

**GELENEKSEL YOĞURTLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
MALDI TOF MS BİOTYPER SİSTEMİ İLE TANIMLANMASI VE BAZI STARTER
KÜLTÜR ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Şeyma Betül ENCU*, Esra ACAR SOYKUT, İbrahim ÇAKIR

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş / Received: 09.09.2022; Kabul / Accepted: 10.11.2022; Online baskı / Published online: 28.11.2022

Encu, Ş.B., Acar-Soykut, E., Çakır, İ. (2022). Geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI TOF MS biotyper sistemi ile tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. GIDA (2022) 47 (6) 1059-1082 doi: 10.15237/ gida.GD22088

Encu, Ş.B., Acar-Soykut, E., Çakır, İ. (2022). Isolation of lactic acid bacteria from traditional yoghurts, identification by MALDI TOF MS biotyper system and determination of some starter culture properties. GIDA (2022) 47 (6) 1059-1082 doi: 10.15237/ gida.GD22088

ÖZ

Bu çalışmada Batı Karadeniz Bölgesi'nde, beş ilden toplanan, geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması, bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Suşların tanımlanması MALDI-TOF MS Biotyper sistemi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen 84 izolattan 2'si *Lactobacillus helveticus*, 2'si *Lactiplantibacillus plantarum*, 3'ü *Limosilactobacillus fermentum*, 1'i *Enterococcus faecalis* ve 76'sı *Lactobacillus delbrueckii* olarak tanımlanmıştır. İzolatların eritromisin, teikoplanin, streptomisin, rifampisin, amfisilin, klindamisin, sefotaksim, kloramfenikol, tetrasiklin ve vankomisine karşı duyarlı, nalidiksik asit, siprofloksasin, ofloksasin, gentamisin ve trimethoprim sülfametoksazole karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. İzolatların *Salmonella* Typhimurium ve *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ancak *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir. İzolatlardan 8'inin ürettiği asitliğin %0.9 ve 0.95 arasında olduğu bulunmuştur. Ayrıca 74 izolattan diasetil üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Starter olma potansiyeli yüksek 26 suşun proteinaz aktivitesi ve fajlara karşı direnç durumu incelenmiştir. Suşlardan 5'inin proteolitik aktivite göstermediği ve faj direnci testi sonuçlarına göre izolatlardan 8 tanesi Φ709-X1 fajına karşı duyarlı olup, 12 adet *Lactobacillus delbrueckii* izolatının ise çalışmada kullanılan 15 farklı bakteriyofaja karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre izole edilen kültürlerin incelenen özellikler açısından starter kültür olarak kullanılabilme potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, MALDI TOF MS, starter kültür özellikleri

**ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONAL YOGHURTS,
IDENTIFICATION BY MALDI TOF MS BIOTYPER SYSTEM AND DETERMINATION
OF SOME STARTER CULTURE PROPERTIES**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to isolate, identify, and determine some starter culture characteristics of lactic acid bacteria from yoghurts produced by traditional methods, collected from five provinces in the Western Black Sea Region. Identification of strains was performed with the MALDI-TOF MS

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: betulkuloglu@hotmail.com

☎: (+90) 374 254 1000 / 4848

Şeyma Betül Encu ORCID no: 0000-0001-9155-1868

Esra Acar Soykut ORCID no: 0000-0002-6639-4212

İbrahim Çakır ORCID no: 0000-0001-7775-1871

Biotyper system. Of the 84 isolates isolated, 2 were identified as *Lactobacillus helveticus*, 2 as *Lactiplantibacillus plantarum*, 3 as *Limosilactobacillus fermentum*, 1 as *Enterococcus faecalis* and 76 as *Lactobacillus delbrueckii*. The isolates were found to be susceptible to erythromycin, teicoplanin, streptomycin, rifampicin, ampicillin, clindamycin, cefotaxime, chloramphenicol, tetracycline, and vancomycin, and resistant to nalidixic acid, ciprofloxacin, ofloxacin, gentamicin and trimethoprim sulfamethoxazole. It was determined that the isolates showed antimicrobial activity against *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* O157:H7, but the antimicrobial effect was low against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. The acidity produced by 8 of the isolates was found to be between 0.9 and 0.95 %. In addition, it was determined that 74 isolates produced diacetyl. Proteinase activity and resistance to phages of 26 strains with high starter potential were investigated. It was determined that 5 of the strains did not show proteinase activity and according to the phage resistance test results, 8 of the isolates were sensitive to Φ 709-X1 phage, and 12 *Lactobacillus delbrueckii* isolates were resistant to 15 different bacteriophages used in the study. According to the results of the study, it was determined that the isolated cultures have the potential to be used as a starter culture in terms of the investigated characteristics.

Keywords: Lactic acid bacteria, MALDI TOF MS, starter culture properties

GİRİŞ

Starter kültürler, fermentasyon işlemlerinin verimliliğini artırmak için kullanılan, seçilmiş mikrobiyal preparatlar olarak tanımlanmaktadır (Vinicius De Melo Pereira vd., 2020). Fermentasyon kolaylığı ve laktik asit bakterilerinin (LAB) çeşitli fonksiyonel özellikleri, onları fermente gıdaların üretiminde uygun bir starter kültür haline getirmektedir (Kavitake vd., 2018). Bu bakteriler, organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve benzeri maddeler, postbiyotik bileşikler üretmek suretiyle gıdada bulunan patojen ve bozucu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermektedirler (Moradi vd., 2020; Chen vd., 2020). Laktik asit bakterilerinin ürettiği aminoasit ve peptitler sayesinde fermente ettiği ürüne duyuşal özellikler kazandırması, yine aynı şekilde ürettikleri çeşitli polisakarit veya glikanlar sayesinde ürünün dokusunda iyileştirici etkisinin olması, ürünün besinsel değerini artırması ve ürünün raf ömrünü uzatması gibi özellikleri laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımını cazip hale getirmektedir (Canon vd., 2020).

Starter kültür olarak kullanılacak bakterilerin kesin tanısının yapılmış olması ve endüstriyel özelliklerinin doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılabilmesi konusunda belirleyici olan endüstriyel özellikler; laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, aroma maddeleri üretimi, antimikrobiyal aktivite ve bakteriyofaj

dirençlilik gibi özellikleridir (Demirgöl ve Sağdıç, 2017; Aydın ve Çakır, 2022). Laktik asit bakterilerinin laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaları en önemli özelliklerinden biridir. Laktik asit ortam pH'ını düşürerek ortamda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini inhibe eder. Ayrıca asit üretimini önemli kılan bir diğer özellik ise pH düşüşüne bağlı olarak proteinlerin koagüle olması yani sütün pıhtılaşarak yoğurt oluşum mekanizmasının temelini oluşturmasıdır. Ancak fermentasyon sırasında yavaş gelişen asitlik serum ayrılması gibi kalite kusurlarına neden olmaktadır (Shah, 2017; Uzunsoy, 2018). Laktik asit bakterileri yaşamsal döngüleri için gerekli olan amino asitleri sentezleyemezler bu yüzden bu aminoasitlerin eksojen kaynaklardan karşılanması zorunludur. Laktik asit bakterileri, gelişimleri için ihtiyaç duydukları aminoasitleri, proteinaz ve peptidaz enzimleri sayesinde ortamdaki karşılarlar. Böylece proteolitik aktivite ile bakterilerin gelişimleri teşvik edilirken, protein parçalanma ürünleriyle tipik aroma ve tat oluşumu gerçekleşir. Ancak yüksek proteolitik aktivite gösteren suşların yoğurt yapımında kullanılması durumunda yoğurtta acı tat oluşumu gözlemlenebilir (Kılıç 2008). Starter kültürlerde aranan en önemli özelliklerden birisi de suşların fajlara karşı dirençli olmasıdır. Kullanılacak kültürlerden birinin bile ortamda bulunabilecek faj veya fajlara duyarlı olması, fermentasyonun yavaşlaması veya durma noktasına gelmesi demektir; dolayısıyla bu durum ciddi bir ürün

kayıbı ve ekonomik zarar anlamına gelmektedir (Acar Soykut ve Tunail, 2009).

Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılabilirliği konusunda birçok çalışma yapılmıştır (Bratulić vd., 2021; Çelik vd., 2021; Islam vd., 2021; Kılıç vd., 2022). Pourahmad ve Assadi (2007), geleneksel starter kültürlerin kullanımını amaçladıkları çalışmada izole ettikleri *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşları ile yoğurt üretimi sağlamışlardır. Üretim sonrası yoğurtların kimyasal, mikrobiyal ve organoleptik özelliklerini incelemişler ve yoğurt üretiminde geleneksel starter kültürlerin yeterli olabileceğini, bu kültürlerin kullanılabilirliğini ve ulusal kültür koleksiyonuna eklenebileceğini belirtmişlerdir. Akoğlu vd., (2017) Mengen peynirlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin asidifikasyon kapasitelerini ve proteolitik aktivitelerini incelemişlerdir. En iyi asidifikasyon ve proteolitik aktiviteye sahip izolatları starter kültür olabilecek suşlar olarak işaretlemişlerdir.

MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) Biotyper, bir organizmanın özgün proteomik parmak izini belirlemek için kullanılan ve dakikalar içerisinde mikroorganizmaların spesifik ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasını sağlayan bir sistemdir. Bu sistem, çok sayıda geleneksel ve biyokimyasal tanımlama yönteminin yerine geçmiş ve DNA dizi analizlerindeki birden fazla adım ve farklı gereksinimlerinin yükünü ortadan kaldırmıştır (Akyar, 2011; Aydın ve Ardıç, 2019; Bruker, 2019). MALDI-TOF MS Biotyper yönteminin klasik yöntemlere göre en büyük avantajı, çok kısa bir sürede tanımlama yapılabilmesidir. Bu teknik, tanısı yapılacak kültür için kullanılan besiyerlerinden ve üreme koşullarından etkilenmeden çalışabilmektedir. Ancak analiz için alınacak koloninin 48 saatten daha yaşlı olmaması gerekmektedir. Yaşlı kültür ile çalışılması durumunda, kültürlerde meydana gelen ribozomal proteinlerin parçalanmasına bağlı olarak ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu düşmektedir (Wieser vd., 2012). MALDI-TOF MS Biotyper yöntemi mikrobiyolojik tanımlama için nispeten

yeni bir yöntem olduğundan yanlış tanımlama yapılması ya da tanımlama yapılamamasının nedeni genellikle veri tabanında yeterli referans spektrumlarının bulunmamasıdır. Veri tabanının gün geçtikçe gelişmesi ile bu eksikliğin giderileceği düşünülmektedir. MALDI-TOF MS Biotyper'in tür bazında doğru tanımlama oranının %84.1 ile %95.2 arasında değiştiği bildirilmiştir (Yılmaz, 2014).

Ülkemizde bulunan fermente ürün zenginliğinden faydalanmak ve starter kültür olarak kullanım potansiyeli olan suşların sayısını arttırmak, yerli starter kültür üretim çalışmalarına ve mikrobiyal gen kaynaklarımızın korunmasına katkı sağlamak amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamında geleneksel olarak üretilmiş olan yoğurt örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu yapılmış, MALDI TOF MS Biotyper sistemi ile tanımlanan bu suşların, bazı teknolojik özellikleri ve antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada Batı Karadeniz Bölgesi'nden (Bolu, Bartın, Kastamonu, Karabük ve Zonguldak illerinden) geleneksel yöntemlerle manda ve inek sütü ile üretilen yoğurtlar temin edilmiştir (Çizelge 1). Toplanan örnekler steril kaplarda soğutucu hazne içerisinde laboratuvara getirilmiş ve aynı gün içerisinde izolasyon yapılmaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

İzole edilen suşların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan indikatör mikroorganizmalar Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Araştırmada *Escherichia coli* O157:H7 KUEN 1461 (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonu), *Salmonella* Typhimurium ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ve *Bacillus cereus* RSKK709 türleri indikatör olarak kullanılmıştır. Suşların antibiyotiklere olan duyarlılıklarının ölçülmesi amacıyla da çeşitli antibiyotik diskleri (Liofilchem, İtalya) kullanılmıştır. Çalışmada

kullanılan antibiyotiklere ait bilgiler Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 1. Bakteri izolasyonu yapılan yoğurt örneklerine ait bilgiler

Table 1. Information of yoghurt samples isolated from bacteria

Örneklere Ait Bilgiler / Information of Samples		
Alındığı İl / Province Taken	Kaynak / Source	Sayı / Number
Bartın	Manda yoğurdu	15
Bolu	Manda yoğurdu	15
	İnek yoğurdu	10
Karabük	Manda yoğurdu	15
Kastamonu	Manda yoğurdu	10
Zonguldak	Manda yoğurdu	10

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri

Table 2. Antibiotic discs used in study

Adı / Name	Konsantrasyonu / Concentration (µg/disk)
Eritromisin (E)	15
Trimetoprim (TM)	5
Nalidiksik Asit (NA)	30
Siprofloksasin (CIP)	5
Teikoplanin (TEC)	30
Streptomisin (S)	300
Rifampisin (RD)	5
Ampisilin (AMP)	10
Sefotaksim (CTX)	30
Ofloksasin (OFX)	5
Klindamisin (CD)	2
Kloramfenikol (C)	30
Tetrasiklin (TE)	30
Trimetoprim	25
sülfametoksazol (SXT)	
Gentamisin (CN)	10
Vankomisin (VA)	5

Metot

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu, fenotipik, biyokimyasal ve moleküler tanımlanması

Laboratuvara getirilen yoğurt numunelerinden 10 g alınarak 90 mL MRD (Maximum Recovery Diluent) ortamında homojenize edilmiş sonra

aynı ortamda 10^{-6} desimale kadar seyreltme yapılmıştır. Her bir seyreltiden 2 paralel olacak şekilde 0.1 mL alınarak MRS Agar ve M17 Agara yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. MRS Agar Petrileri 37°C 'de, M17 Agar Petrileri ise 42°C 'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra Petrilerde gelişen farklı tipteki koloniler seçilmiş, MRS Broth ve M17 Broth besiyeri ortamlarında geliştirilerek saflık kontrolleri yapılmıştır. Kültürler, %20 steril gliserol ortamında stoğa alınarak -18°C 'de muhafaza edilmiştir (Randazzo vd., 2004; Somashekaraiah vd., 2019).

İzolatların morfolojik, fenotipik ve biyokimyasal özelliklerini tanımlamak amacıyla Gram boyama, katalaz reaksiyonu (Temiz, 1996), glukozdan gaz oluşturma (Randazzo vd., 2004), farklı sıcaklıklarda (10° , 15° ve 45°C) gelişme, farklı tuz konsantrasyonlarında (%2, %4 ve %6.5 NaCl) gelişme ve farklı pH'larda (pH 3.5 ve pH 9) gelişme testleri yapılmıştır (Hugas, 1998; Yüce, 2017).

İzolatların moleküler düzeyde tanımlanması için MALDI-TOF MS Biotyper sistemi (Bruker, Almanya) kullanılmıştır. Tanımlama işlemi Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezinde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma tanısında direkt transfer yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem Petride geliştirilen kültürün direkt olarak cihaza ait tabla üzerinde işaretleri bölgelere aktarılması ve kültürün lazer ışınlarından korunması için matriks ile kaplanması şeklindedir. Matriks olarak her bir kültür 1 µL HCCA (α -siyano-4- hidroksisinnamik asit) ile kaplanmıştır ve oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. Daha sonra tabla cihaza verilerek sonuç alma işlemi gerçekleştirilmiştir (Aydın ve Ardıç, 2019; Aydın vd., 2020).

İzolatların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

İzole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin ölçümü amacıyla Charteris vd., (1998) tarafından önerilen disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Mikroorganizmaların antibiyotik direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla sıvı

besiyerinde geliştirilmiş, 18-24 saatlik aktif LAB kültürlerinden steril eküvyonla alınan kültür, aseptik koşullarda MRS ve M17 Agar yüzeyine tüm yüzeyi kapatacak şekilde yayılmıştır. Daha sonra antibiyotik diskleri, bir Petriye 6 antibiyotik diski gelecek şekilde disk dağıtıcı (Liofilchem, İtalya) ile yerleştirilmiştir ve Petriler düz bir şekilde inkübatöre konularak, indikatör mikroorganizmanın gelişebileceği uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu disklerin etrafında oluşan zonlar mm olarak ölçülmüştür (Cheesbrough, 2002).

İzolatların yüzde asitlik ve asidifikasyon özelliklerinin belirlenmesi

İzole edilen laktik asit bakterilerinin %asit üretim miktarlarını belirlemek amacıyla 18 saatlik aktif kültürlerden 0.1 mL alınarak 10 mL yağsız süt tozu besiyerine ilave edilmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan örneklerden steril bir şekilde 6. ve 24. saat sonunda 2 mL alınarak 1-2 damla fenol fitalein damlatılmış ve 0.1 N NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan NaOH miktarına göre üretilen asitlik belirlenmiş ve %laktik asit miktarı olarak verilmiştir (Kırmacı, 2010; Tortum, 2018).

İzolatların asidifikasyon kapasitesi, pH değerinin zaman içindeki değişiminin ölçümü ile belirlenmiştir. Bu amaçla 18 saatlik aktif kültürlerden 10 mL yağsız süt tozu besiyerine 0.1 mL ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan kültürlerden 6. ve 24. saat sonunda 2'şer mL örnek alınarak pH metre ile pH'ları ölçülmüştür ve sonuçlar Δ pH olarak verilmiştir (Ertürkmen ve Öner, 2015; Ribeiro vd., 2021).

İzolatların proteinaz aktivitesinin kalitatif belirlenmesi

Proteinaz testi için 1 g yağsız süt tozu ve 1.5 g agaroz 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve mikrodalgada kaynatılarak besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri Petrilere dökülmüş ve her bir Petriye 6 örnek konulacak şekilde Petri kapları alttan çizilmiştir. Ekim amacıyla her bakteri kültüründen 10 μ L damlatılmış ve kuruması beklendikten sonra

Petriler 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakılmış ardından Petrilere oluşan zon çapları mm olarak ölçülmüştür (Fox, 1989).

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal aktivite testleri agar yüzeyine nokta ekim yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla önce MRS Agar yüzeyine aktif kültürlerden yaklaşık 1-2 μ L olacak şekilde nokta ekim yapılmış ve inkübatörde uygun sıcaklıkta 24 saat gelişmeleri sağlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan patojenler (*E. coli* O157:H7 KUEN 1461, *S. Typhimurium* ATCC 13076, *Lb. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 6538 ve *B. cereus* RSKK709) ise Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde geliştirilmiştir. İzolatların gelişmelerinin ardından 5 mL Tryptic Soy Yumuşak Agar (%0.7 agar içeren) besiyerine 100 μ L aktif patojenlerden ilave edilerek karıştırılmış ve gelişmiş olan izolatların üzerine Petri yüzeyini kaplayacak şekilde dökülmüştür. Daha sonra Petriler patojenlerin gelişmesine uygun olan 37°C'ye bırakılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır. Ardından oluşan zon çapları mm olarak ölçülmüştür (Fleming vd., 1975).

İzolatların diasetil oluşturmalarının kalitatif belirlenmesi

İzolatların sitratı metabolize ederek diasetil oluşturup oluşturmadıklarını incelemek amacıyla 18-24 saatlik aktif kültürler 5'er mL steril yağsız süt tozu besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu tüplerden 1'er mL alınarak üzerlerine 0.5 mL α -Naftol (%1 w/v) çözeltisi ve KOH (%16 w/v) ilave edilmiş ve 30°C'de 1 dakika inkübe edildikten sonra besiyeri yüzeyinde kırmızı renkte halka oluşumu diasetil üretimi olarak değerlendirilmiştir (Franciosi vd., 2009).

İzolatların bakteriyofajlara karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

İzolatların faj dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla, araştırmacıların daha önceki çalışmalarından izole ettikleri ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonunda bulunan fajlar kullanılmıştır. İzolatlara karşı restriksiyon fragment uzunluk

polimorfizmi (RFLP), yapısal protein şablonları ve konakçı spektrumlarına göre sınıflandırılan 15 farklı *Lb. delbrueckii* subps. *bulgaricus* fajı kullanılmıştır (Acar Soykut ve Tunail, 2014).

İzolatların fajlara karşı duyarlı olup olmadıklarını belirlemek için çift tabaka agar yöntemi (Acar Soykut, 2007) kullanılmıştır. Bu amaçla logaritmik fazda olan bakteri, 3 mL yumuşak agar ile karıştırılarak önceden dökülmüş agar plakları üzerine yayılmıştır. Daha sonra titresi 10^8 - 10^9 pfu/mL olan fajlar katılaştıran agar yüzeyinde işaretlenmiş bölgelere 10'ar µL olacak şekilde damlatılmıştır. İnkübasyon sonrası işaretlenen bölgelerde plak oluşumu varlığı izolata o bölgedeki faja duyarlı olduğunu göstermiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

İzolatların fenotipik, biyokimyasal ve MALDI-TOF MS Biotyper tanı sonuçları

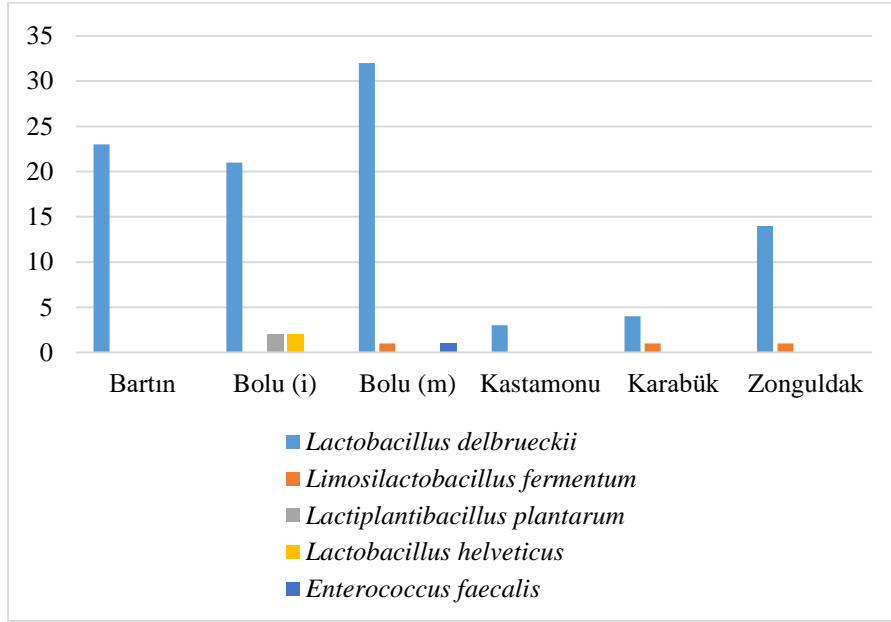
Çalışmada Batı Karadeniz'in 5 farklı ilinden geleneksel olarak üretilmiş 75 adet inek ve manda yoğurdu örneğinden seçici besiyeri kullanılarak (M17 ve MRS), Gram boyama ve katalaz reaksiyonu sonuçlarına göre muhtemel laktik asit bakterileri izole edilmiştir. Gram pozitif ve katalaz negatif özellik gösteren 84 adet muhtemel izolata 82 tanesi glukozdan gaz oluşturma yeteneklerine göre homofermantatif özellikte bulunmuştur. İzolatlardan *Lb. delbrueckii* Z4-3 hariç diğerlerinin 45°C'de iyi geliştiği ancak 10-15°C gibi düşük sıcaklıklarda gelişimin zayıfladığı, dolayısıyla termofil karakterde oldukları belirlenmiştir. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimlerine bakıldığında ise %2 NaCl konsantrasyonunda tüm izolatların geliştiği; %4 NaCl konsantrasyonunda ise 7 izolata (*Lb. delbrueckii* P2, P3-3, P4, Y15, Z1, Z4-3, Br17-2) geliştiği; %6 NaCl konsantrasyonunda ise yalnızca 5 izolata (*Lb. delbrueckii* P2, P4, Y15, Z1, Z4-3) geliştiği görülmüştür. İzolatların farklı pH değerlerinde gelişmelerine bakıldığında 4 izolat (Br17-2, Y1, P1, Z3-3) hariç tüm izolatların pH 9'da gelişme gösterdiği, buna karşın pH 3.5'te ise yalnızca 6 izolata (P3, P3-3, C2, C3, C4, E2) zayıf gelişme gösterdiği, geri kalan izolatların ise gelişme göstermedikleri belirlenmiştir. Enterokok türlerinin yüksek tuz (%6.5) ve yüksek pH (9.6) değerlerinde geliştiği bilinmektedir

(Salminen ve Von Wright, 2000). Bu durumda %6 NaCl konsantrasyonunda gelişebilen P2, P4, Y15, Z1, Z4-3 izolatları *Enterococcus* olabileceği düşünülmüştür. Ancak MALDI-TOF sonuçlarına göre izolatlarının hepsi *Lb. delbrueckii* olarak tanımlanmıştır.

Fenotipik ve biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilen suşların tanısının yapılabilmesi amacıyla MALDI TOF MS Biotyper sistemi kullanılmıştır. MALDI TOF MS Biotyper tanı sonuçlarına göre izole edilen 84 izolatın 2 tanesi *Lb. helveticus*, 2 tanesi *Lb. plantarum*, 3 tanesi *Lb. fermentum*, 1 tanesi *E. faecalis* ve 76 tanesi *Lb. delbrueckii* olarak tanımlanmıştır. İzolatların toplanan örneklere göre dağılımı Şekil 1'de verilmiştir.

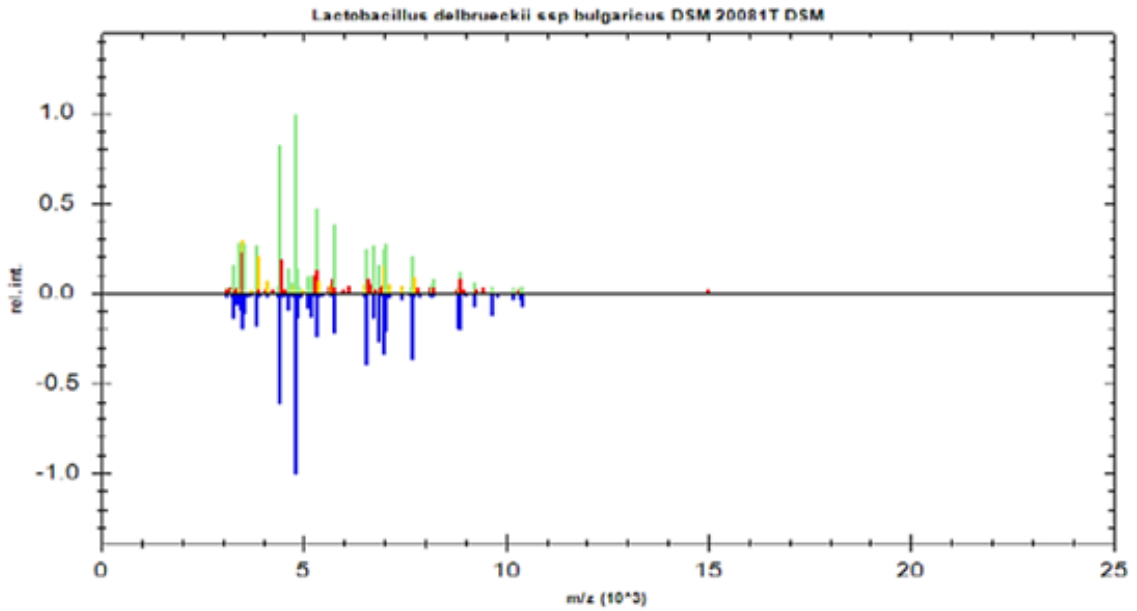
Bu sonuçlara göre izolatların yaklaşık %90'ının *Lb. delbrueckii* olduğu tespit edilmiştir. Yoğurdu oluşum mekanizmasında kullanılan starterlerin faaliyetleri göz önünde bulundurulacak olursa fermentasyonun ilk aşamalarında *S. thermophilus* ortama hâkim iken oluşan fazla serbest amino asit ve laktik asidin etkisiyle *S. thermophilus*'ün üremesi yavaşlamaktadır. Ortamda bulunan formik asit ve karbondioksitin etkisiyle *Lb. bulgaricus* üremesinin hızlandığı ve fermentasyonun ilerleyen aşamasında yüksek asit toleransları ile baskın duruma geçtiği bilinmektedir (Tekinşen, 2005; Shah, 2017). Farklı olarak Gezginc (2010), Türkiye'nin farklı yörelerinden topladığı geleneksel yöntemlerle yapılmış yoğurt örneklerinden 115 adet *S. thermophilus* ve 35 adet *Lb. bulgaricus* türü izole etmiştir. Bu farklılığın üretilen yoğurtların fermentasyon sürelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tavşanlı (2015), yaptıkları çalışmada bitki, yağmur suyu ve çiy damlalarını kullanarak üretmiş olduğu yoğurt örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Araştırma sonucuna göre geleneksel yollarla üretilmiş yoğurtlardan MALDI-TOF yöntemi ile 27 adet *Lb. delbrueckii* ve 42 adet *S. thermophilus* suşu tanımlanmıştır. Bu suşların dışında ayrıca 19 adet *Lb. fermentum*, 5 adet *Pediococcus acidilactici*, 3 adet *Lb. plantarum*, 3 *E. faecium*, 1 adet *Lb. casei*, 1 adet *Lb. acidophilus* suşu tanımlanmıştır. Çalışmamızda tanısı yapılan suşlardan *Lb. delbrueckii* Z4-3'ün

MALDI TOF MS Biotyper sonucu Şekil 2’de verilmiştir.



(İ): İnek sütü ile yapılmış yoğurtlar, (M): Manda sütü ile yapılmış yoğurtlar
(İ): Yogurts made with cow's milk, (M): Yogurts made with buffalo milk
Şekil 1. İzolatların örnek toplanan illere göre dağılımı

Figure 1. Distribution of isolates according to the provinces where samples were collected



Şekil 2. *Lb. delbrueckii* Z4-3 suşunun MALDI TOF-MS Biotyper sonucu
Figure 2. MALDI TOF-MS Biotyper result of *Lb. delbrueckii* Z4-3 strain

Kültürlerin tanımlanmasında kullanılan MALDI-TOF MS Biotyper yöntemi, özellikle izolat sayısının çok fazla olduğu çalışmalarda hızlı ve yüksek güvenilirlikte sonuç vermesi açısından oldukça etkindir. Ancak tanımlama kapasitesinin veri tabanında bulunan mikroorganizma sayısı ve çeşitliliğine bağlı olması, alt türler arasındaki farklılıkları ortaya koymada bazen yetersiz kalması gibi nedenlerle sonuçların doğruluğunun

moleküler genetik çalışmaları ile de desteklenmesi gerektiği göz ardı edilmemelidir.

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları

İzolatların antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon çapları ve antibiyotik duyarlılıkları Charteris vd., (1998) tarafından kullanılan yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları
Table 3. Antibiotic susceptibility of isolates

Antibiyotik / <i>Antibiotic</i>	Dirençli / <i>Resistance (R)</i>	Zon Çapı (mm)	
		Orta Düzeyde Duyarlı / <i>Moderately susceptible (MS)</i>	Duyarlı / <i>Sensitive (S)</i>
Eritromisin	≤ 13	14-18	≥ 19
Trimethoprim	≤ 11	12-14	≥ 15
Nalidiksik asit	≤ 13	14-17	≥ 18
Siprofloksasin	≤ 13	14-18	≥ 19
Teikoplanin	≤ 10	11-13	≥ 14
Streptomisin	≤ 11	12-14	≥ 15
Rifampisin	≤ 14	15-17	≥ 18
Ampisilin	≤ 12	13-15	≥ 16
Sefotaksim	≤ 10	11-15	≥ 16
Ofloksasin	≤ 14	15-17	≥ 18
Klindamisin	≤ 14	15-20	≥ 21
Kloramfenikol	≤ 13	14-17	≥ 18
Tetrasiklin	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim sülfametoksazol	≤ 11	12-14	≥ 15
Gentamisin	≤ 12	–	≥ 13
Vankomisin	≤ 14	15-16	≥ 17

Antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı patojen bakterilerde antibiyotik dirençliliğine sebep olmakta ve bu durum bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için kullanılan ajanların etkinliğini tehlikeye atmaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda birçok araştırmacı, laktik asit bakterilerinin, insan patojenlerinde bulunanlara benzer antibiyotik direnç genlerinin rezervuarı olarak hareket edebileceğini öne sürmüştür. Bu bakterilerle ilişkili ana tehdit, direnç genlerini patojenik bakterilere aktarabilmeleridir (Bartkiene vd., 2020; de Amorim Trindade vd., 2022). İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Şekil 3'te verilmiştir.

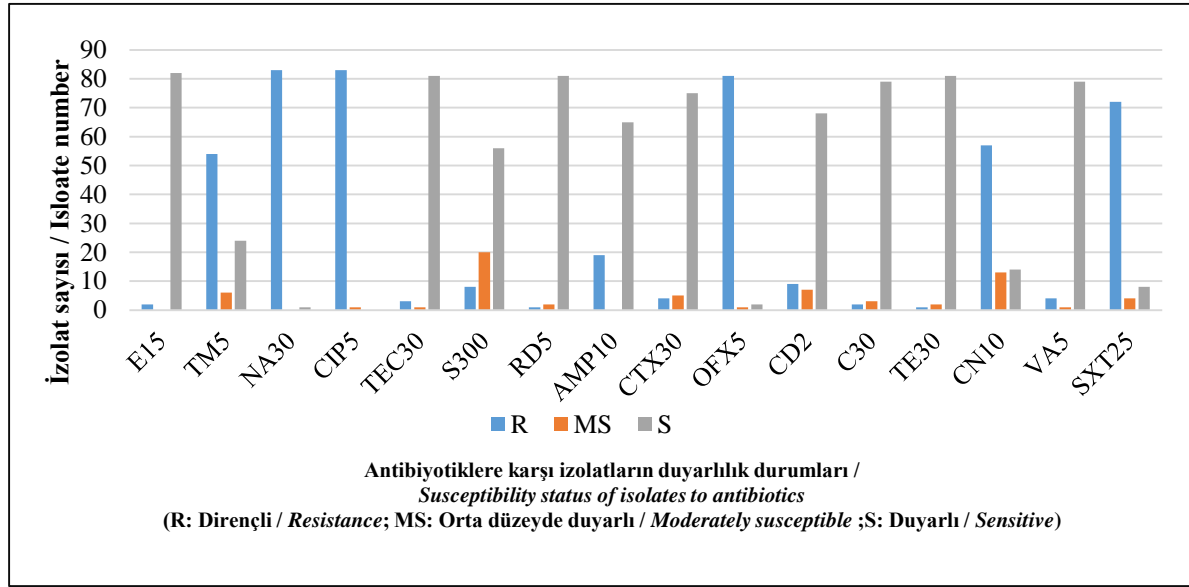
Bu çalışmada izolatların nalidiksik asit (83 adet), siprofloksasin (83 adet), ofloksasin (81 adet)

trimetoprim sülfametoksazol (72 adet) ve gentamisin (57 adet) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların duyarlılıklarına bakıldığında eritromisin (82 adet), teikoplanin (81 adet), rifampisin (81 adet), sefotaksim (75 adet), kloramfenikol (79 adet), tetrasiklin (81 adet) ve vankomisin (79 adet) antibiyotiklerine karşı duyarlılığın streptomisin (56 adet), amfisilin (65 adet), klindamisin (68 adet) antibiyotiklerinden daha fazla olduğu görülmektedir.

Hoxha vd., (2022) fermente gıdalardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin tamamının siprofloksasine dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Campedelli vd., (2019) yaptıkları

çalışmada *Lactobacillus* cinsi 197 suşun antibiyotik duyarlılıklarını fenotipik ve genotipik olarak belirlemiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre *Lb. delbrueckii* suşlarının %92'sinin vankomisine duyarlı olduğu tespit edilmiş olup, bu bulgular çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzerlik

göstermektedir. Çalışma sonuçlarımızdan farklı olarak Gad vd., (2014) ise izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının vankomisin ve streptomisine karşı oldukça dirençli olduklarını belirtmişlerdir.



Şekil 3. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları
Figure 3. Antibiotic susceptibility of isolates

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre *Lb. plantarum* suşlarından biri vankomisine karşı dirençli iken diğeri duyarlı bulunmuştur. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde *Lb. plantarum*'un vankomisine dirençli olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Park ve Lim, 2015; Guo vd., 2017). Enterokokların streptomisin, tetrasiklin, gentamisin, vankomisin, eritromisin, kloramfenikol antibiyotiklerine kazanılmış direnç geliştirebildikleri bilinmektedir (Karaaliğlu, 2019). Çalışmamızda izole edilen *E. faecalis* B10-2 eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve vankomisine duyarlı; streptomisin, gentamisin antibiyotiklerine ise dirençli bulunmuştur.

Alameri vd., (2022) taze sebzelerden izole ettikleri tüm laktik asit bakterilerinin sonuçlarımızdan farklı olarak vankomisine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Yine başka bir çalışmada sofralık zeytinlerden izole edilen 15 laktik asit bakterisi

suşunun tümünün çalışmamızdan farklı olarak eritromisin ve tetrasikline karşı bir dirençli olduğu bulunmuştur (El Issaoui vd., 2020). Çalışmalardaki farklı duyarlılık sonuçlarının izolatların farklı plazmit profillerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

İzolatların yüzde asitlik ve asidifikasyon aktiviteleri

Asitlik, özellikle süt endüstrisinde önemli bir parametredir. Laktik asit bakterileri, laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmakta ve ortam pH'ının düşmesine neden olmaktadır. Asitlik gelişimi LAB gelişimini de etkilemekte, dolayısıyla gıdanın yapı, tat ve aroma özelliklerini değiştirebilmektedir (Aydın ve Çakır, 2022). Ayrıca fermantasyon sırasında yavaş gelişen asitlik, serum ayrılması gibi kalite kusurlarına neden olmakla birlikte, fermantasyon süresinin uzaması da ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Uzunsoy, 2018). Yoğurdun oluşum

mekanizmasında asitlik pH 5.1 değerinde iken kazein proteinlerinde agregasyon başlamakta ve pH 4.6-4.7 düzeyinde tamamlanmaktadır (Demirci ve Ocak, 2020). Dolayısıyla izole edilen suşların zamana bağlı pH değişiminin belirtilen düzeyde olması gerekmektedir. Çalışmada

kullanılan izolatların zamana bağlı pH değişimleri ve ürettikleri yüzde asit miktarı Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. İzolatların yüzde laktik asitlik ve asidifikasyon sonuçları

Table 4. Percent lactic acidity and acidification results of isolates

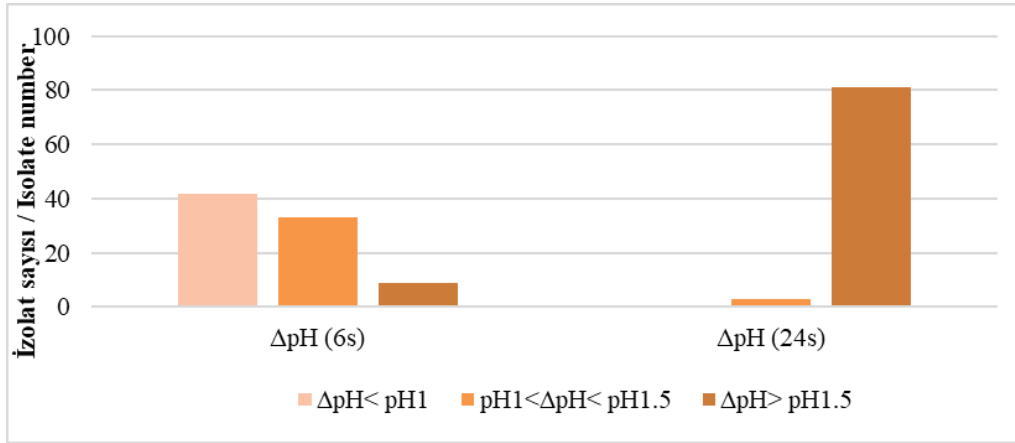
İzolat Adı / Isolate Name	pH Değeri / pH Value		ΔpH		Laktik Asit Üretimi / Lactic Acid Production (%)
	6. sa	24. sa	ΔpH 6 sa	ΔpH 24 sa	
<i>Lb. helveticus</i> A1	6.40	3.96	1.10	3.54	1.71
<i>Lb. helveticus</i> A2	5.59	4.02	1.91	3.48	1.30
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	5.76	4.10	1.74	3.40	1.17
<i>Lb. plantarum</i> P2	6.52	5.79	0.98	1.71	0.18
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	5.68	4.09	1.82	3.41	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	5.84	4.10	1.66	3.40	1.17
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	6.00	4.10	1.50	3.40	0.94
<i>Lb. plantarum</i> P4	6.61	6.18	0.89	1.32	0.13
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	6.51	4.44	0.99	3.06	0.99
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	6.88	4.24	0.62	3.26	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	6.93	5.69	0.57	1.81	0.45
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	7.28	4.21	0.22	3.29	1.08
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	6.85	6.20	0.65	1.30	0.04
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	6.71	4.38	0.79	3.12	0.76
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	6.41	4.4	1.09	3.10	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	6.46	4.58	1.04	2.92	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	6.22	4.22	1.28	3.28	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	6.74	4.93	0.76	2.57	0.58
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	5.81	4.15	1.69	3.35	0.92
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	5.54	4.10	1.96	3.40	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	6.06	4.15	1.44	3.35	0.94
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	6.36	4.24	1.14	3.26	0.85
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	6.73	4.39	0.77	3.11	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	6.27	4.21	1.23	3.29	1.03
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	6.67	4.52	0.83	2.98	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	6.56	4.95	0.94	2.55	0.49
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	6.18	4.31	1.32	3.19	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	6.50	4.28	1.00	3.22	0.85
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	6.78	4.57	0.72	2.93	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	6.75	4.64	0.75	2.86	0.67
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	6.33	4.66	1.17	2.84	0.81
<i>E. faecalis</i> B10-2	6.86	4.50	0.64	3.00	0.85
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	6.63	4.75	0.87	2.75	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	6.82	4.87	0.68	2.63	0.63
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	6.48	4.22	1.02	3.28	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	6.79	4.39	0.71	3.11	0.85
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	6.50	4.40	1.00	3.10	0.81
İzolat Adı / Isolate Name	pH Değeri / pH Value		ΔpH		

LAB izolasyonu, MALDI TOF MS tanısı ve starter kültür özellikleri

	6. sa	24. sa	Δ pH 6 sa	Δ pH 24 sa	Laktik Asit Üretimi / <i>Lactic Acid Production</i> (%)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	6.77	4.93	0.73	2.57	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	6.08	4.68	1.42	2.82	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	6.71	4.60	0.79	2.90	0.76
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	6.62	5.93	0.82	1.57	0.27
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	6.54	5.22	0.96	2.28	0.27
<i>Lb. fermentum</i> Y15	6.62	6.16	0.88	1.34	0.18
<i>Lb. fermentum</i> Z1	6.55	4.48	0.95	3.02	0.90
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	6.79	4.88	0.71	2.62	0.63
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	6.81	4.72	0.69	2.78	0.58
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	6.95	4.50	0.55	3.00	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	6.36	5.76	1.14	1.74	0.22
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	6.28	5.42	1.22	2.08	0.27
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	6.51	4.92	0.99	2.58	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	6.21	5.35	1.29	2.15	0.31
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	6.54	4.68	0.96	2.82	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	6.73	4.75	0.77	2.75	0.40
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	6.22	4.61	1.28	2.89	0.58
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	6.18	4.56	1.32	2.94	0.67
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	6.76	5.62	0.74	1.88	0.31
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	6.63	4.80	0.87	2.70	0.67
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	6.69	4.71	0.81	2.79	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	6.45	4.81	1.05	2.69	0.45
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	6.14	4.88	1.36	2.62	0.27
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	6.73	5.81	0.77	1.69	0.18
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	6.38	4.59	1.12	2.91	0.40
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	6.40	4.68	1.10	2.82	0.72
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	6.45	5.07	1.05	2.43	0.58
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	6.83	5.15	0.67	2.35	0.40
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	6.75	4.62	0.75	2.88	0.76
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	6.23	4.50	1.27	3.00	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	6.59	4.63	0.91	2.87	0.81
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	6.03	4.52	1.47	2.98	0.58
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	6.38	4.78	1.12	2.72	0.40
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	6.71	5.19	0.79	2.31	0.36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	6.82	5.03	0.68	2.47	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	6.47	4.35	1.03	3.15	0.72
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	6.08	4.60	1.42	2.90	0.36
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	6.53	4.54	0.97	2.96	0.72
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	6.47	4.69	1.03	2.81	0.63
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	6.48	4.82	1.02	2.68	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	6.78	4.65	0.72	2.85	0.58
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	5.95	4.45	1.55	3.05	0.54
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	6.43	4.98	1.07	2.52	0.49
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	6.25	4.61	1.25	2.89	0.72
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	6.29	5.06	1.21	2.44	0.42
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	6.70	4.73	0.80	2.77	0.72
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	5.99	4.24	1.51	3.26	0.67

Ertürkmen ve Öner (2015), Beyaz peynirden izole ettikleri laktik asit bakterileri ile olan çalışmalarında Δ pH değerlerinde meydana gelen değişimi 1'in altında olanlar için düşük düzeyde, 1-1.5 arasında olanlar için orta düzeyde, 1.5'ten yüksek olanlar suşlar için ise yüksek düzeyde asit üreten suşlar olarak tanımlamışlardır. İzolatların 6 saatlik pH değişimleri incelendiğinde 9 izolatin (*Lb. helveticus* A2, *Lb. delbrueckii* P1, *Lb. delbrueckii* P3, *Lb. delbrueckii* P3-2, *Lb. delbrueckii* P3-3, *Lb.*

delbrueckii E2-2, *Lb. delbrueckii* E3, *Lb. delbrueckii* Br26, *Lb. delbrueckii* Ks9-2) yüksek düzeyde asit ürettiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda 24 saat sonunda *Lb. helveticus* A1, pH 3.96 ile ortam pH'sını en çok düşüren izolat olurken, *Lb. plantarum* P4, pH 6.18 ile ortam pH'sını en az düşüren izolat olmuştur. İzolatların 24 saat sonunda %81'inin ortam pH'sını 5'in altına düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. İzolatların zamana bağlı pH değişimi
Figure 4. Time dependent pH change of isolates

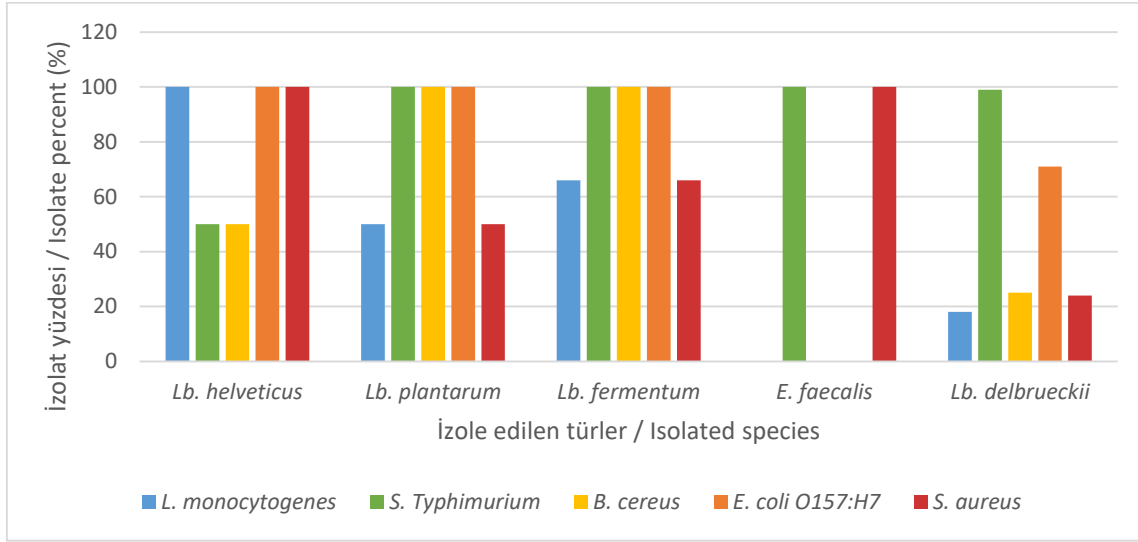
Benzer olarak Hoque vd., (2010) geleneksel olarak üretilen iki farklı bölgeden alınmış yoğurtlardan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin 24 saat sonunda ölçülen pH değerleri 5.09 ve 5.13 olarak rapor etmiştir. Yoğurdun üretiminde %0.9 asitliğe ulaşılana kadar yaklaşık 4 saat boyunca 42°C'de inkübasyon yoluyla fermente olmasına ve pıhtılaşmasına izin verilmektedir (Shah, 2017). Buna göre izolatlarımızdan 7 adet *Lb. delbrueckii* ve 1 adet *Lb. fermentum* suşunun ürettiği asitliğin %0.9 ve 0.95 arasında olduğu bulunmuş olup, bu *Lactobacillus* suşlarının asitlik üretimi açısından starter kültür potansiyeli taşıdığı tespit edilmiştir.

Akoğlu vd., (2017) Mengen peynirlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin 6. saat ve 24. saat sonundaki Δ pH değerlerinin laktobasillerde 0.11-0.36 ve 0.7-2.35 arasında değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir. Benzer olarak Uzunsoy (2018) geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan izole ettiği *Lb. bulgaricus* izolatlarından 3 adedinin çok güçlü asit üretme yeteneğine sahip olduğunu

bulmuştur. Nachi vd., (2019) ise çalışmamızdan farklı olarak izole ettikleri *Lb. plantarum*'un yüksek asit üretimi sağladığını bildirmişlerdir.

Antimikrobiyal aktivite

Laktik asit bakterilerinin sebep olduğu antimikrobiyal aktivite, pH'nın ve peptit olmayan inhibitörlerin oluşumu, antibakteriyel etkiye sahip H₂O₂, organik asitler ve bakteriyosinlerden kaynaklanmaktadır (Evren vd., 2006). Yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin gıda patojenlerine karşı oluşturduğu inhibisyon değerleri, inhibisyon çapı sınır olarak 2 mm'ye göre incelenip (İşleroglu vd., 2008) sonuçlar değerlendirildiğinde izolatların %97'si *S. Typhimurium*'a, %76'sı *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, buna karşın %76'sının *Lb. monocytogenes*'e, %73'ünün *B. cereus*'a ve %68'inin ise *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 5). Her bir izolatin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları zon çapları Çizelge 5 verilmiştir.



Şekil 5. Tanımlanan türlerin antimikrobiyal aktiviteleri
Figure 5. Antimicrobial activities of identified species

Gram negatif bakterilerin sahip olduğu hücre duvarı, bakterileri antibiyotiklere ve antimikrobiyallere karşı Gram pozitif bakterilere göre daha dirençli hale getirmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit, asetik asit ve bakteriyosinler Gram negatif bakteriler

üzerinde antibakteriyel etki göstermektedir. *Lb. plantarum* tarafından üretilen benzoik asit, mevalonik asit ve diasetil gibi çeşitli bileşiklerin Gram negatif bakterilerin gelişimini inhibe ettiği bilinmektedir (Dinçer, 2007; Breijyeh vd., 2020).

Çizelge 5. İzolatların patojenlere karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm)
Table 5. Inhibition zone diameters of isolates against pathogens

İzolat Adı / Isolate Name	<i>Lb. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. helveticus</i> A1	9	(-)	(-)	>	5
<i>Lb. helveticus</i> A2	3	37	3	>	7
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	9	47	3	>	6
<i>Lb. plantarum</i> P2	12	4	18	>	7
<i>Lb. delbrueckii</i> P3	3	18	4	>	1
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	4	>	5	31	5
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	5	>	5	43	6
<i>Lb. plantarum</i> P4	1	>	11	23	1
<i>Lb. delbrueckii</i> C1	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	2	>	(-)	4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> C3	(-)	>	(-)	3	3
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	(-)	>	(-)	6	5
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	(-)	5	3	21	4
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	(-)	5	(-)	7	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	(-)	26	(-)	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	(-)	5	1	1	2

İzolat Adı / Isolate Name	<i>Lb.monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	4	43	4	3	5
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	6	>	6	13	1
<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	4	>	6	11	6
<i>Lb. delbrueckii</i> E3	4	>	4	21	5
<i>Lb. delbrueckii</i> E4	4	>	3	21	3
<i>Lb. delbrueckii</i> E5	2	>	(-)	9	6
<i>Lb. delbrueckii</i> F3	1	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> F5	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> F6	(-)	>	(-)	7	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B4	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B6	2	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B7	(-)	>	(-)	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B8	(-)	>	(-)	18	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B9	1	>	(-)	13	4
<i>Lb. delbrueckii</i> B9-2	(-)	>	(-)	26	(-)
<i>E. faecalis</i> B10-2	(-)	>	(-)	(-)	2
<i>Lb. delbrueckii</i> B10-3	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B11-2	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B12	(-)	>	(-)	43	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> B14	3	>	5	18	5
<i>Lb. fermentum</i> B15-2	(-)	>	3	19	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1	1	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y1-2	(-)	>	(-)	18	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y2	(-)	>	(-)	21	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y3-2	(-)	>	(-)	14	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y4-2	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Y5	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. fermentum</i> Y15	16	>	18	11	21
<i>Lb. fermentum</i> Z1	2	>	18	52	23
<i>Lb. delbrueckii</i> Z3-3	1	>	3	21	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4	3	>	(-)	34	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z4-3	4	>	2	9	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-2	(-)	>	1	31	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-3	(-)	>	2	28	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z5-4	(-)	>	(-)	14	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6	(-)	>	(-)	8	3
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-2	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-3	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z6-4	(-)	>	3	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z7	(-)	>	(-)	1	(-)

LAB izolasyonu, MALDI TOF MS tanısı ve starter kültür özellikleri

İzolat Adı / Isolate Name	<i>Lb.monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8	(-)	>	3	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Z8-2	(-)	>	3	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1	(-)	>	(-)	8	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br1-2	(-)	>	(-)	5	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br6	(-)	>	(-)	1	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br7-2	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br11	(-)	>	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12	(-)	>	(-)	>	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br12-2	(-)	47	(-)	>	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br15	(-)	>	(-)	4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17	(-)	>	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-2	(-)	38	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br17-3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br18-2	(-)	04	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22	(-)	26	(-)	26	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-2	(-)	42	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br22-3	(-)	12	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	(-)	6	(-)	6	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br23-2	(-)	39	(-)	3	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25	(-)	41	(-)	2	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-2	(-)	43	(-)	(-)	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br25-3	(-)	>	(-)	4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	(-)	53	(-)	29	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29	(-)	1	(-)	18	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Br29-2	(-)	25	(-)	2	4
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	(-)	41	(-)	(-)	2
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9	(-)	27	(-)	6	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> Ks9-2	(-)	9	(-)	3	(-)

(-): Zon oluşumu yok, (>): 6 cm ve üzeri zon oluşumu
 (-): No zone formation, (>): 6 cm and above zone formation

Antimikrobiyal aktivite testlerine göre *Lb. plantarum* izolatlarının test edilen tüm patojenlere karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bin Masalam vd., (2018) *Lb. plantarum* suşları ile yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar almış; Arrijoa vd., (2020) de çalışmalarında *Lb. plantarum*'un, *S. Typhimurium* ve *Lb. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında izole edilen *Lb. delbrueckii* suşlarından yalnızca *Lb. delbrueckii* Br17-3, *S.*

Typhimurium'a karşı antimikrobiyal etki göstermezken diğer *Lb. delbrueckii* suşlarının antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Rubbani ve Iqbal (2020) probiyotik yoğurtlardan izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının en yüksek *Salmonella* Typhi'ye karşı antibakteriyel etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Abedi vd., (2013), *Lb. delbrueckii* suşlarının *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisini inceledikleri çalışmada suşların yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve bu etkinin laktik asitten

kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Abushelaibi vd., (2017) deve sütünden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin *S. aureus*'a karşı yüksek inhibisyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Kanak ve Yılmaz (2018), geleneksel olarak üretilmiş peynirlerden izole etmiş oldukları laktik asit bakterilerinin hiçbirinin *S. aureus* ATCC 25923 patojenine karşı inhibisyon etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada izole edilen *Lb. plantarum* IS2 izolatının *Lb. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* O157:H7 ve *B. cereus* patojenlerine karşı etkili olduğu; *E. faecalis* IA2 izolatının ise sadece *S. Typhimurium* ATCC 140828 suşuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Diasetil üretimi

Diasetil ve asetaldehit, laktik asit bakterilerinde sitrat metabolizmasının son ürünü olarak ortaya çıkan temel aroma bileşikleridir (Elçioğlu, 2010). Diasetil üretim özelliği, tereyağı starteri olarak kullanılabilir kültürler için önemli bir kriterdir. Ayrıca diasetil, Gram negatif mikroorganizmalar için antimikrobiyal etkiye sahip bir metabolittir. Geleneksel yoğurt üretiminde, bazı yörelerde, özellikle yaylalarda yapılan üretimlerde, mayalama işleminde tereyağı kullanılmaktadır. Bu nedenle izole edilen kültürlerin diasetil üretim özellikleri de belirlenmiştir. Bu çalışmada izolatların diasetil

üretimleri test sonunda oluşan pembe-kırmızı halka oluşumu dikkate alınarak, kalitatif yöntemle tespit edilmiştir. Oluşan renk değişimine bağlı olarak izolatların %90'ının diasetil ürettiği ancak %10'unun ise diasetil üretmediği tespit edilmiştir. Benzer olarak Yüce (2017), yoğurt ve peynirlerden izole etmiş olduğu 101 bakteriden 41'inde, deney sonrası ilk 10 dakika içerisinde diasetil oluşumunun gerçekleştiği, inkübasyonun 24. saatinde ise tüm izolatlarda diasetil oluşumu görüldüğünü rapor etmiştir. Elçioğlu (2010) ise çalışmasında Tulum peynirlerinden izole ettiği 96 adet laktik asit bakterisinden 38'inin diasetil ürettiğini, diasetil üreten suşların da ağırlıklı olarak *Enterococcus* türlerinden oluştuğunu tespit etmiştir. De Almeida Júnior vd., (2015) ise keçi sütünden izole ettikleri 50 adet LAB kültürünün diasetil üretimi açısından zayıf gelişme gösterdiğini bildirmiştir.

Proteinaz aktivitesi

Çalışma kapsamında izolatlardan antibiyotik duyarlılıkları, asidifikasyon özellikleri, antimikrobiyal özellikleri ve diasetil üretimi özellikleri göz önünde bulundurularak seçilen 26 adet potansiyeli yüksek suşun proteinaz aktivitesi tespit edilmiştir (Çizelge 6).

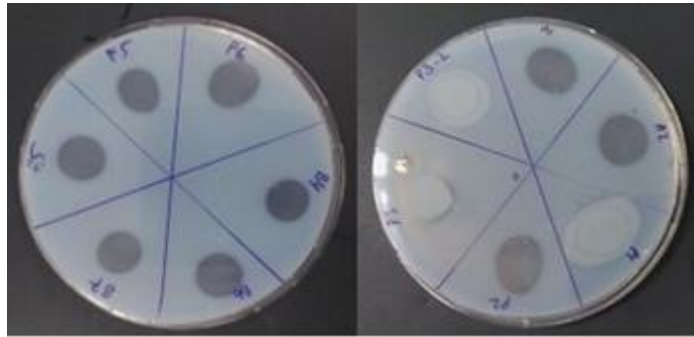
Çizelge 6. İzolatların proteinaz aktivitesi

Table 6. Proteinase activity of isolates

İzolat Adı / Isolate Name	Zon Çapı / Diameter of Zone (mm)	İzolat Adı / Isolate Name	Zon Çapı / Diameter of Zone (mm)
<i>Lb. helveticus</i> A2	13	<i>Lb. delbrueckii</i> E2-2	11
<i>Lb. delbrueckii</i> P1	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> E3	(-)
<i>Lb. plantarum</i> P2	13	<i>Lb. delbrueckii</i> E4	(-)
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-2	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> E5	12
<i>Lb. delbrueckii</i> P3-3	(-)	<i>Lb. delbrueckii</i> B8	11
<i>Lb. delbrueckii</i> C2	10	<i>Lb. delbrueckii</i> B9	10
<i>Lb. delbrueckii</i> C4	11	<i>Lb. delbrueckii</i> B14	10
<i>Lb. delbrueckii</i> D1	13	<i>Lb. fermentum</i> B15-2	10
<i>Lb. delbrueckii</i> D2	14	<i>Lb. delbrueckii</i> F5	10
<i>Lb. delbrueckii</i> D3	11	<i>Lb. delbrueckii</i> F6	13
<i>Lb. delbrueckii</i> D4	8	<i>Lb. delbrueckii</i> Br23	9
<i>Lb. delbrueckii</i> D5	14	<i>Lb. delbrueckii</i> Br26	10
<i>Lb. delbrueckii</i> E2	13	<i>Lb. delbrueckii</i> Ks7	10

Thapa vd., (2006), 2 mm'den büyük hidroliz bölgesine sahip suşların proteolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna göre test edilen 26 izolattan 21'i proteolitik aktiviteye sahiptir. Test edilen izolatlardan en yüksek zon çapı *Lb. delbrueckii* D2 (14 mm) ve *Lb. delbrueckii* D5 (14 mm) suşlarında, en düşük proteolitik aktivitesi ise en düşük zon çapına sahip *Lb. delbrueckii* D4 (8 mm) suşunda görülmüş; *Lb. delbrueckii* P1, P3-2, P3-3, E3, E4 suşlarının ise herhangi bir zon

oluşturmadığı için proteinaz aktivitesi göstermediği belirlenmiştir (Şekil 6). Ektik (2022), çalışmasında proteolitik aktivite seviyesini, berrak hidroliz bölgesinin çapına göre; düşük (<10mm), orta (≥10 mm ve <20 mm) ve yüksek (≥21 mm) olarak değerlendirmiştir. Bu durumda izolatlardan *Lb. delbrueckii* D4 ve *Lb. delbrueckii* Br23 düşük proteolitik aktivite gösterirken diğer 19 izolat orta seviyede proteolitik aktivite göstermiştir.



Şekil 6. İzolatların proteinaz aktivitesi zonları

Figure 6. Proteinase activity zones of isolates

Laktik asit bakterileri sahip oldukları proteolitik enzimlerle kazeini hidrolize ederek fermentasyon sırasında ürünün yapı ve aroma oluşumunda etkili olmaktadır (Karakuş, 1994). Proteolitik aktivite aynı zamanda *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* bakterileri arasındaki simbiyotik ilişkinin en önemli parametrelerinden biridir. Ancak yüksek proteolitik aktivite acı tat oluşumuna sebep olmaktadır (Tavşanlı, 2015). Al-Bayati (2014) geleneksel olarak üretilmiş fermente ürünlerden laktik asit bakterilerini izole etmiş ve proteinaz aktivitesine bakmıştır. Çalışmada izole edilen *Enterococcus* ssp. suşlarında zon çaplarını 9.51 ile 13.71 mm arasında belirlemiştir. Ramadan (2014), Kuzey Irak'ta yapılmış 40 farklı fermente üründen laktik asit bakterilerini izole ettiği çalışmada suşların proteinaz aktivitesini incelemiş, sonuç olarak tüm izolatların yüksek proteinaz aktivitesi gösterdiğini rapor etmiştir. Tavşanlı (2015) geleneksel olarak üretilen yoğurtlardan izole ettiği *Lb. delbrueckii* suşlarının 17 tanesinin kuvvetli, 12 tanesinin orta ve 16 tanesinin ise zayıf proteolitik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir. Uzunsoy (2018), geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan izole ettikleri *Lb. bulgaricus*

izolatlarının *S. thermophilus* izolatlarından daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiklerini belirtmiştir.

İzolatların bakteriyofajlara karşı direnç özellikleri

Süt endüstrisinde kullanılan starter kültürlerin ortamda bulunabilecek fajlara duyarlı olması durumunda, fajların laktik asit bakterilerini parçalaması sonucu fermentasyon süreci durma noktasına gelebilmektedir (Acar Soykut ve Tunail, 2009; Polaska ve Sokolowska 2019). Bu nedenle izole edilen suşların faj dirençlilikleri de incelenmiştir (Çizelge 7).

Test edilen 26 izolattan 12'si çalışmada kullanılan 15 farklı faja karşı direnç göstermiştir. Dolayısıyla izolatların yaklaşık %46'sı fajlara dirençli bulunmuştur. Benzer olarak Sprutte vd., (2022) yaptıkları çalışmada, 21 *Lb. delbrueckii* suşundan 11'inin çalışmada kullanılan PMBT4, Ld3 ve Ld17 fajlarına dirençli olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda fajlara duyarlı bulunan izolatlar, diğer özellikleri gereği yüksek potansiyele sahip olsalar dahi starter kültür olarak kullanılamazlar.

Deng vd. (2018) ise geleneksel Çin süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* suşlarının bakteriyofaj dirençli mutantlarını inceledikleri çalışmada, dirençli suşların büyüme ve faj direnç özelliklerini kararlı bir şekilde kalıtsal

olarak aldıklarını ayrıca lizogen olmadıklarını bu yüzden *Lb. bulgaricus* BIM8 ve BIM12 mutantlarının süt endüstrisinde starter kültür olarak büyük potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 7. İzolatların faj dirençlilikleri
Table 7. Phage resistance of isolates

Faj Kodu / Phage Code															
Suş Kodu / Strain Code	Φ 709-X1	Φ 231L-P24	Φ Y4-X9	Φ 231L-P8	Φ 231L-P26	Φ LbA-A	Φ LbA-Z	ΦY4L-X11	ΦY4L-X6	ΦY4L-X4	ΦV1-P19	ΦV1-P20	ΦV1-X19	ΦV1L-X20	ΦV1L-A
A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P3-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P3-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C4	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E2-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E3	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
E4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E5	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
B8	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B9	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B10-2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B14	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
B15-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F6	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Br23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Br26	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Ks7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

+: Faja dirençli; -: Faja duyarlı; +: Phage resistant; -: Phage sensitive

Sanitasyon uygulamaları, ham maddelerin mikrobiyal inaktivasyonu, aerosol dezenfektanların kullanımı, starter/suşun rotasyonu veya kültür rotasyonu rejimleri, faj inhibe edici bileşenlerin kullanımı dahil olmak

üzere sıkı kontrol önlemlerine rağmen, fajlar süt endüstrisinde hala varlığını sürdürmektedir (Sadiq vd., 2019; Gradaschi vd., 2021). Atamer vd., (2011) *Leuconostoc* starter kültürlerine etkili fajların termal direncini inceledikleri çalışmada, sütün

Leuconostoc fajlarının yok edilmesine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Oliveira vd., (2018) ise 16 ülkede bulunan endüstriyel tesislerden alınan peynir altı sularından faj izole ederek *Lactococcus lactis* starter kültürlerini enfekte eden bakteriyofajların biyolojik çeşitliliğini araştırmış ve sonuç olarak, laktik asit bakterilerine etkili fajların endüstriyel fermantasyonlar için hala ciddi bir tehdit oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular starter kültürler için faj sorununun devam ettiğini bu nedenle işletmede kullanılacak kültürlerin fajlara karşı dirençli olmasının önemini göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada MALDI-TOF MS Biotyper sisteminin laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında hızlı ve pratik bir yöntem olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. İzole edilen laktik asit bakterilerinin farklı asidifikasyon, antibiyotik duyarlılık ve antimikrobiyal aktivite özelliklerine sahip oldukları belirlenmiştir. Kalitatif olarak tespit edilen diasetil üretim yeteneklerine göre izolatların yaklaşık %86'sının diasetil üretimi özeliğine sahip olduğu, 12 adet *Lb. delbrueckii* suşunun ise çalışmada kullanılan 15 farklı bakteriyofaja karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Araştırılan tüm özellikler dikkate alındığında 8 adet *Lb. delbrueckii* izolatının ve 1 adet *Lb. fermentum* suşunun teknolojik özelliklerinin starter kültür olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir. Dolayısıyla ülkemize özgü yerel suşların seçimi yapılmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, izolatların aroma profillerinin belirlenmesi, ikincil metabolitlerin kantitatif olarak tespit edilmesi, seçilen suşlarla yoğurt üretim denemelerinin gerçekleştirilerek üretilen yoğurtların duysal ve reolojik özelliklerinin araştırılması önerilmektedir. Sonrasında ise potansiyeli yüksek olan suşların endüstriyel starter kültür üretimi amacıyla laboratuvar ve pilot ölçekli üretim denemelerinin yapılması gerekmektedir. Fermente ürün çeşitliliği açısından oldukça zengin olan ülkemizde yerli starter kültür üretimine katkı sağlayacağı düşünülen bu çalışmaların sayısının artırılması, izole edilen suşların ise Ulusal Starter Kültür Koleksiyonuna dahil edilerek yerli üretime katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 116G012 numaralı KAMAG 1007 projesi kapsamında desteklenen, Şeyma Betül Encu'nun yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır. Maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Şeyma Betül Encu, laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirmiş ve makale taslağını oluşturmuş, Esra Acar Soykut bakteriyofaj duyarlılıklarının belirlenmesine, laboratuvar çalışmalarına katkı sağlamış, İbrahim Çakır konunun seçilmesi, denemelerin planlanması ve sonuçların değerlendirilmesine katkı sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okuyarak onaylamışlardır.

KAYNAKLAR

Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V., and Jafarian-Dehkordi, A. (2013). In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 261-268.

Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., and Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 316-325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>

Acar Soykut, E. (2007). *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye.

Acar Soykut, E. ve Tunail, N. (2009). Süt endüstrisinde sorun yaratan termofilik fajlar. *Gıda*, 34(2), 107-113.

Acar Soykut, E. ve Tunail, N. (2014). *Lactobacillus bulgaricus* fajlarının restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi, protein profilleri ve konakçı

özgüllüklerine göre tanımlanması. *Gıda*, 39(2), 95-102.

Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H., ve Sarı, K. (2017). Mengen Peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2): 453-459.

Akyar, I. (2011). Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2:4.

Alameri, F., Tarique, M., Osaili, T., Obaid, R., Abdalla, A., Masad, R., ... and Ayyash, M. (2022). Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: Potential probiotic and postbiotic characteristics Including immunomodulatory effects. *Microorganisms*, 10(2), 389. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020389>

Al-Bayati, A.AK. (2014). Isolation and molecular identification of some lactic acid bacteria from traditionally made fermented food, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye.

Arrijoja, D., Mani-López, E., Palou, E. and López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, 107286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>

Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K. J., and Hinrichs, J. (2011). Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*, 21(5), 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.005>

Aydın, F., Ardıç, M. (2019). Determination of microbiological and chemical properties of sıkma cheeses collected from different provinces. *Gıda*, 44 (5): 826-6.

Aydın, F., Kahve, H. İ., Ardıç, M., & Çakır, İ. (2020). Identification of enterococci by MALDI-TOF-MS & 16S rRNA sequencing isolated from

squeezed cheeses and evaluation of antibiotic susceptibility and antibacterial activity. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77(4), doi:10.5505/TurkHijyen.2020.92332.

Aydın, F., Çakır, İ. (2022). Gıda Teknolojisinde Kullanılan Starter Mikroorganizmalar. In: *Enstitüyel Gıda Üretim Teknikleri*. 1. Basım. Ed.: Pınar Şanlıbaba, Yalçın Güçer. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. Ankara, Türkiye, pp 19-38. ISBN: 978-625-417-615-9.

Bartkiene, E., Ruzauskas, M., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Starkute, V., ... and Hoelzle, L. E. (2020). Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the EU countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against *Salmonella enterica*. *Poultry Science*, 99(8), 4065-4076. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.002>

Bin Masalam, M. S., Bahieldin, A., Alharbi, M. G., Al-Masaudi, S., Al-Jaouni, S. K., Harakeh, S. M., and Al-Hindi, R. R. (2018). Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <https://doi.org/10.1155/2018/7970463>

Bratulić, M., Mikuš, T., Cvrtila, Ž., Cenci-Goga, B. T., Grispoldi, L., Pavunc, A. L., ... and Kozaciński, L. (2021). Quality of traditionally produced Istrian sausage and identification of autochthonous lactic acid bacteria strains as potential functional starter cultures. *European Food Research and Technology*, 247(11), 2847-2860.

Brejijeh, Z., Jubeh, B., and Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6), 1340.

Bruker (2019). MALDI Biotyper, In Food Microbiology, Speed and Accuracy Matter, <https://www.bruker.com/en/applications/microbiology-and-diagnostics/food-beverage-microbiology/maldi-biotyper-for-food-microbiology.html> (Erişim tarihi: 29 Mart 2019)

Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., ... and O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic

- resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
- Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., and Gagnaire, V. (2020). Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2088. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088>
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of food protection*, 61(12), 1636-1643.
- Cheesbrough, M. (2002). *District laboratory practice in tropical countries*. Cambridge University Press, Part II pp 136-141.
- Chen, T., Wang, L., Li, Q., Long, Y., Lin, Y., Yin, J., ... and Yang, H. (2020). Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk. *BMC microbiology*, 20(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01920-6>
- Çelik, Ö. F., Çon, A. H., Saygın, H., Şahin, N., ve Temiz, H. (2021). Isolation and identification of *Lactobacilli* from traditional yogurts as potential starter cultures. *LWT-Food Science and Technology*, 148, 111774. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111774>
- De Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M. and Dias, F. S., (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk, *Food Control*, 53, 96-103
- De Amorim Trindade, D. P., Barbosa, J. P., Martins, E. M. F., and Tette, P. A. S. (2022). Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its probiotic potential. *Food Bioscience*, 48, 101739. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101739>
- Demirci, A., Ocak E. (2020). Sağlıklı ve kaliteli yoğurt nasıl mayalanır? *Akademik Platform Helal Yaşam Dergisi*, 2(1), 14-22.
- Demirgöl, F., Sağdıç, O. (2017). Laktik starter kültür üretim teknolojisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(11), 27-37.
- Deng, K., Fang, W., Zheng, B., Miao, S., and Huo, G. (2018). Phenotypic, fermentation characterization, and resistance mechanism analysis of bacteriophage-resistant mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* isolated from traditional Chinese dairy products. *Journal of dairy science*, 101(3), 1901-1914. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13823>
- Diñçer E. (2007). Et ve Et Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Bunların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, Türkiye.
- Ektik, N. (2022). Klasik (olgunlaştırılmış) Beyaz peynir üretiminin farklı aşamalarından laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi. Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Balıkesir, Türkiye.
- El Issaoui, K., Abrini, J., Zinebi, S., Amajoud, N., Senhaji, N. S., and Abriouel, H. (2020). Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Archives of Microbiology*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02053-0>
- Elçioğlu, Ö. (2010). Kargı Tulum Peynir'inden izole edilen laktik asit bakterilerinin starter ve probiyotik kültür özelliklerinin belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, Türkiye.
- Ertürkmen, P., Öner, Z. (2015) Beyaz Peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19(3): 9-16. <https://doi.org/10.19113/sdufbed.25545>
- Evren, M., Albayram, C., ve Apan, M. (2006). Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 9, 24-26.
- Fleming, H.P., Etchells, J.L., and Costilow, R.N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of

- Pediococcus* from Cucumber Brines, *Applied and Environmental Microbiology*, 30(6): 1040-1042. <https://doi.org/10.1128/am.30.6.1040-1042.1975>
- Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening, *Journal of Dairy Sciences*. 72: 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8)
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., and Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19(1): 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.008>
- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., & Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian journal of Microbiology*, 45, 25-33. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100005>
- Gezginç, Y. (2010). Geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin plazmit içeriği ve biyojenik amin üretimi bakımından gıda endüstrisinde kullanılabilirliğinin araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kahramanmaraş, Türkiye.
- Gradaschi, V., Payashian, F., Dieterle, M. E., Rondón Salazar, L., Urdániz, E., Di Paola, M., ... and Piuri, M. (2021). Genome sequence and characterization of *Lactobacillus casei* phage, vB_LcaM_Lbab1 isolated from raw milk. *Therapy, Applications, and Research*, 2(1), 57-63. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0029>
- Guo, H., Pan, L., Li, L., Lu, J., Kwok, L., Menghe, B., ... and Zhang, W. (2017). Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. *Journal of Food Science*, 82(3), 724-730. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>
- Hoque, M.Z., Akter, F., Hossain, K.M., Rahman, M.S.M, Billah, M.M. and Islam, K.M.D. (2010). Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* ssp. from selective regional yoghurts, *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 5(1): 39-46.
- Hoxha, R., Nikolova, D., and Evstatieva, Y. (2022). Antibiotic resistance profile of the newly isolated lactic acid bacteria strains from traditional fermented foods. *Current trends in natural sciences*, 11(21), 247-253. <https://doi.org/10.47068/ctns.2022.v11i21.027>
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49,1.
- Islam, M. Z., Uddin, M. E., Rahman, M. T., Islam, M. A., and Harun-ur-Rashid, M. (2021). Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk: Assessment of probiotic potential and technological properties. *Small Ruminant Research*, 205, 106532.
- İşleröğlü, H., Yıldırım, Z., Yıldırım M. (2008). Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2008(1), 1-6.
- Kanak, E.K., Yılmaz, S.Ö. (2018). MALDI-TOF Mass spectrometry for the identification and detection of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from local cheeses. *Food Science And Technology*. <https://doi.org/10.1590/fst.19418>
- Karaalioglu, O. (2019). Çiğ ve işlenmiş su ürünlerinden izole edilen enterokokların gıda güvenliği yönünden değerlendirilmesi. Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Bursa, Türkiye.
- Karakuş, M. (1994). Beyaz Peynirden izole edilen laktik asit bakterilerinin asit oluşturma ve proteolitik aktiviteleri, *GIDA/The Journal of Food*, 19(4).
- Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., and Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods—A review. *Food Bioscience*, 21, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>
- Kılıç, S. (2008). *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*, 2. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

- Kırmacı, H.A. (2010). Geleneksel Urfa peynirinde yer alan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve starter kültür olarak kullanım olanakları. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Şanlıurfa, Türkiye, 152s.
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yılmaz, N., and Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3390-3415. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12613>
- Nachi, I., Fhoula, I., Smida, I., Ouzari, H. I., and Hassouna, M. (2019). Microbiological analysis and assessment of biotechnological potential of lactic acid bacteria isolated from Tunisian flours. *Annals of Microbiology*, 69(1), 29-40. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1365-8>
- Oliveira, J., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Kouwen, T. R., and van Sinderen, D. (2018). Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. *Journal of dairy science*, 101(1), 96-105. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13403>
- Park, S. Y., and Lim, S. D. (2015). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* FH185 isolated from human feces. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(5), 615.
- Polaska, M., and Sokolowska, B. (2019). Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS microbiology*, 5(4), 324. doi: 10.3934/microbiol.2019.4.324.
- Pourahmad, R., and Assadi, M.M. (2007). Used of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 259- 262. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00343.x>
- Ramadan, A.K.R. (2014). Isolation and characterization of some lactic acid bacteria from home-made dairy products and investigation of some antimicrobial and enzymatic properties, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, Türkiye.
- Randazzo, L.R., Restuccia, C., Romaro, D.A., and Caggia, C., (2004). *Lactobacillus casei*, Dominant Species in Naturally Fermented Sicilian Green Olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 9-14. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00159-4)
- Ribeiro, S. C., Coelho, M. C., and Silva, C. C. G. (2021). A rapid screening method to evaluate acidifying activity by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 185, 106227. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106227>
- Rubbani, U., and Iqbal, A. (2020). Evaluation of isolated *Lactobacillus* strains as probiotics in yogurt preparation. *Advancements in Life Sciences*, 7(2), 79-85.
- Sadiq, F. A., He, G., Sakandar, H. A., Li, Y., and Ou, K. (2019). *Lactococcus lactis* phages from the perspective of their diversity, thermal and biocidal resistance. *International Dairy Journal*, 90, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.11.001>
- Salminen, S., and Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, CRC Press, New York.
- Shah, N. P. (Ed.). (2017). *Yogurt in health and disease prevention*. Academic Press, London, United Kingdom. ISBN: 978-0-12-805134-4.
- Somashekaraiah, R., Shruthi, B., Deepthi, B. V., and Sreenivasa, M.Y. (2019). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: a naturally fermenting coconut palm nectar. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1382. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01382>
- Sprotte, S., Fagbemigun, O., Brinks, E., Cho, G. S., Casey, E., Oguntoyinbo, F. A., ... and Franz, C. M. (2022). Novel *Siphoviridae* phage PMBT4 belonging to the group b *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* phages. *Virus Research*, 308, 198635. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198635>
- Tavşanlı, H. (2015). Geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan ve doğadaki bitkisel örneklerden yoğurt kültürlerinin izolasyonu identifikasyonu ve karakterizasyonu, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin

Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Bursa, Türkiye.

Tekinşen, O.C. (2005). *Süt ve Süt Ürünleri*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye. 75-100.

Temiz, A. (1996). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatiboğlu Yayınları, Ankara, Türkiye.

Thapa, N., Pal, J., and Tamang, J. P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 33-38.

Tortum, M.Y. (2018). Trakya Bölgesinde üretilen bozalardan laktik asit bakterileri ve mayaların izolasyonu ve PZR yöntemi ile tanımlanması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Türkiye.

Uzunsoy, İ. (2018). Geleneksel yoğurt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının endüstriyel yoğurt üretimine uygunluğunun saptanarak starter kombinasyonlarının geliştirilmesi, Ankara

Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye.

Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A., Magalhães Júnior, A. I., and Soccol, C. R. (2020). A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. *Food Reviews International*, 36(2), 135-167. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630636>

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. and Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS In Microbiological Diagnostics-Identification of Microorganisms and Beyond, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3): 965-974.

Yüce, S. (2017). Peynir ve yoğurtlardan izole edilmiş olan laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özelliklerinin araştırılması, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Burdur, Türkiye.

Yılmaz, S., Duyan, S., Artuk, C. ve Diktaş, H. (2014). Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13(5).