katılaştıktan sonra petri kutuları ters çevrilerek 7 ± 1 °C de 10 gün inkübe edildi. Bu süre sonunda agar üzerinde oluşan koloniler psikrotrofik bakteri olarak dikkate alındı (Özdemir ve Sert, 1991).

3.2.2.8. Koliform grubu bakteri sayımı

Koliform bakteri sayımında Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck) kullanıldı. Ekimi yapılan petrilere 45 °C' deki VRBA'dan döküldü ve katılaştıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan koyu kırmızı renkteki koloniler sayıldı (Frank ve ark., 1985).

3.2.2.9. İnokülanlarda laktik asit bakteri sayımı

Laktik asit bakteri sayımı, MRS agar (Merck) kullanılarak yapıldı. Uygun dilüsyonlardan 1'er ml alınarak steril petri kutularına ekim yapıldı. Ekimi yapılan petrilere yaklaşık 15 ml ve pH sı 5.5 'e ayarlanmış steril MRS agar döküldü. Agar katılaştıktan sonra petrilere ters çevrilerek, 37 °C'de 72 saat inkübe edildi. Süre sonunda oluşan koloniler sayıldı (Kitchell ve Shaw, 1975; Garcia ve ark., 1987).

3.2.2.10. İstatistiksel analizler

Sütlerin laktik asit bakterisi ile fermentasyonundan sonra elde edilen verilere 3x4x2 faktöriyel deneme deseni uygulanarak varyans analizleri uygulanmıştır. Daha sonra önemli çıkan parametreler Duncan Multiple Range Test ile test edilmiştir. Tüm bu istatistiksel değerlendirmeler Super ANOVA paket programı kullanılarak yapılmıştır (Anonim, 1989).

4. BULGULAR

4.1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1471'in Lipolitik Aktivitesi

L. lactis subsp. *lactis* 1471'in soğukta bekletilmiş sütte lipolitik aktivitesini belirlemek üzere iki gün soğukta depolanan süte ait bazı özellikler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgenin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere; sütün iki gün depolanmasıyla meydana gelen kendiliğinden lipoliz 1. gün sonunda hızla artmıştır. İkinci gün ise 0. günden yüksek olmak üzere birinci güne yakın bulunmuştur. Soğukta bekletilen sütün pH, TA (%), KM (%) ve yağ miktarında bir değişme gözlenmemiştir. Sütün incelenen mikrobiyolojik özelliklerinde hafif artışlar meydana gelmiştir.

Çizelge 4.1. *L. lactis* subsp. *lactis* 1471'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılan ve soğukta depolanan hammadde çiğ sütlerin özellikleri*

Özellikler	Depolama Zamanı (Gün)		
	0	1	2
pH	6.60 ± 0.000	6.55 ± 0.070	6.60 ± 0.000
TA (%)	0.14 ± 0.007	0.14 ± 0.014	0.14 ± 0.007
KM (%)	11.54 ± 0.332	11.54 ± 0.332	11.54 ± 0.332
Yağ (%)	3.95 ± 0.070	3.95 ± 0.070	3.95 ± 0.070
ADV	0.41 ± 0.007	0.66 ± 0.014	0.58 ± 0.183
Toplam aerobik sayı (Log/ml)	6.18 ± 0.516	6.35 ± 0.395	6.19 ± 0.622
Psikrotrofik bakteri sayısı (Log/ml)	6.11 ± 0.360	6.17 ± 0.664	6.47 ± 0.572
Koliform grubu (Log/ml)	4.60 ± 1.145	4.50 ± 1.032	5.02 ± 0.353

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir.

Soğukta depolanan sütler 0. gün, 1. gün ve 2. gün sonunda ayrı ayrı alınarak, *L. lactis* ile inoküle edilmiş ve lipolitik aktivitesi ADV olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2.). *L. lactis*'in aktivitesini gösteren pH'daki gelişme fermentasyon süresi boyunca düşüş göstermiş, TA (%) ise artış göstermiştir. TA (%) ve pH'daki bu gelişmeler önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Diğer yandan *L. lactis*'in, 0. gün sütünde, ayrıca 1. gün ve 2. gün soğukta bekletilmiş sültere aşılmasıyla dikkate alınan fermentasyon periyotlarında artış gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler neticesinde artışın $P < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır. Duncan çoklu karşılaştırma testi sonucunda artışın 8. ve 48. saatlerde $P < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu gözlenmiştir. Yine sülterin soğukta depolanma süresi arttıkça, *L. lactis*'in lipolitik faaliyeti de artmış ve bu artış 0. gün ile 2. gün arasında önemli bulunmuştur. Fakat günler ile fermentasyon saatleri arasındaki etkileşim önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4 2. Soğukta depolanan sütlerin *L. lactis* 1471 ile aşılansarak fermentasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişimler*

Test Edilen Özellik	Depolama süresi (gün)	İnkübasyon Zamanı (Saat)				
		0	8	24	48	
ADV	0	0.34±0.141	0.60±0.077	0.50±0.000	0.70±0.325	a
	1	0.51±0.106	1.00±0.113	0.76±0.318	0.86±0.388	ab
	2	0.60±0.035	0.90±0.261	0.73±0.247	1.20±0.318	b
		a**	c	ab	c	
pH	0	6.5±0.000	6.2±0.000	5.5±0.000	4.9±0.070	a
	1	6.5±0.070	6.2±0.070	5.4±0.141	4.7±0.353	a
	2	6.5±0.070	6.1±0.212	5.4±0.141	4.7±0.353	a
		a	b	c	d	
TA (%)	0	0.14±0.000	0.19±0.007	0.31±0.007	0.46±0.000	a
	1	0.14±0.007	0.19±0.014	0.34±0.028	0.53±0.049	a
	2	0.13±0.014	0.20±0.021	0.29±0.056	0.53±0.028	a
		a	b	c	d	

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. **: Farklı harf taşıyan ortalamalar P<0.05 düzeyinde birbirinden istatistiksel olarak farklı, aynı harf taşıyanlar ise farksızdır.

4. 2. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 1000'in Lipolitik Aktivitesi

L. cremoris 1000'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılan ve soğukta bekletilen hammadde sütlerin incelenen özellikleri Çizelge 4.3'te bir araya getirilmiştir. Buna göre sütlerin pH ve TA (%) değerlerinde hafif değişimler gözlenmiştir. Diğer yandan sütlerde psikrotrofik mikroorganizma sayıları depolama boyunca artmıştır. Soğukta depolanmış sütlerin ADV değerinde birbirine yakın olmak üzere 1. ve 2. günde 0. güne göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.3. *L. cremoris* 1000' in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan hammadde çiğ sütlerin özellikleri*

Özellikler	Depolama Zamanı (Gün)		
	0	1	2
pH	6.60±0.000	6.70±0.000	6.70±0.000
TA (%)	0.16±0.014	0.17±0.021	0.14±0.014
KM (%)	12.9±0.000	12.9±0.000	12.9±0.000
Yağ (%)	4.00±0.000	4.00±0.000	4.00±0.000
ADV	0.37±0.056	0.41±0.070	0.40±0.077
Toplam aerobik sayı (Log/ml)	5.89±0.091	6.43±0.056	6.47±0.007
Psikrotrofik bakteri sayısı (Log/ml)	5.99±0.077	5.90±0.572	6.77±0.120
Koliform grubu (Log/ml)	3.76±0.070	4.18±0.098	3.90±0.205

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir.

L. cremoris 1000'in soğukta depolanan sütlere aşılansarak fermentasyona tabi tutulmasıyla gözlenen değerler Çizelge 4.4'te verilmiştir. Analiz edilen inkübasyon zamanlarındaki pH ve TA (%)'daki değişimler önemli (P<0.05) bulunmuştur. Araştırmaya konu olan lipoliz değerlerindeki değişimler gerek

nkübasyon süreleri boyunca ve gerekse depolama günleri boyunca artış göstermiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere, sütlerin soğukta depolanma süresi arttıkça *L. cremoris* 1000'in lipolitik faaliyeti artmıştır. Artış inkübasyonun 24. saati le diğer saatleri arasında $P<0.05$ düzeyinde, dikkate alınan tüm günlerde önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Sütlerin soğukta bekletildiği günler ile fermentasyon saatleri arasındaki etkileşim önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Soğukta depolanan sütlerin *L. cremoris* 1000 ile fermentasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişimler*

Test Edilen Özellik	Depolama Süresi (Gün)	İnkübasyon Zamanı (Saat)			
		0	4	8	24
ADV	0	0.33±0.000	0.36±0.035	0.39±0.021	0.58±0.035 a
	1	0.39±0.042	0.49±0.021	0.47±0.014	0.65±0.070 b
	2	0.51±0.007	0.49±0.021	0.56±0.084	0.79±0.120 c
		a**	a	a	b
pH	0	6.55±0.070	6.50±0.000	6.40±0.000	5.85±0.070 b
	1	6.60±0.000	6.50±0.000	6.40±0.000	5.80±0.141 b
	2	6.50±0.000	6.40±0.000	6.40±0.000	5.55±0.070 a
		a	b	b	c
TA (%)	0	0.16±0.007	0.18±0.007	0.19±0.000	0.32±0.035 a
	1	0.15±0.000	0.18±0.007	0.19±0.000	0.31±0.028 a
	2	0.15±0.014	0.19±0.007	0.19±0.007	0.37±0.021 a
		a	b	b	c

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. **: Farklı harf taşıyan ortalamalar $P<0.05$ düzeyinde birbirinden istatistiksel olarak farklı, aynı harf taşıyanlar ise farksızdır.

4.3. *Lactobacillus casei* 111'in Lipolitik Aktivitesi

L. casei 111'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan süte ait özellikler Çizelge 4.5'te sunulmuştur. Çizelgeye göre sütün depolama boyunca pH, TA, KM ve yağ değerlerinde değişme gözlenmezken, incelenen mikrobiyolojik özelliklerinde artışlar gözlenmiştir. Soğukta depolanan sütlerde depolama boyunca ADV değerlerinde sürekli artış saptanmıştır.

Çizelge 4.5. *L. casei* 111'in lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan hammadde çiğ sütün özellikleri*

Özellikler	Depolama Zamanı (Gün)		
	0	1	2
pH	6.50±0.000	6.50±0.000	6.50±0.000
TA (%)	0.16±0.021	0.16±0.007	0.16±0.014
KM (%)	12.35±1.767	12.35±1.767	12.35±1.767
Yağ (%)	3.9±0.141	3.9±0.141	3.9±0.141
ADV	0.47±0.014	0.48±0.007	0.52±0.028
Toplam aerobik sayı (Log/ml)	5.81±1.145	6.37±0.523	6.78±0.042
Psikrotrofik bakteri sayısı (Log/ml)	5.87±1.230	6.38±0.530	6.72±0.042
Koliform grubu (Log/ml)	4.85±1.195	5.39±0.544	5.56±0.332

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir.

Soğukta depolanan sütlerin *L. casei* 111 ile fermentasyonu neticesinde inkübasyon süresi boyunca pH, TA ve ADV değerlerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.6'da sunulmuştur. Fermentasyon boyunca ele alınan bakterinin pH ve TA değişimleri $P<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Diğer yandan *L. casei* 111'in soğukta depolanmış sütlerdeki lipolitik faaliyeti gerek fermentasyon süresi boyunca ve gerekse günler itibarıyla önemli bulunmuştur. Lipolitik değişim ölçüsünü gösteren ADV değerindeki değişimler incelenen fermentasyon periyotlarında özellikle 0., 24. ve 48. saatlerde $P<0.05$ düzeyinde önemli çıkmıştır. Ayrıca sütler soğukta depolandıkça bakterinin lipolitik faaliyeti de artmıştır. Artış 1. ve 2. günler arasında önemsizken, 0. gün ile 1. ve 2. günler arasında önemlidir ($P<0.05$). Sütlerin soğukta beklendiği günler ile fermentasyon saatleri arasındaki interaksiyon önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Soğukta depolanan sütlerin *L. casei* 111 ile aşılansak inkübasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişimler*

Test Edilen Özellik	Depolama Süresi (Gün)	İnkübasyon Zamanı (Saat)				
		0	8	24	48	
ADV	0	0.44±0.091	0.54±0.035	0.43±0.113	0.64±0.098	a
	1	0.47±0.091	0.61±0.176	0.65±0.084	0.93±0.049	b
	2	0.46±0.063	0.61±0.063	0.95±0.148	0.97±0.296	b
		a**	ab	b	c	
pH	0	6.40±0.000	6.25±0.070	5.85±0.070	4.75±0.212	a
	1	6.40±0.000	6.25±0.070	5.55±0.070	4.80±0.282	ab
	2	6.40±0.000	6.30±0.000	5.25±0.353	4.35±0.353	b
		a	a	b	c	
TA (%)	0	0.16±0.014	0.21±0.007	0.28±0.007	0.55±0.042	a
	1	0.17±0.021	0.19±0.014	0.31±0.042	0.52±0.035	a
	2	0.16±0.014	0.21±0.014	0.44±0.134	0.65±0.169	a
		a	a	b	c	

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. **: Farklı harf taşıyan ortalamalar $P<0.05$ düzeyinde birbirinden istatistiksel olarak farklı, aynı harf taşıyanlar ise farksızdır.

4.4. Mezofilik Bakteriler İçin Ele Alınan Kontrol Sütleri ve Lipoliz

Mezofilik bakterilerin (*L. lactis* 1471, *L. cremoris* 1000 ve *L. casei* 111) lipolitik aktivitelerini kıyaslamak amacıyla kontrol amaçlı kullanılan ve soğukta depolanan sütlerin özellikleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Çizelge incelendiğinde soğukta depolanan sütlerin pH, TA (%), KM (%) ve yağ (%) gibi özelliklerinde pek değişme gözlenmezken, sütlerin mikrobiyolojik özelliklerinde depolama boyunca artış olmuştur. Benzer artış, ADV değerinde özellikle depolamanın 2. günü meydana gelmiştir.

Çizelge 4.7. Mezofilik bakterilerin lipolitik aktivitelerini kıyaslamak amacıyla soğukta depolanan ve kontrol olarak kullanılan sütlerin özellikleri

Özellikler	Depolama Zamanı (Gün)		
	0	1	2
pH	6.55±0.070	6.55±0.070	6.55±0.070
TA (%)	0.16±0.014	0.16±0.000	0.17±0.000
KM (%)	12.80±1.131	12.80±1.131	12.80±1.131
Yağ (%)	4.10±0.141	4.10±0.141	4.10±0.141
ADV	0.48±0.000	0.47±0.000	0.51±0.042
Toplam aerobik sayı (Log/ml)	5.94±1.329	7.00±0.007	7.42±0.558
Psikrotrofik bakteri sayısı (Log/ml)	5.96±1.350	7.18±0.254	6.99±0.431
Koliform grubu (Log/ml)	4.75±1.060	5.47±0.657	6.03±1.074

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir.

Araştırmada dikkate alınan ve mezofilik *L. lactis* 1471, *L. cremoris* 1000 ve *L. casei* 111 bakterileri için fermentasyon periyotlarının hepsini kapsayacak şekilde ve aşılama yapılmaksızın yürütülen bu kontrol çalışmasında; 0. , 1. ve 2. gün sütleri 0. , 4. , 8. ve 24. inkübasyon dönemlerinde ADV değerlerinde pek değişme gözlenmemiştir. Nitekim yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre bu günler ve fermentasyon saatleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Buna karşın, kontrol denemesinde 48. saatte ADV değerinde, incelenen her üç günde de hafif bir artış saptanmıştır. Bu artış $P<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Mezofilik bakteriler için dikkate alınan kontrol sütlerinin soğukta bekletildiği günler ile inkübasyon saatleri arasındaki interaksiyon 1. ve 2. günde ve 48. saat için önemli çıkmıştır. İnkübasyonun 48. saatlerindeki ADV değerindeki artış, otoklavlama işlemi sonrası aktivitelerini tamamen veya enzim kaynağına göre büyük ölçüde kaybeden lipazların tekrar reaktif olmasına bağlayabiliriz (Metin, 1999). Öte yandan kontrol sütlerinde istatistiksel anlamda gerek pH ve gerekse TA (%) değerlerinde, dikkate alınan gün ve saatlerde bir değişme gözlenmemiştir.

Çizelge 4.8. Mezofilik bakteriler için kontrol amaçlı kullanılan ve kültür aşılamaaksızın inkübe edilen sütlerde pH, TA (%) ve ADV değerlerinde meydana gelen değişimler*

Test Edilen Özellik	Depolama Süresi (Gün)	İnkübasyon Zamanı (Saat)					
		0	4	8	24	48	
ADV	0. gün	0.46±0.056	0.46±0.014	0.45±0.021	0.45±0.007	0.60±0.028	a
	1. gün	0.50±0.042	0.47±0.028	0.44±0.000	0.44±0.028	0.53±0.000	a
	2. gün	0.40±0.014	0.44±0.000	0.47±0.028	0.42±0.042	0.46±0.000	b
		a**	a	a	a	b	
pH	0. gün	6.50±0.141	6.50±0.141	6.50±0.141	6.50±0.141	6.50±0.141	a
	1. gün	6.50±0.141	6.50±0.141	6.50±0.141	6.50±0.141	6.50±0.141	a
	2. gün	6.45±0.070	6.45±0.070	6.45±0.070	6.45±0.070	6.45±0.070	a
		a	a	a	a	a	
TA (%)	0. gün	0.17±0.000	0.16±0.014	0.16±0.014	0.16±0.014	0.17±0.000	a
	1. gün	0.17±0.007	0.17±0.007	0.17±0.000	0.17±0.000	0.17±0.000	a
	2. gün	0.17±0.000	0.17±0.007	0.17±0.007	0.17±0.007	0.17±0.000	a
		a	a	a	a	a	

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. **: Farklı harf taşıyan ortalamalar P<0.05 düzeyinde birbirinden istatistiksel olarak farklı, aynı harf taşıyanlar ise farksızdır.

4.5. *Lactobacillus helveticus*' un Lipolitik Aktivitesi

L. helveticus' un lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan sütlere ait bazı özellikler Çizelge 4.9'da bir araya getirilmiştir. Soğukta bekletilen sütlere uygulanan analizler neticesinde pH, TA (%), KM (%) ve yağ (%) oranlarında pek değişme gözlenmezken, sütün mikrobiyolojik özelliklerinde depolama boyunca hafif artış gözlenmiştir. Süt örneklerinde soğukta bekletme esnasında 1. ve 2. günde 0. güne göre daha fazla ADV değeri elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. Kontrol amaçlı kullanılan süt ile *L. helveticus*' un lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla soğukta depolanan hammadde çiğ sütün özellikleri*

Özellikler	Depolama Zamanı (Gün)		
	0	1	2
pH	6.60±0.000	6.60±0.000	6.55±0.070
TA (%)	0.14±0.007	0.14±0.000	0.15±0.000
KM (%)	12.00±0.000	12.00±0.000	12.00±0.000
Yağ (%)	3.75±0.070	3.75±0.070	3.75±0.070
ADV	0.39±0.056	0.45±0.070	0.43±0.007
Toplam aerobik sayı (Log/ml)	6.00±0.000	7.54±0.014	7.51±0.000
Psikrotrofik bakteri sayısı (Log/ml)	7.01±0.014	7.31±0.169	7.62±0.0148
Koliform grubu (Log/ml)	6.00±0.000	6.36±0.183	6.37±0.091

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir.

Soğukta depolanan sütün *L. helveticus* ile fermentasyonu neticesinde, ortamın pH değerinde düşme gözlenirken, TA (%) değerinde de beklendiği üzere

artış elde edilmiştir. Gözlenen her iki gelişme istatistiksel anlamda fermentasyon saatleri arasında $P < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Esasen bu gelişmeler aşılana bakterinin sütte aktif olduğunu göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Sütlerin soğukta depolanmasından sonra *L. helveticus* ile yapılan fermentasyonları neticesinde; dikkate alınan inkübasyon dönemlerinde *L. helveticus*'un lipolitik aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. Artış 4. ve 6. saatlerde daha yüksek çıkmıştır ($P < 0.05$). Ayrıca en yüksek ADV değeri 2 gün depolanan sütlerde 48. saatte elde edilmiştir. Buradan anlaşılacağı gibi, sütlerin soğukta depolama süresi arttıkça, *L. helveticus*'un lipolitik faaliyeti de artmıştır, fakat günler ile fermentasyon saatleri arasındaki etkileşim önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Soğukta depolanan sütlerin *L. helveticus* ile aşılana inkübasyonu esnasında ADV, pH ve TA değerlerinde meydana gelen değişimler*

Test Edilen Özellik	Depolama Süresi (Gün)	İnkübasyon Zamanı (Saat)				
		0	2	4	6	
ADV	0	0.35±0.063	0.33±0.042	0.90±0.169	0.85±0.240	a
	1	0.36±0.021	0.36±0.000	0.78±0.049	0.80±0.106	a
	2	0.35±0.063	0.52±0.091	0.75±0.113	0.99±0.304	a
		a**	a	b	b	
pH	0	6.50±0.000	5.75±0.070	4.65±0.070	4.05±0.070	a
	1	6.50±0.151	5.85±0.070	5.00±0.000	4.15±0.212	b
	2	6.35±0.070	5.65±0.070	4.90±0.000	4.00±0.000	a
		a	b	c	D	
TA (%)	0	0.12±0.000	0.26±0.028	0.52±0.077	0.78±0.007	a
	1	0.15±0.000	0.26±0.028	0.38±0.000	0.65±0.042	b
		0.16±0.014	0.29±0.007	0.49±0.014	0.87±0.000	c
		a	b	c	D	

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. **: Farklı harf taşıyan ortalamalar $P < 0.05$ düzeyinde birbirinden istatistiksel olarak farklı, aynı harf taşıyanlar ise farksızdır.

4.6. *L. helveticus* İçin Kullanılan Kontrol Sütleri ve Lipoliz

L. helveticus'un lipolitik aktivitesini kıyaslamak amacıyla soğukta bekletilen ve kontrol olarak kullanılan sütlere ait kimyasal ve mikrobiyolojik özellikler Çizelge 4.9'daki gibidir.

L. helveticus'un lipolitik aktivitesiyle karşılaştırma yapmak amacıyla kontrol olarak kullanılan süt, aşılama yapmaksızın 45 °C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; dikkate alınan fermentasyon saatleri arasında kontrol sütlerinin pH ve TA (%) değerleri arasında bir değişiklik gözlenmemiş ve bu istatistiksel anlamda da önemsiz bulunmuştur. İnkübasyon boyunca ADV değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Fermentasyon süreleri itibarıyla ADV değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır. Bu, kontrol sütlerinin inkübasyonu neticesinde lipoliz oluşmadığı şeklinde değerlendirilebilir. Ayrıca gün ile inkübasyon saatleri arasındaki etkileşim önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.11. *L. helveticus* için kontrol amaçlı kullanılan ve kültür aşılama sızın inkübe edilen sütlerde pH, TA (%) ve ADV değerlerinde meydana gelen değişmeler*

Test Edilen Özellik	Depolama Süresi (Gün)	İnkübasyon Zamanı (Saat)				
		0	2	4	6	
ADV	0	0.35±0.063	0.28±0.028	0.36±0.028	0.38±0.042	a
	1	0.36±0.021	0.36±0.000	0.39±0.000	0.46±0.007	b
	2	0.35±0.063	0.37±0.007	0.37±0.049	0.35±0.007	a
		a**	a	a	a	
pH	0	6.55±0.070	6.55±0.070	6.55±0.070	6.55±0.070	a
	1	6.40±0.000	6.40±0.000	6.40±0.000	6.40±0.000	b
	2	6.35±0.070	6.35±0.070	6.35±0.070	6.35±0.070	b
		a	a	a	a	
TA (%)	0	0.13±0.000	0.13±0.000	0.13±0.000	0.13±0.000	a
	1	0.14±0.000	0.14±0.000	0.14±0.000	0.14±0.000	b
	2	0.16±0.014	0.16±0.014	0.16±0.014	0.16±0.014	c
		a	a	a	a	

*: Çizelgede yer alan her bir değer iki tekerrür ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. **: Farklı harf taşıyan ortalamalar $P < 0.05$ düzeyinde birbirinden istatistiksel olarak farklı, aynı harf taşıyanlar ise farksızdır.

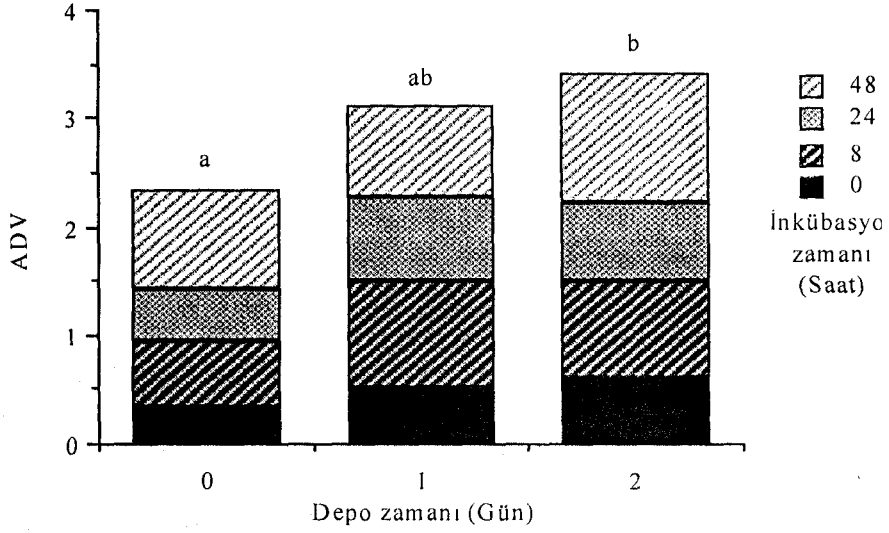
TARTIŞMA VI SONUÇ

1. Mezofilik Laktik Asit Bakterileri ve Lipoliz

Daha önce de belirtildiği üzere, sütte gerek doğal ve gerekse mikrobiyal zım kaynaklı lipolitik parçalanma, sütün soğukta depolanması esnasında kendiliğinden veya teşvik edilmiş olarak artmaktadır. Sütteki yağın parçalanmasıyla meydana gelen bu artış, süt ve ürünlerindeki oluşum düzeyine bağlı olarak, laktik asit bakterilerine mono ve digliserit bazında substrat olabilmekte, diğer yandan uçan serbest yağ asitleri de bazı laktik asit bakterilerinin gelişmesini inhibe etmektedir (Law, 1984; Sellars ve Babel, 1985). Laktik asit bakterilerinin sınırlı düzeyde de olsa lipolitik faaliyetleri söz konusu olmaktadır (Yaygın, 1999). Üretim sürecinde laktik asit bakterilerinin lipolitik aktivitesi, süt ve ürünlerinde meydana gelen lipolizi etkileyen bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan bu çalışmayla soğukta bekletilen sütlerde meydana gelen lipolizin, laktik asit bakterilerinin lipolitik faaliyetlerini ne yönde etkilediği ortaya konması hedeflenmiştir.

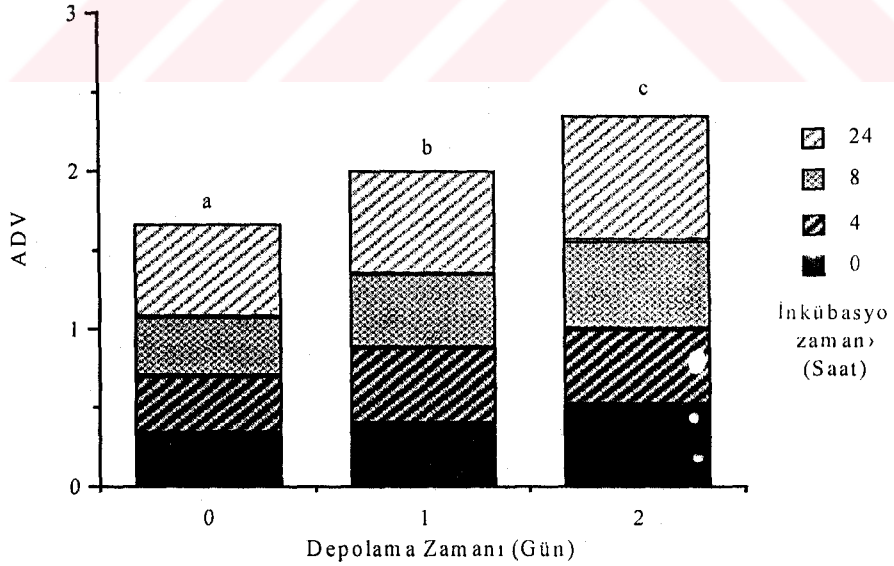
Yukarıda hatırlatılan amaca yönelik olarak dikkate alınan mezofilik bakterilerin lipolitik faaliyetlerini belirlemek amacıyla alınan sütler iki gün süreyle soğukta bekletilerek kendiliğinden lipoliz gelişimi sağlanmıştır. Gerek üç laktik asit bakterisi (*L. lactis* 1471, *L. cremoris* 1000 ve *L. casei* 111) ve gerekse bunlar için kullanılan kontrol amaçlı hammadde sütlerine bakıldığında; lipoliz değeri 0. günde ortalama 0.43 ADV'den, soğukta bekletilmeyle diğer günlerde yaklaşık ortalama 51 ADV'ye çıkmıştır. Soğukta bekletilen sütlerde benzer gelişme Gönç ve Gahun (1979) tarafından da rapor edilmektedir.

Soğukta bekletilen sütlerde *L. lactis* 1471 bakterisi aşılması suretiyle gerçekleştirilen fermentasyonda, inkübasyon süresi boyunca incelenen tüm günlerde lipolitik aktivite artış göstermiştir. ADV değeri 0. günün 48. saatinde 0.90'dan, 2. günde yine aynı saatte 1.20'ye çıkmıştır. Kısaca ikinci günde daha fazla lipolitik parçalanma gözlenmiştir ($P < 0.05$) (Şekil 5.1.). Buradan şu söylenebilir ki, sütlerin soğukta bekletilmesiyle oluşan lipolitik parçalanma, incelenen *L. lactis* 1471'in lipolitik aktivitesini etkilemiştir. Sütün soğukta beklemesiyle kendiliğinden oluşan lipoliz düzeyi, incelenen laktik asit bakterisinin gelişmesi üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi oluşturmamıştır. Bu, elde edilen pH ve TA (%) değerlerinden anlaşılmaktadır.



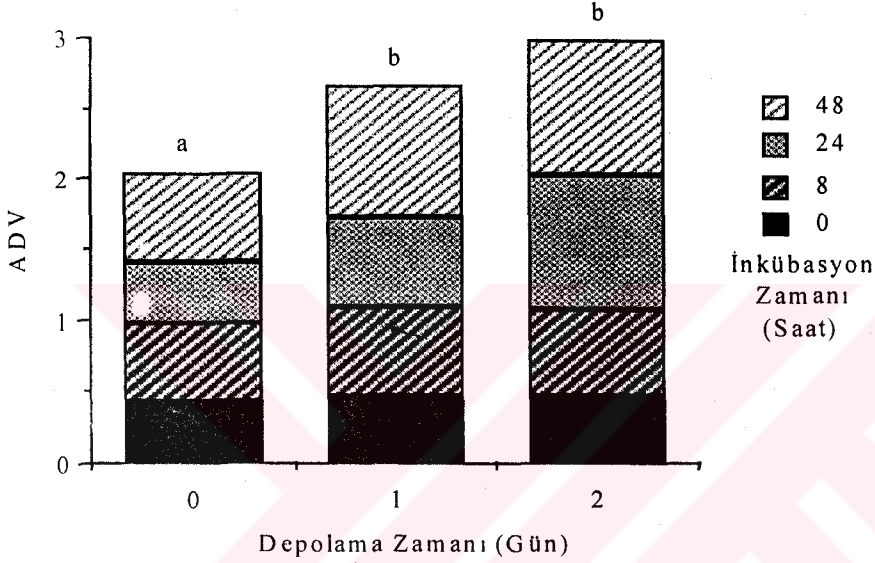
Şekil 5.1 Soğukta depolanmış sütlerde *L. lactis* 1471'in lipolitik aktivitesi

Benzer şekilde soğukta iki gün depolanmış sütlere *L. cremoris* 1000 yapılan aşılama neticesinde lipoliz değeri 0. gündeki fermentasyonda 0.33 ADV'de 0.58'e; 1. günde 0.39'dan 0.65'e ve 2. gündeki fermentasyonda da 0.51'den 0.79'a çıkmıştır. Böylece en fazla lipoliz değeri 2. gündeki fermentasyonun 24. saatin elde edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Soğukta depolanmış sütlerde *L. cremoris* 1000'in lipolitik aktivitesi

Soğukta depolanmış sütlere *L. casei* 111'in aşılması neticesinde; 0. günde ADV değeri 0.44'ten 0.64'e, 1. günde 0.47'den 0.93'e ve 2. gündeki fermentasyonda da 0.46'dan 0.97'ye çıkmıştır. İncelen günlerde en yüksek ADV değeri 2 gün soğukta bekletilmiş sütlerden elde edilmiştir (Şekil 5.3). İkinci gündeki lipolitik aktivite $P < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Soğukta bekletilen sütlerde gelişen lipolizin *L. casei* 111'in gelişmesini olumsuz yönde etkilemediği, pH ve TA (%) değerlerindeki artışlardan anlaşılmaktadır.



Şekil 5.3. Soğukta depolanmış sütlerde *L. casei* 111'in lipolitik aktivitesi

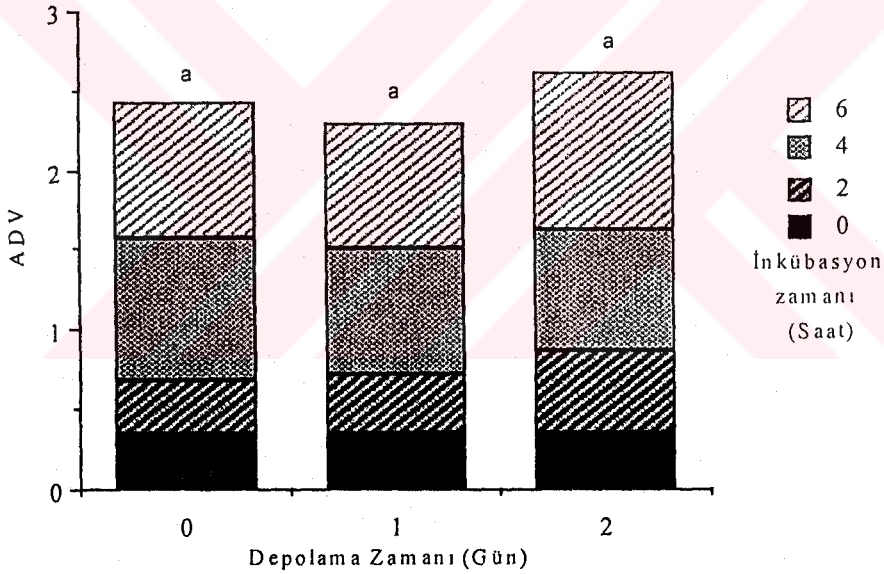
Yukarıda adı geçen mezofilik bakteriler için dikkate alınan kontrol denemesinde, kültür aşılama sürecinin yapılan inkübasyonda; 0., 4., 8. ve 24. saatlerde lipolitik değerde artış gözlenmemiştir. Bununla birlikte 48. saatte hafif bir artış kaydedilmiştir ($P < 0.05$). Bu, süte uygulanan ısı uygulamasından sonra inaktive edilen enzimlerin zamanla aktivasyon kazanabileceğini göstermektedir (Metin, 1999).

Case ve ark. (1985), sütleri ADV değerini dikkate alarak sınıflandırmışlar ve buna göre sütlerde ADV değeri 0.40 ve aşağısında olduğunda normal, 0.70 ila 1.10 arasında olması durumunda sınır çizgisinde, 1.20 değerinde hafif lipoliz olmuş ve 1.50 ila daha büyük değerlerde aşırı lipolize olmuş kabul etmektedirler. Diğer yandan çalışmamızda elde edilen en yüksek değerler dikkate alındığında; en yüksek lipoliz değeri 1.20 ADV ile iki gün soğukta bekletilmiş ve *L. lactis* 1471 ile aşılama sütleri 48. saatte elde edilmiştir. Bunu sırasıyla 2. günün 48. saatinde 0.97 ADV değeri ile *L. casei* 111, yine 2. günün 24. saatinde 0.79 ADV değeri ile *L. cremoris* 1000 takip etmiştir. Bu üç bakteriye ait kontrol sütlerinde ise 2. gün 48. saatteki ADV değeri 0.46 olarak bulunmuştur. Bu değerlendirmeye göre *L. lactis* 1471'in ulaştığı ADV değeri hafif lipolize karşılık gelmektedir. Diğer bakterilere ait lipoliz değerinin sınır çizgisinde olduğu görülmektedir.

5.2. *L. helveticus* ve Lipoliz

Yukarıda soğukta bekletilen sütlerde meydana gelen kendiliğinden lipoliz neticesinde oluşan mono ve digliseritlerin laktik asit bakterilerine substrat olabileceği ya da açığa çıkan serbest yağ asitlerinin ise laktik asit bakterileri üzerinde inhibisyon etki oluşturabileceği ifade edilmiştir.

Çalışmamızda -ele alınan *L. helveticus*'un soğukta depolanan sütlere aşılmasıyla; 0. gün 0.35 ADV olan sütteki lipoliz değerinin fermentasyonun 6. saatinde 0.85'e, 1. gün 0.36 ADV olan sütteki lipoliz değerinin fermentasyonun aynı saatinde 0.80'e, 2. gün 0.35 ADV olan sütteki lipoliz değerinin 0.99'a yükseldiği görülmüştür. Bu bakterinin lipolitik faaliyetinin 2. gün 6. saatte en yüksek olduğu (0.99 ADV) ortaya çıkmıştır. Yine bu bakteriye ait kontrol sütünde soğukta depolamadan sonraki 45 °C'de bekletmelerde istatistiksel anlamda önemli bir değişme gözlenmemiştir.



Şekil 5.4. Depolanmış sütlere *L. helveticus*'un lipolitik aktivitesi

Lipolizin ileri aşamaları süt ve ürünlerinde arzu edilmemekte ve düz zincir uzunluğunda 12 karbon atomlu veya daha az sayıda karbon atomu içeren yağ asitleri; butirik asit, inek kokusu, pis koku, keçi kokusu, acı, sabunumsu tat ve ransit tat gibi bozukluklara neden olmaktadır. Fakat 14 karbon atom sayısından büyük olan yağ asitleri herhangi bir lipolitik bozukluğa neden olmazlar (Christen ve ark., 1993). Dolayısıyla süt ve ürünlerindeki yağ parçalanma ürünlerinin belli seviyeyi aşmaması gerekmektedir. Bu seviye içme sütü gibi ürünlerde düşük olduğu halde, peynir gibi ürünlerde daha yüksektir. Yine de yağ parçalanma ürünleri ortamda belli seviyede tutulmalıdır. Peynir gibi ürünlerde kullanılan laktik asit bakterisi seçiminde bu konunun da gözönünde bulundurulması ve kullanılan sütün ADV değerinin belirlenmesinden sonra ürüne işlenmesi gerekir. Çünkü bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, laktik asit bakterilerinin de lipolize katkısı olmaktadır. Bu katkı, sütlerin soğukta bekletilmesiyle daha da artmaktadır. İleri lipolizin önlenmesinde sütlerin taze olarak ürüne işlenmesi önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Anonim, 1989. *Super ANOVA the accessible general linear modeling package*. 1984 Bonita Avenue. Barkely, California.
- Anonim, 1991. *Bulletin of the Int. Dairy Federation*. Monograph on determination of free fatty acids in milk and milk products. 265: 2-52.
- Atamer, M., 1993. *Tereyağ teknolojisi*. A Ü, Ziraat Fak., Yay. No: 1313, Ankara. 89.
- Case, R. A., Bradley, R. L., Williams, R. R., 1985. Chemical and physical methods. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. In: G.H. Richardson (Editor) APHA, Washington, D.C. 327-329.
- Castagnetti, G. D., Chiavari, C., Bagni, A., Losi, G., 1987. Lipolysis in refrigerated milk. *Scienza e Tecnica Lattiera-Casearia*, 38(6): 521-533.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J. C., Lamberet, G., Lenoir, J., Tourneur, C., 1987. Microbiological and biochemical aspects of ripening, *Cheese Making: Science and Technology* (Editor: Andre Eck) Lavoisier Publishers Inc, Paris. 540.
- Christen, G. L., Chowming, L., 1994. Impact of raw milk quality attributes on milk lipolysis. *Tennessee Farm & Home Science*, 170: 39-43.
- Christen, G. L., Shen, N., Maruri, J. L., 1993. Recovery of short chain-length fatty acids from milk by several methods. *Dairy Food and Env. Sanitation*, 13(12): 707-709.
- Fox, P. F., 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal Dairy Science*, 72 :1379-1400.
- Frank, J. F., Marth, E. H., 1988. Fermentations, 13. *Fundamentals of Dairy Chemistry* (Noble P. Wong) Van Nostrand Reinhold Company, New York, 779.
- Frank, J. I., Hankiw, C., Koburga, J. A., Marth, E.H., 1985. Tests for groups of microorganisms, Chap. 9. *Standart Methods for the Examination of Dairy Products* (Editors: G. H. Richardson) APHA. Washington. D. C. 412.
- Garcia, M. C., Otero, A., Garcia, M. L., Moreno, B., 1987. Microbiological quality and composition of two types of Spanish sheep's milk cheeses (Manchego and Burgos varieties). *Journal Dairy Research*. 54: 551-557.
- Gobbettia, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Rosaria Corbo, M., Massini, R., Fox, P., 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl and aw on the proteolytic and lipolytic activities of of cheese related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(10): 795-809.
- Gobbetti, M., Fox, P. F., Smacchi, E., Stepaniak, L., Damiani, P., 1996. Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of Food Biochemistry*, 20(3): 227-246.
- Gönç, S., Gahun, Y., 1979. Soğutularak saklanması sırasında sütte oluşan değişimler. *Gıda*, 4(6): 205-211.
- Gull-Simonsen, F., Christensen, P. S., 1995. Cooling, storage and quality of raw milk. *Danish Institute of Animal Science*, No: 39. 61.

- Jandal, J. L., 1996. Effect of thermal, physical and chemical treatments on FFA contents in Awassi sheep milk, *Small Ruminant Research*, 22(1): 49-53.
- Khalid, N. M., Marth, E. H. 1990. Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus casei*. *Journal Dairy Science*. 73: 3068-3076.
- Kılıç, S. 2001. *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakteriler*. Ege Üniversitesi Ziraat Fak., Yay. No: 542, İzmir. 451.
- Kılıç. S., Kavas, G., Uysal, H., 2000. Süt Teknolojisi Açısından Psikrotrof Bakteriler. *VI Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı*. 2000, Tekirdağ. 431-442.
- Kitchell, A. G., Shaw, B., 1975. Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. In: J.G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting (Editors) *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods*, Academic Press, London. 209- 220.
- Kurt, A., Çakmakçı, S., Çağlar, A., 1993. *Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metodları Rehberi*. A Ü, Ziraat Fak., Yay. No: 18, Erzurum. 238.
- Law, B. A. 1984. Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses. *Progress in Industrial Microbiology*.19:245-283.
- Lukasova, J., 1987. Mikrobial lipolysis in milk. *Mikroalbini lipolyza v mlece. Veterinarstvi*, 37(7): 332-333.
- Metin, M. 1999. *Sütün Bileşimi ve İşlenmesi*. E.Ü. Mühendislik Fak., Yay. No: 33, İzmir. 793.
- Monnet, V., Bars, D. L., Gripon, J. C. 1987. Purification and characterization of a cell wall proteinase from *Str. lactis* NCDO 763. *J. Dairy Research* 54:247-255.
- Needs, E. C., 1992. Effect of long-term deep-freeze storage on the condition of the fat in raw sheep's milk. *Journal of Dairy Research* ,59(1): 49-55.
- Olivecrona, T.,1980. Flavour imperment of milk and milk products due to lipolysis. Biochemical aspects of lipolysis in bovine milk. *Int.Dairy Fed.Bull.* 118pp.19-25.
- Özdemir, S., Sert, S., 1991. *Gıda Mikrobiyolojisi Tatbikat Notları*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 128, Erzurum.
- Panfil-Kuncewicz, H., Zuchowska, M., Kuncewicz, A., 1998. Lipolytic changes in UHT milk. *Acta Academiae Agriculturae ac Technicae olstenensis, Technologia Alimentorum* ,No. 31: 91-100.
- Sellars, R. L., Babel, F. J. 1985. *Cultures far the manufacture of dairy products*. Chp. Hansens's Lab. Inc. Milmankee, Wisconsin 62pp.
- Sneath, P. H. A., Mair, N.S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology* v.2, Williams and Wilkins, Baltimore, 1066,1209-1234.
- So, M. H., Yoon, S. S., Kim, Y.B., 1992. Psychrotrophic microflora in raw milk and their proteolytic and lipolytic ability. *Korean Journal of Dairy Science* , 14(1): 43-51.
- Sousa, M. J., Malkata, F. X. 1997. Ripening of ovine milk cheeses, effects of plant rennet ,pasteurization, and addition of starter on lipolysis. *Food Chemistry* 59(3):427-432
- Tamime, A. Y., Deeth, H. C. 1980. Yogurt: Technology and Biochemistry. *J. Food Prot.* 43:939-977.

- Tekinşen, O. C. ve Atasever, M. 1994. *Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür*. Selçuk Üniv. Veteriner Fak. Yayın ünitesi, Konya. 150s.
- Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and Their relation to cheese Ripening. *J.Dairy Science* 76:329-350
- Weinrauch, J. L. 1988. Lipids of milk: *Deterioration. Fundamentals of Dairy Chemistry*. (Editor: Noble P. Wong). Van Nostrand Reinhold Company, New York. 766.
- Yaygın, H. 1999. *Yoğurt Teknolojisi*. Akdeniz Univ. Yay. No:75, Antalya. 331.



ÖZGEÇMİŞ

1978 Yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yılda Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı. Eylül 2000 ve Şubat 2002 yılları arasında Van Organize Sanayi Bölgesinde faaliyet gösteren Tat-San Yemek Fabrikasında sorumlu yönetici olarak görev yaptı. 2002 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen bu görevine devam etmektedir.



