Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi Yayınları : 903
Uygulama Kılavuzu : 215

Fermantasyon Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu

Prof. Dr. M. Hilmi PAMİR
Tarımsal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ANKARA
1 9 8 4

Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi Yayınları : 903

Uygulama Kılavuzu : 215

Fermantasyon Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu

Prof. Dr. M. Hilmi PAMİR
Tarımsal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ANKARA
1 9 8 4

ANKARA ÜNİVERSİTESİ BASIMEVİ - ANKARA 1984

ÖNSÖZ

1967 yılında yayınladığım ve zamanın İhtimar Sanatları Kürsüsü'nde okutulan Fermantasyon Mikrobiyolojisi dersine bir yardımcı ders kitabı olarak hazırlanan "Fermantasyon Teknolojisinde Mikrobiyolojik Metodlar" adlı kitap aynı zamanda adı geçen dersin uygulamalarında da uzun yıllar esas alınmıştır. Ancak zaman içinde Fermantasyon Mikrobiyolojisi'ndeki gelişmeler ve uygulamalarda edinilen deneyimler yeni bir "Uygulama Klavuzu"nun hazırlanmasında başlıca âmil olmuştur.

Bu "Uygulama Klavuzu" öğrencilere son sınıfta okutulan "Biyoteknoloji"nin en önemli bir ön dersi olan Fermantasyon Mikrobiyolojisi'nde adı geçen mikroorganizma gruplarının bazı temsilcilerini ve aynı zamanda bazı fermantasyon olaylarını tanıtmayı amaç edinmiştir.

Uygulama konularının fazla sayıda olması uygulayıcıya sınırlı süreye ve nesnel olanaklara göre haraket edebilme esnekliğini verecektir. Ancak, eğitim ve öğretimin her konusunda olduğu gibi, burada da bizzat öğrencinin yardım ve gayretlerinin bu sürenin ve nesnel olanakların yüksek verimli kullanılmasında etken olacağı kuşkusuzdur.

Sevgili öğrencilerimin bilgi hazinelerine bu "Uygulama Klavuzu"nun yeni bilgiler ilâve edeceğini ümit ve temenni ediyorum.

Ankara, 1984

M. Hilmi PAMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Mayaların Morfolojik İncelenmesi ... 7

II. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Bakterilerin Morfolojik İncelenmesi ... 11

III. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Küf Mantarlarının Morfolojik İncelenmesi 17

IV. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Alglerin Morfolojik İncelenmesi 21

V. UYGULAMA

Yenebilir Şapkalı Mantarların Morfolojik İncelenmesi 25

VI. UYGULAMA

Bakteriyofajların Saptanması 29

VII. UYGULAMA

Fermantasyon Gidişinin İzlenmesi 33

VIII. UYGULAMA

Alt ve Üst Fermantasyon Maya Tiplerinin Ayırt Edilmesi 41

IX. UYGULAMA

Mayaların Topaklanma Hızının Tayini 47

X. UYGULAMA

Bir İşletme Mayasında Yabanî Mayaların Ayırt Edilmesi 50

XI. UYGULAMA

Bir İşletme ve Paket Mayasının Genel Görünüşü 55

XII. UYGULAMA

Bir İşletme Mayasının Biyolojik İncelenmesi 62

XIII. UYGULAMA

İşletme Mayası Dışındaki Materyalin Biyolojik İncelenmesi .. 68

XIV. UYGULAMA

Biyokitlenin Bulanıklık Ölçme Yöntemi (Nefelometri) İle Tayini 78

XV. UYGULAMA

Biyokitle Gelişme ve Çoğalmasının Tayini 83

XVI. UYGULAMA

Misel Oluşturan Organizmalarda Biyokitle Gelişiminin Tayini 88

XVII. UYGULAMA

Dış Etkenlerin Küf Mantarının Gelişmesi Üzerine Etkisi 92

XVIII. UYGULAMA

Küf Mantarlarının Nişasta ve Proteini Parçalamaları 97

XIX. UYGULAMA

Küf Mantarlarının Organik Asit Oluşturmaları 101

Literatür 106

I. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Mayaların Morfolojik İncelenmesi

GENEL BİLGİ: Hangi mikroorganizmalara maya denileceğini tayin etmek zordur. Mayanın klasik olan "tomurcuklanma ile çoğalan ve şekeri alkol ve CO_2'e dönüştüren tek hücreli mikroorganizma" tanımı bu mikroorganizmaların incelenmesinde yeterli olamamıştır. Bugün yapılan başka tanımlamalar arasında Windisch (Rehm, 1967)'e göre, maya *Ascomycetes*'in Endomycetales takımına dahildir; birbirinden ayrı oluşan asklar dışında herhangi bir üreme organına sahip değildir; koyu renk bakımından herhangi bir ayrıcalığı yoktur ve yaşamları konukçu bir bitkinin varlığına bağlı değildir.

Spor oluşturan maya türü *Endomycetaceae* veya *Saccharomycetaceae* familyasına dahildir. Bu familyadaki maya türlerine aynı zamanda "gerçek maya"da denilir. Bunun yanında spor verdiği bugüne kadar saptanmamış mayalar da vardır. Bunlar Fungi Imperfecti adı altında toplanırlar ve çok defa "maya benzeri fungi" olarak tanımlanırlar. Bu mayalar *Cryptococcaceae* familyasına dahildirler.

Bu familyalara *Sporobolomyces* ve *Bullera* adında iki kırmızı renkli cinsin dahil olduğu *Sporobolomycetaceae* familyasını da ilâve etmemiz gerekir.

Uygulama saatinde yukarıda adları verilen familyalardan bir veya birkaç maya çeşidinin tanıtımı yapılacaktır.

MALZEME:

1. Mikroorganizmalara ait sıvı veya katı kültürler:

1.1. *Endomycopsis* (Fam.: *Endomycetaceae)*

1.2. *Saccharomyces* (Fam.: *Saccharomycetaceae)*
Schizosaccharomyces " "
Pichia " "
Hansenula

1.3. *Candida* (Fam.: *Cryptoocccaceae)*
Torulopsis " "
Kloeckera " "

1.4. *Cryptococcus* (Fam.: *Sporobolomycetaceae)*

2. Mikroskop, lam ve lamel

3. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Bir cam çubuk veya damlalıklı şişe ile temiz bir lam üzerine ortaya gelecek şekilde bir damla su koyunuz. Şayet birkaç obje birbirleriyle karşılaştırmalı olarak incelenecekse, o takdirde lam üzerine yan yana gelmek üzere birkaç damla su konulabilir.

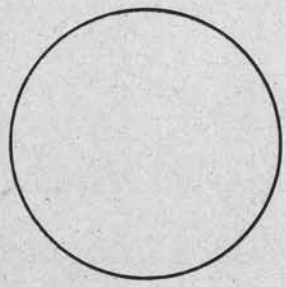
2. Bir cam çubuk veya öze ile kültürden alınan örneğin su damlasına nakledilerek iyice dağılmasını sağlayınız. Alınan örneğin miktarı su damlasını hafif bulandıracak kadar olmalıdır.

3. Temiz bir lam alınız ve bir kenarını damlaya temas ettirerek yavaşça damla üzerine bırakınız. Lamelin kenarlarından taşan suyu bir filtre kâğıdına emdiriniz.

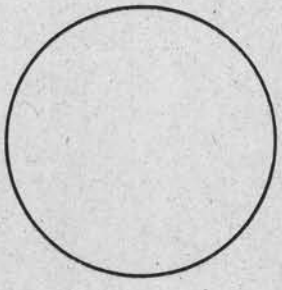
4. Hazırladığınız bu preparatı mikroskop altında 600 büyütme ile morfolojik olarak inceleyiniz ve şekillerini yapınız.

SONUÇ

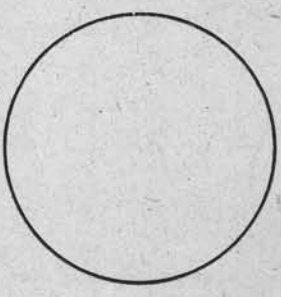
Mikroskop
büyütmesi: X



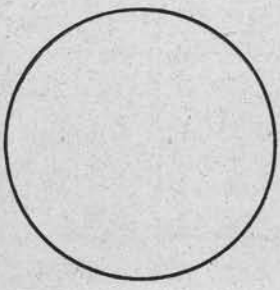
Endomycopsis lipolitica



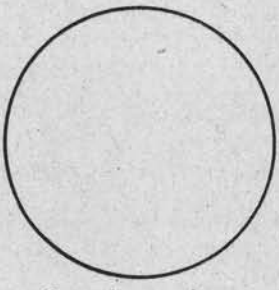
Saccharomyces cerevisiae



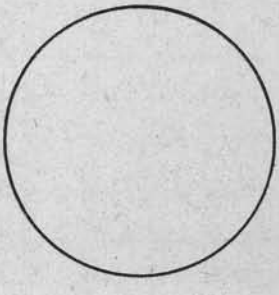
Schizosaccharomyces pombe



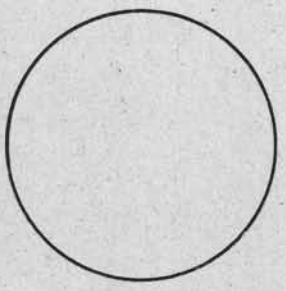
Pichia membranaefaciens



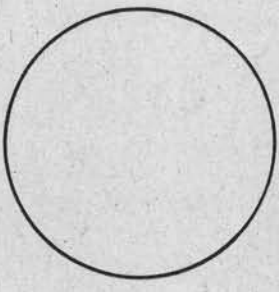
Hansenula anomala



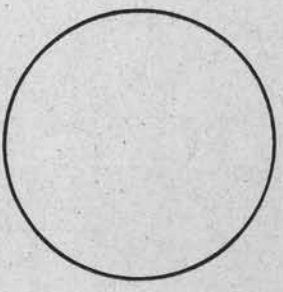
Candida tropicalis



Torulopsis utilis



Kloeckera apiculata



Sporobolomyces sp.

SORULAR:

1. İncelediğiniz mayaların genel morfolojik karakterlerini yazınız.

a)	f)
b)	g)
c)	h)
d)	ı)
e)	i)

2. Maya hücrelerinin sabit preparat ve ışık mikroskobu altında sitoplazmada gördüğünüz şeyleri tanımlayınız.

3. İncelediğiniz mayaların çoğalma şekillerini saptayınız ve tanımlayınız.

4. Kırmızı mayalardaki rengin nereden ileri geldiğini inceleyiniz.

Tarih:

Uygulamayı yaptıran
İmza

II. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Bakterilerin Morfolojik İncelenmesi

GENEL BİLGİ: Bakteriler çeşitli şekil ve büyüklükte tek hücreli mikroorganizmadandırlar. Bunların içinden mikrobik fermantasyonlarda adı geçen *Pseudomonadales*, *Eubacteriales* ve *Actinomycetales* takımlarında toplanmışladır. Bu takımların özellikle aşağıda adları ve kısa tanımları verilen familyaları teknik bakımdan önemli bakterileri içermektedir.

1. *Pseudomonadaceae:* Bu familyaya dahil olan bakteriler çok defa zor saptanabilen polar kirpikçiklere sahiptirler. Spor oluşturmazlar. Çoğunlukla G (–)'dirler ve heterotrofturlar.

2. *Micrococcaceae*: Bu familyaya giren bakteriler heterotrofturlar. Karbonhidratları yıkıma uğratarak asit oluştururlar. Çoğunlukla aerobturlar. G(+) özellik gösterirler. Sıklıkla sarı, oranjdan kırmızıya kadar renk maddesi oluştururlar. Yuvarlak, bölünme sırasında elliptik şekildedirler. Bölünme iki veya üç düzlemde meydana gelir. Hücre grupları *(Micrococcus)* veya hücre paketleri *(Sarcina)* oluştururlar.

3. *Lactobacteriaceae:* Spor oluşturmazlar. Hareketsizdirler. Renk maddesi oluşturmazlar. G(+) ve katalaz (—)'dirler. Anaerobik veya mikroaerofilik koşulları tercih ederler. Kok şeklinde kısa veya daha uzun zincirler halinde *(Streptococcus)* veya çomak şeklinde tek, çift veya daha uzun zincirler halinde *(Lactobacillus)* bulunurlar. Sonuncu halde tek hücreler çok uzun, hatta flament olabilirler.

4. *Propionibacteriaceae:* Bu familya bükülmeye veya uç kısımda şişmeye *(Butyribacterium)* veya pleomorfizme *(Propionibacterium)* eğilim gösteren çomak şeklinde bakterileri içerir. Hareketsiz G(+) bakterilerdir.

5. *Achromabacteriaceae:* Bu familyada küçük ve orta büyüklükte ve üniform şekilde çomak bakterileri bulunur. Peritrik kirpikçikli olanları hareketlidir. Hareketsiz olanları da vardır. G(–)'dirler. Yatık agarda renksizden sarıya, oranja, kahverengiye veya kırmızıya kadar değişik renk gösterirler. Renk maddesi agar içine nüfuz etmez.

6. *Enterobacteriaceae:* Bu bakteriler düz çomak şeklinde ve G(—)'dirler. Hareketli olanları peritrik kirpiklidir.

7. *Bacillaceae:* Bu familyaya giren bakteriler çomak şeklindedirler. Spor yaparlar. Hareketli olanları peritrik kirpiklidir. Genellikle G (+)'dirler. Sporlar silindiriik, ellipsoit veya yuvarlaktır ve hücrenin ortasında, supterminal veya terminal olarak yerleşmişlerdir.

8. *Actinomycetaceae:* Bu familyadaki bakterilerin gelişmelerinin ilk evresinde miselyum bölmeli değildir. Fakat daha sonra bölme oluşur ve çomak veya küresel şekillerde küçük parçalara ayrılır veya misel bölmesiz kalır ve havaî hif üzerinde sporlar oluşturur. Organizmalar besiyerlerinde ya renksiz yahut çeşitli pigmentler meydana getirir. Bazı türleri kısmen "acid-fast"dir.

9. *Streptomycetaceae:* Bu familyada bir öncekinin aksine, misel basil veya kok benzeri şekillerde parçacıklara bölünmez. Konidiler sporoforlar üzerinde oluşur.

Uygulama saatinde yukarıda adları verilen familyalardan bir veya birkaç bakteri çeşidinin tanıtımı yapılacaktır.

MALZEME:

1. Mikroorganizmalara ait kültürler

1.1.	*Pseudomonas*	(Fam.:*Pseudomonadaceae*)
	Acetobacter	" "
	Methanomonas	" "
1.2.	*Pediococcus*	(Fam.:*Micrococcaceae*)
	Micrococcus	" "
1.3.	*Lactobacillus*	(Fam.:*Lactobacteriaceae*)
	Streptococcus	" "
	Leuconostoc	" "
1.4.	*Propionibacterium*	(Fam.:*Propionibacteriaceae*)

1.5. *Achromabacterium* (Fam.:*Achromabacteriaceae*)
Alcaligenes " "

1.6. *Escherichia* (Fam.:*Enterobacteriaceae*)
Aerobacter " "

1.7. *Bacillus* (Fam: *Bacillaceae*)
Clostridium " "

1.8. *Actinomyces* (Fam.: *Actinomycetaceae*)

1.9. *Steroptomyces* (Fam: *Streptomycetaceae*)

2. Mikroskop

3. Lam ve lamel

4. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. İncelenecek her bir bakteririnin metilen mavisi kullanarak boyalı preparatını harzırlayınız (Bkz.: Pamir, 1967).

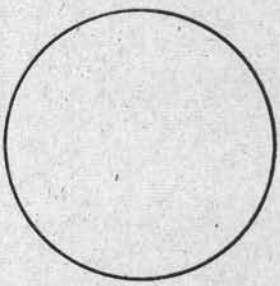
2. En küçük objektifi kullanarak objeyi bulunuz.

3. Lam üzerine 1 damla sediryağı damlatınız.

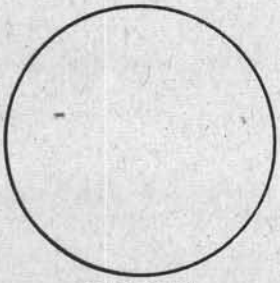
4. İmmerziyon objektifi ile objeyi inceleyiniz.

SONUÇ

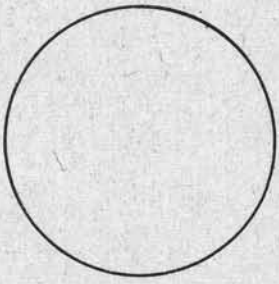
Mikroskop
büyütmesi: ×



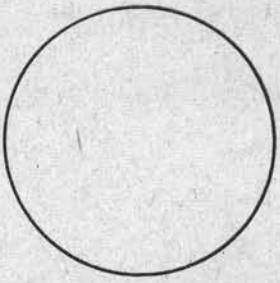
Pseudomonas sp.



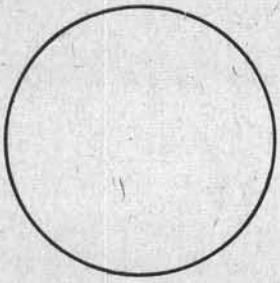
Acetobacter sp.



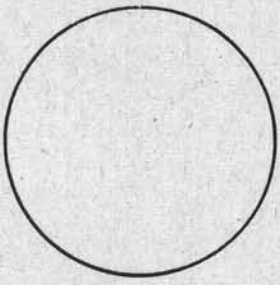
Methanomonas sp.



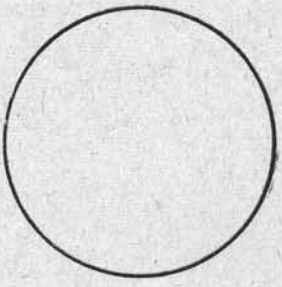
Pediococcus cerevisiae



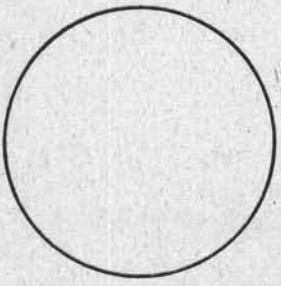
Micrococcus sp.



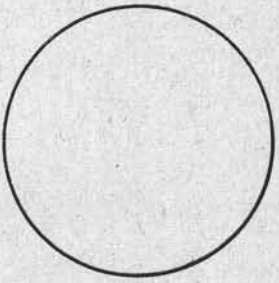
Lactobacillus brevis



Streptococcus termophilus



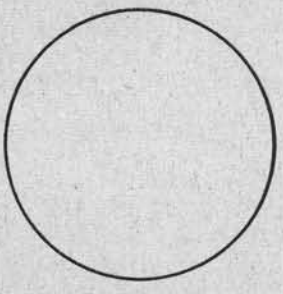
Leuconostoc sp.



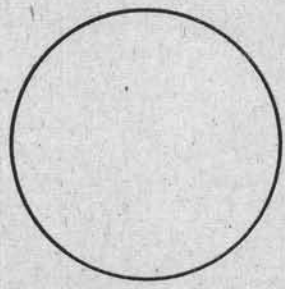
Propionibacterium sp.

SONUÇ

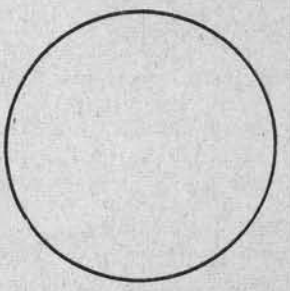
Mikroskop
büyütmesi: ×



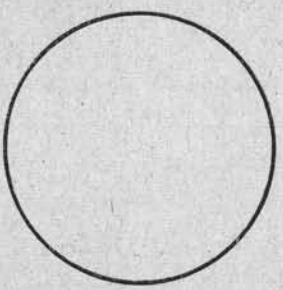
Achromabacterium sp.



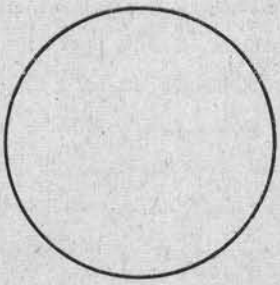
Alcaligenes sp.



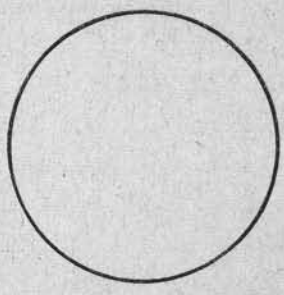
Escherichia coli



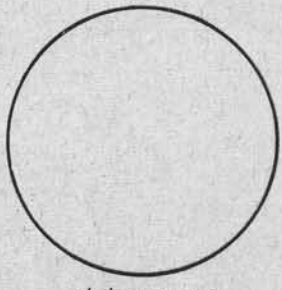
Aerobacter aerogenes



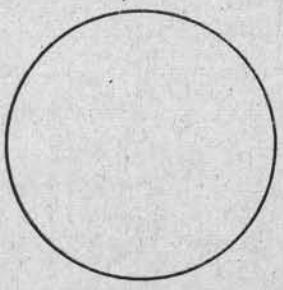
Bacillus subtilis



Clostridium acetobutylicum



Actinomycetes sp.



Steroptomyces sp.

SORULAR:

1. İncelediğiniz bakterilerin genel morfolojik karakterlerini yazınız.

a) k)

b) l)

c) m)

d) n)

e) o)

f) p)

g) r)

h) s)

i) t)

2. İncelediğiniz bakterilerden en az beşinin hangi endüstride kullanıldığını veya kullanılabileceğini inceleyiniz.

a)

b)

c)

d)

e)

3. Bir yuvarlak ve çomak bakteri hücresinin hacmini ve ağırlığını inceleyiniz.

Tarih:

Uygulamayı yaptıran
İmza

III. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Küf Mantarlarının Morfolojik İncelenmesi

GENEL BİLGİ: Küf mantarları çok çeşitli metabolizma ürünü meydana getirdikleri için uzun zamandanberi endüstriyel bir önem taşımaktadırlar. Sistematikte *Phycomycetes*, *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* ve *Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)* sınıflarına giren küf mantarlarının tallusunu hif oluşturur. Hifler çoğunlukla kitin ve ender olarak selülloz-dan oluşan bir membranla çevrilidir. Bu hifler bölmesiz veya bölmeli, tek veya çok çekirdekli (coenocytic), dallanmamış veya dallanmış olabilir. Hif topluluğuna "misel" denilir. Vejetatif hiflerin görevi esas olarak substrattan besin maddelerini almaktır. Üretken hifler ise, çoğalma organlarını (spor ve konidi) oluşturmakla görevlidirler.

Yukarıda adlarını verdiğimiz dört sınıftan önemli endüstriyel küf mantarı türlerinin dahil olduğu familyaların adları ve bunların kısa tanıtımları aşağıda verilmiştir:

1. *Mucoraceae:* Bu familyanın miseli, çok az istisnayla, en gelişmiş türlerinde bölmesizdir, fakat yaşlı hif ve sporongiyofor bölmelidir. Eşeysiz sporlar sporongiyum içinde oluşurlar. Eşeyli çoğalma zigosporlarla olur. Hif bir membranla çevrilidir ve çok çekirdeklidir.

2. *Aspergillaceae:* Bu familyanın genel karakteri hifin bölmeli ve dallanmış olmasıdır. Bundan başka bu küf mantarlarında eşeysiz çoğalma tek hücreli konidilerle olur ve bunlar hava hifinden çıkan konidi taşıyıcıları üzerinde bulunan "sterigma" üzerinde oluşurlar. Sterigma ise "metula" denilen ara taşıyıcılar üzerindedir.

3. *Agaricaceae: Basidimoycetes* sınıfına giren bu familyadan "Yenebilir Şapkalı Mantarlar" bölümünde bahsolunacaktır.

4. *Moniliaceae:* Bu familyada hifler çok çekirdekli değildir. Hifler çoklukla bölmelidir. Konidi bir kaç cinsi hariç normal olarak mevcuttur. Konidiler ve konidiyoforlar bir piknidiyum veya aservulus

içinde oluşmaz. Konidiler az veya çok kangal veya spiral şekilde bükülmüştür. Konidiler renksiz veya koyu renkte olabilir. Konidi ve konidiyoforlar –varsa– renksiz ve parlak renkli; konidiyoforlar "sporodochia" veya "synnemata" halinde birleşmiş değildirler *(Trichoderma, Fusarium)*.

5. *Dematiaceae:* Bu familyadaki mantarların "*Moniliaceae*" dekilerden farkı konidiyofor ve/ veya konidilerin koyu renk maddesi içermeleridir *(Botrytis)*.

Uygulama saatinde yukarıda verilen familyalardan bir veya birkaç mantar çeşidinin tanıtımı yapılacaktır.

MALZEME:

1. Mikroorganizmalara ait kültürler.

1.1. *Mucor circinelloides*	(Fam.:*Mucoraceae*)
Rhizopus sp.	" "
1.2. *Aspergillus niger*	(Fam.:*Aspergillaceae*)
Penicillium cyclopium	" "
1.3. *Trichoderma viride*	(Fam.:*Moniliaceae*)
Fusarium sp.	" "
1.4. *Botrytis sp.*	(Fam.:*Dematiaceae*)

2. Mikroskop ve stereomikroskop
3. Lam, lamel ve ok uçlu iğneler
4. % 96'lık alkol
5. % 10'luk NaOH
6. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Bir ok uçlu iğneyi plat agarın yüzeyine mümkün olduğu kadar yatay tutarak âni bir hareketle bir misel parçası alınız.

2. Misel parçasını daha önce bir lam üzerine konulmuş % 96'lık alkol damlasına bir an temas ettiriniz.

3. Misel parçasını daha önce aynı lam üzerine konulmuş % 10' luk NaOH çözeltisi içine nakledíniz.

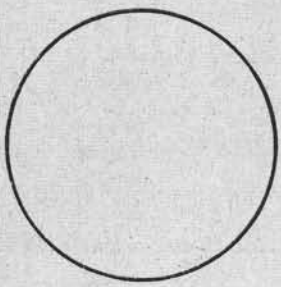
4. İki ok uçlu iğne kullanarak miseli hafifçe didikleyiniz.

5. Üzerine hava kabarcığı oluşmayacak şekilde lamel kapatarak mikroskopta inceleyiniz.

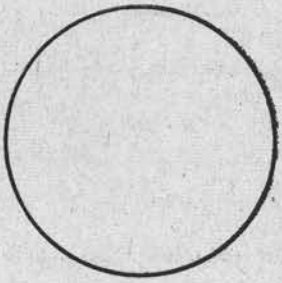
6. Plat agarları stereomikroskopta da inceleyerek küf mantarlarının morfolojileri hakkında tam bir bilgi edininiz.

SONUÇ

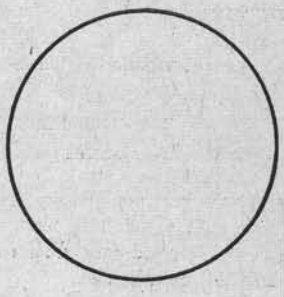
Mikroskop
büyütmesi: ×



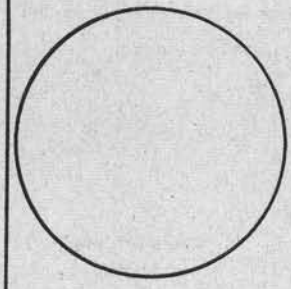
Mucor circinelloides



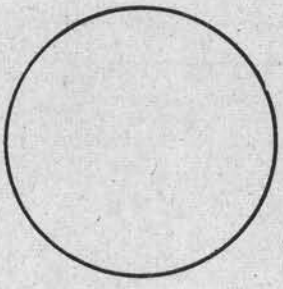
Rhizopus sp.



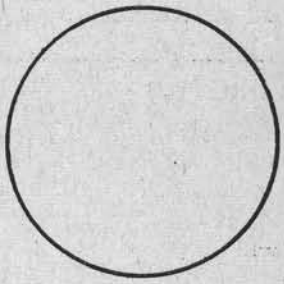
Aspergillus niger



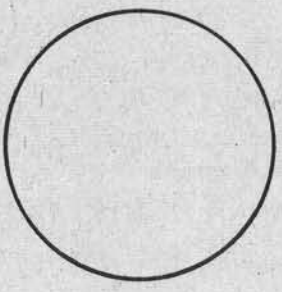
Penicillium cyclopium



Trichoderma viride



Fusarium sp.



Botrytis sp.

SORULAR:

1. *Mucor* ile *Rhizopus*'u birbirinden ayıran başlıca özellikleri söyleyiniz.

2. *Aspergillus* ile *Penicillium*'u birbirinden ayıran başlıca özellikleri söyleyiniz.

3. İncelediğiniz mantarların endüstride hangi amaçla kullanıldığını veya kullanılabileceğini inceleyiniz.

Tarih:

Uygulamayı yaptıran
İmza

IV. UYGULAMA

Teknikte Kullanılan Bazı Alglerin Morfolojik İncelenmesi

GENEL BİLGİ: Algler de bakteriler, mayalar ve küf mantarları gibi en basit bitkilerdendir. Pekçoğu klorofil içerdiklerinden fotosentez yaparlar.

Alglerin şekilleri ve büyüklükleri çok değişiktir. Birçokları tek hücreli veya bunlardan oluşan koloniler halindedir. Şekilleri yuvarlak, çomak, yumru ve sarmal olabilir. Ayrıca bu şekillerin varyasyonları da olabilmektedir. Hareketli olanlarının yanında hareketsiz olanları da vardır. Eşeyli ve eşeysiz çoğalabilirler.

Bugüne kadar kitle halinde yetiştirilen alglerin dahil oldukları alg familyalarının adları ve bunların kısa tanıtımları aşağıda verilmiştir.

1. *Clamydomonadaceae:* Bu familyadaki alglerin şekilleri yuvarlak oval veya silindiriktir. Tek hücrelidir. Çoğunlukla ana hücre içeriğinin uzunlamasına tekrarlanan bölünmesiyle oluşur ve sayısı 2–16'yı bulur. Membranın parçalanmasıyla serbest hale gelen bu hücreler iki eşit kamçıyla hareket ederler.

2. *Chlorophyceae* (Yeşil algler) : Bu familyadaki algler oval veya yuvarlak şekil gösterirler. Bunlar vejetatif döneminde kamçısız, dolayısıyla hareketsizdirler. Eşeysiz çoğalma şekli gösteren bu alglerde stoplazmanın bir membranla çevrilmesiyle çok sayıda zoospor oluşur. Anahücre membranının parçalanmasıyla sporlar serbest kalırlar. *Chlorococcum* cinsinde sporlar kamçılıdır.

3. *Myxophyceae* (Mavi-Yeşil Algler) : Bu familyadaki algler tek hücreli veya ipliksidirler. Fotosentez yapabilirler.

Bu uygulama saati içinde yukarıda adları verilen familyalardan bir veya birkaç alg çeşidinin tanıtımı yapılacaktır.

MALZEME:

1. Alg kültürleri

1.1. *Clamydomonas sp.* (Fam.:*Clamydomonadaceae)*

1.2. *Chlorella sp.* (Fam.:*Chlorophyceae)*
Scenedesmus sp. " "
Chlorococcum sp. " "
Pediastrum sp. " "

1.3. *Anabaena sp.* (Fam.: *Myxophyceae)*

2. Alglerin doğal habitatından (Havuz, göl v.b.) alınmış örnek

3. Mikroskop

4. Lam ve lamel

5. Diğer malzeme

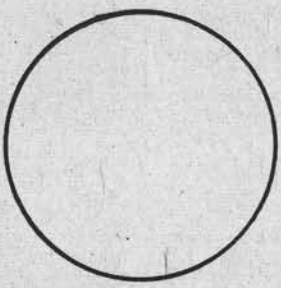
İŞLEM:

1. Alg kültürlerinden ve algin doğal habitatından alınan örnekten basit bir preparat hazırlayınız.

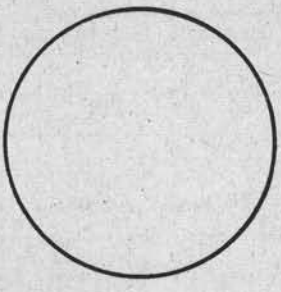
2. Hazırladığınız preparatı 400–600 büyütmeyle mikroskop altında inceleyiniz.

SONUÇ

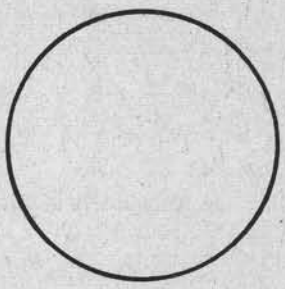
Mikroskop
büyütmesi: ×



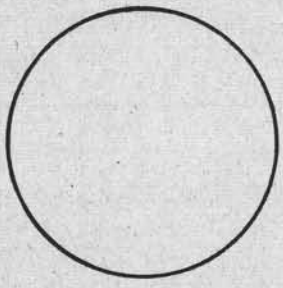
Clamydomonas sp.



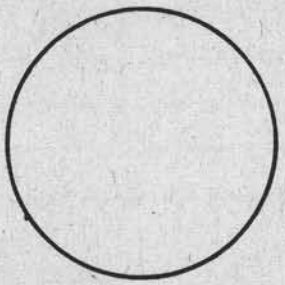
Chlorella sp.



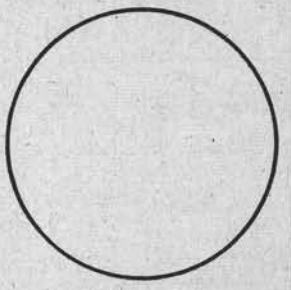
Scenedesmus sp.



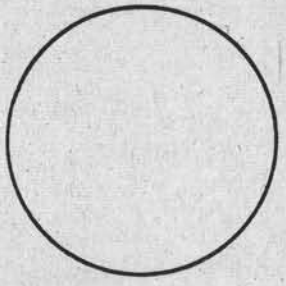
Chlorococcum sp.



Pediastrum sp.



Anabaena sp.



Doğal Örnek

SORULAR:

1. İncelediğiniz alg türlerinin familya ve cins özelliklerini dikkate alarak morfolojik karakterlerini yazınız.

a)

b)

c)

d)

e)

f)

2. Alglerin teknikte kullanılmalarının nedenlerini yazınız.

3. Alg yetiştirilmesinde ölçü birimi ve verim nedir? Bu verim için gereken CO_2 ve hava miktarını hesaplayınız.

4. Alg yetiştirmeyi uzay yolculuklarında da düşünmenin mantıksal açıklamasını yapınız.

Tarih:

Uygulamayı yaptıran
İmza

V. UYGULAMA

Yenebilir Şapkalı Mantarların Morfolojik İncelenmesi

GENEL BİLGİ: Yüksek mantarlardan bazıları halk dilinde adı "şapka" olarak geçen ve etimsi, gözle görülebilen üreme organlarına (=Askokarp ve Basidiyokarp) sahiptirler. Bu mantarlar meydana getirdikleri bazı önemli maddeler dışında insan besini olarak da kullanılmaları nedeniyle endüstriyel ve ekonomik açıdan ilgi çekmektedirler. Bunlar sınıflandırma da kısmen *Ascomycetes*, kısmen de *Basidiomycetes* sınıfına girerler.

Ascomycetes'den iki familya, *Basidiomycet*'den ise çeşitli familyalar sözkonusudurlar. Bunlardan teknikte önemli sayılan şapkalı mantarları içerenlerin aşağıda kısa bir tanıtımı yapılacaktır:

1. *Helvellaceae:* Bu familyaya giren mantarlar saplıdırlar ve ancak gençken "Becher kabı" şeklindedir. Daha sonra lameller yüksük şeklinde aşağıya doğru kapanırlar ve askusların dışarıya doğru dönmesini sağlarlar. Bu sırada lameller sıkı bir şekilde birbiri üzerine katlanırlar ve sünger manzarası gösterirler. Renkleri genellikle bulundukları ortama uygun olarak esmerimsi griden beyaza kadar değişir. Bununla beraber her çeşidin kendine özgü rengi sabit olmayıp yaşa göre değişir.

2. *Tuberaceae:* Bu familyadaki şapkalı mantarlar çoğunlukla toprak altında yaşarlar. Şapkalarının yüzeyleri düz veya "memeli"dir. Renkleri kahverengidir. Olgunlaştıkları zaman açılmazlar.

3. *Agaricaceae: Basidiomycet*'lerden olan bu familyanın genel özelliklerine gelince, lameller (=giller) şapkanın altında oluşur ve saplı olanlarında saptan çevreye doğru ışınsal (=radyal), olmayanlarda ise şapkanın bağlanma noktasından çevreye doğru yer alırlar. Basidiyokarpları bazılarında deri, tıpa mantarı veya odun sertliğinde, bazılarında ise, çok yumuşaktır. Sporları beyaz, pembe, kahve, mor ve siyah renkte olabilir.

Uygulama saati içinde yukarıda adları verilen familyalardan bir veya birkaç şapkalı mantar çeşidinin tanıtımı yapılacaktır.

MALZEME:

1. Şapkalı mantar örnekleri

1.1. *Morchella sp.* (Fam.:*Helvellaceae*)

1.2. *Tuber sp.* (Fam.:*Tuberaceae*)

1.3. *Agaricus sp.* (Fam.:*Agaricaceae*)

2. Stereomikroskop ve mikroskop

3. Aşı iğnesi, lam ve lamel

4. Spatül veya jilet

5. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Verilen şapkalı mantar örneğinin kısımlarını inceleyerek gözlemlerinizi yazınız ve resmini çiziniz.

2. Bir spatül veya jilet kullanarak şapkayı ortadan kesiniz. Kesiti inceleyerek gözlemlerinizi yazınız ve resmini çiziniz.

3. Bir spatül veya jilet kullanarak mümkün olduğu kadar ince bir kesit alarak lam üzerine naklediniz ve stereomikroskop altında inceleyiniz.

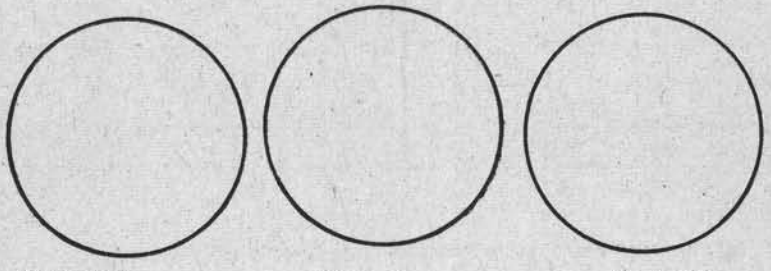
4. Aşı iğnesi kullanarak lameller arasından bir lam üzerindeki su damlacığı üzerine bir miktar spor naklediniz ve 500 büyütmeyle sporları mikroskop altında inceleyiniz, gözleminizi kaydediniz ve şekillerini çiziniz.

SONUÇ

1. Şapkalı mantarın morfolojisi :

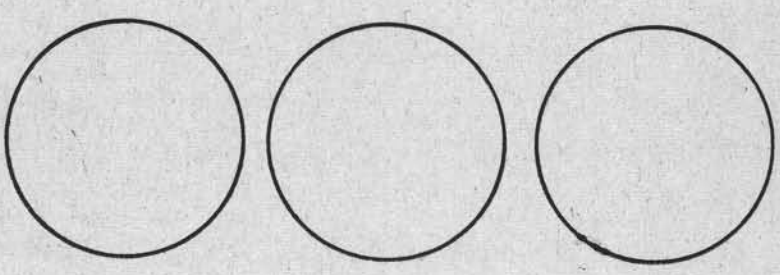
Morchella sp. *Tuber sp.* *Agaricus sp.*

2. Bir askokarp kesitinin stereomikroskop altında görünüşü:



Morchella sp. *Tuper sp.* *Agaricus sp.*

3. Sporların mikroskop altında incelenmesi:



Morchella sp. *Tuber sp.* *Agaricus sp.*

SORULAR:

1. İncelediğiniz şapkalı mantar türlerinin familya ve cins özelliklerini dikkate alarak morfolojik karakterlerini yazınız.

a) _____

b) _____

c) _____

2. Yenebilir ve zehirli mantarları birbirinden ayırt etmeye yarayan özellikler nelerdir?

Yenebilir (*Agaricus campestris*)	Zehirli (*Amanitas sp.*)
a)	
b)	
c)	
d)	
e)	
f)	
g)	
h)	

3. Zehirli mantar yiyen bir insanda görülen klinik tablo nedir?

_____

_____

_____

_____

_____

Tarih:

Uygulamayı Yaptıran
İmza

VI. UYGULAMA

Bakteriyofajların Saptanması

GENEL BİLGİ:

Mikrobik virus olarak tanınan fajlardan bakterilere ârız olanlara "bakteriyofajlar" denilir. Bunun gibi *Actinomycetes*'e ârız olanlara "aktinofaj", mavi-yeşil alglere ârız olanlara da "siyonofaj" (*Cyanophages*) denilmektedir.

Bakteriyofajlar hassas bakterilere ârız olarak onları lize ederler. Bu özellikleri nedeniyle kolay bir şekilde tanınırlar.

Bakteriyofajlar fermantasyon endüstrisinde kullanılan bakterilere özellikle *Clostridium*'lara ârız olarak prosesin aksamasına, bazan da durmasına neden olurlar. Eskiden, özellikle yirmili yıllarda bu olaylara sık rastlanırdı. Ancak belli bakteriyofajların belli bakterilere ârız oldukları bilindikten sonradır ki, bakteriyofajlara dirençli bakteriler bulundu. Bugün sıklıkla endüstri işletmelerinde faja dirençli bakteriler kullanılmaktadır. Faja dirençli suşlar platlar üzerinde veya faj içeren sterilize edilmemiş toprakta bakteri suşlarının 6 ay süreyle yetiştirilmelerinin arkasından yapılan seleksiyonla elde olunurlar.

Bu uygulama saati içinde atık sudan *E. coli* fajlarının saptanması gösterilecektir.

MALZEME:

1. Yatık agarda (Nutrient Agar) bir *E. coli* kültürü (37°C'de 14 saat)
2. Normal ve "çift kuvvetli" besiyeri (Nutrient Broth) pH2
3. 2 ml'lik steril pipet
4. 500 ml'lik yuvarlak yanaklı şişe

5. Çalkalamalı inkübatör

6. Atıksu örneği

7. Santrifüj

8. G5 filtresi

9. Diğer malzemeler

İŞLEM:

1. *E. coli*'nin yatık agar kültürü üzerine steril pipetle aldığınız besiyerinden aseptik koşullar altında 1 damla koyunuz.

2. Aynı pipetle bakterileri kazıyarak homojen bir pasta haline getiriniz.

3. Besiyerinin geri kalan kısmını verirken sürekli ve dikkatli bir kazıma yapınız ve iyice karışmasını sağlayınız.

4. Bütün karışımı tekrar pipetle alınız. Bu sırada bakteri veya agar topakçıklarının alınmamasına dikkat ediniz.

5. Bu karışımı içerisinde 50 ml "çift kuvvetli" besiyeri bulunan yuvarlak yanaklı şişeye naklediniz.

6. Şişeyi 37°C 'de 2 saat süreyle inkübe ediniz. Çalkalamalı inkübatör yoksa, o takdirde steril hava verilerek daldırma (=derin) kültür havalandırılabilir.

7. Atıksuyu santrifüj ediniz (10 dakika, 5000. g).

8. Tortunun üstünde kalan kısmı bakteri filtresiyle filtre ederek (G 5 filitresi veya Sartorius membran filtresi SM 11 008, 11 308) bakterileri ortamdan uzaklaştırınız.

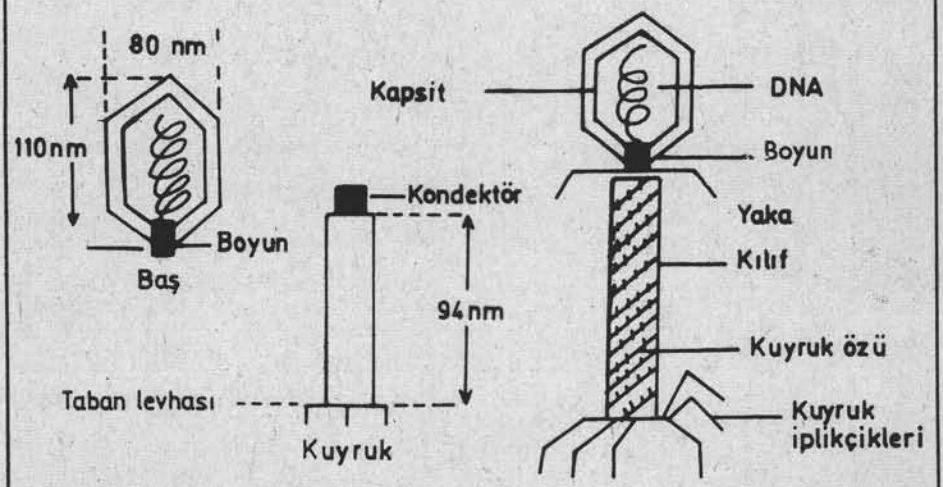
9. Bu filtrattan 5 ml alarak *E. coli* kültürüyle karıştırınız ve 2 saat çalkalayıcıda inkübe ediniz.

10. Kültürden 0.1 ml alınız ve "seyreltme-plaka" yöntemiyle yumuşak agarlı besiyeri (% 0.5 agar) kullanarak plat hazırlayınız.

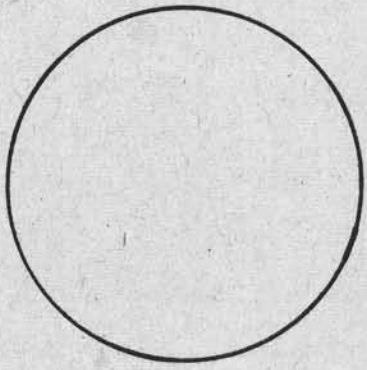
11. Yumuşak agar platı üzerinde oluşan lize edilmiş olanları saptayınız ve şeklini çiziniz.

SONUÇ

1. *E. coli*'nin T4 fajının strüktürü:



2. Lize olmuş alanların görünüşü:



SORULAR:

1. Atıksuda bakteriyofajların bulunmasının sanitasyon yönünden önemini inceleyiniz.

2. Bakteriyofajların genetik yolla yeni suşların elde olunmasındaki yerini açıklayınız.

3. "Virulan" ve "iyi huylu" (Temperate) fajları tanımlayınız.

Tarih:

Uygulamayı yaptıran
İmza

VII. UYGULAMA

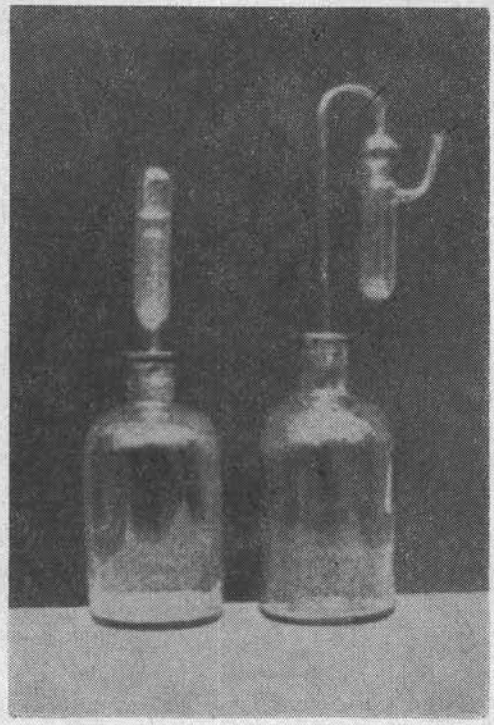
Fermantasyon Gidişinin İzlenmesi

GENEL BİLGİ: Pratikte kullanılacak bir mayanın fermantasyon öncesinde, sırasında ve sonrasındaki durumlarının laboratuvar, hatta pilot ölçeğinde yapılacak bir deneyle önceden bilinmesi gerekir. Böyle bir deneyin sonunda elde olunan bilgilerden o mayanın sür'atle fermantasyona geçip geçmeyeceği, fermanstasyonun sür'ati ve süresi, köpük, zar, adacık veya halka yapıp yapmadığı, kap cidarına tutunup tutunmadığı, fermantasyon sırasında ve sonrasında mayşenin berrak olup olmadığı, yaptığı tortunun durumu ve rengi, hangi şekerleri kullanabildiği v.b. özellikleri üzerinde veriler elde edebiliriz. Aşağıda bu amaç için kullanılan yöntemlerden bazılarının açıklamaları verilmiştir.

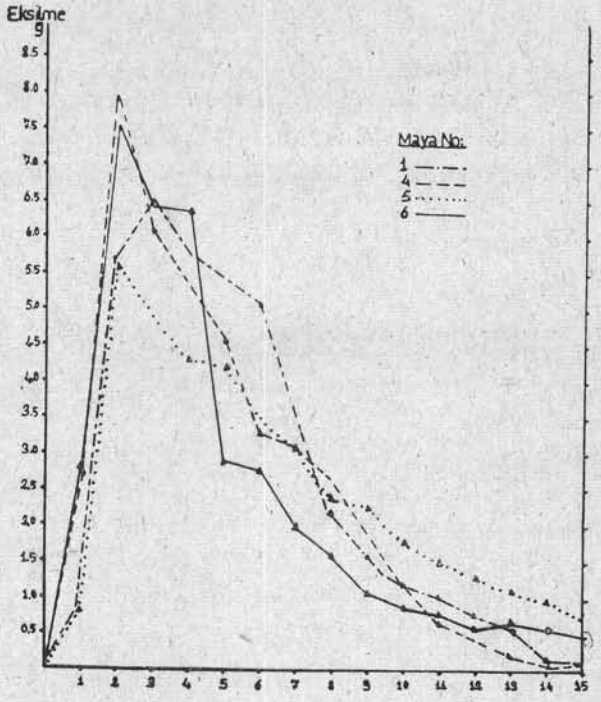
Ağırlık eksilmesi yöntemi: Fermantasyon gidişinin izlenmesi deneylerinde çoklukla ağızlarına çeşitli şekillerde yapılmış "fermantasyon başlıkları" bulunan cam kaplar kullanılır. Fermantasyonun bu yöntemle izlenmesi genellikle günlük ağırlık eksilmeleriyle yapılır (Şekil: 1 ve 2).

MATERYAL:

1. Berraklaştırılmış üzüm şırası
2. Bir tüp 48–72 saat'lik maya kültürü
3. Steril 5 ml'lik ölçülü pipetler
4. 500 ml'lik şişeler
5. Fermantasyon başlıkları
6. Desimal terazi
7. Diğer malzeme



Şekil 1. Fermantasyon başlıklı şişeler



Şekil 2. Dört ayrı maya suşuyla yapılan bir deneyde fermantasyonun izlenmesi

İŞLEM:

1. 500 ml'lik bir şişe alınız.

2. İçerisine 400 ml üzüm şırası koyunuz.

3. Şişe ağzını içinde bir miktar su bulunan bir fermantasyon başlığıyla kapatınız.

4. Buharlama cihazında 20 dakika tutunuz.

5. Soğuduktan sonra 5 ml'lik ölçülü pipetle aseptik koşullar altında maya kültüründen örnek alınız ve şişedeki şıraya bundan 4 ml naklediniz.

6. Günlük tartımlarınızı kaydediniz.

7. Ağırlık eksilmesi durduğu veya aynı devam ettiği zaman tartıma son veriniz.

8. Tartım sonuçlarını, örneğin Şekil 3'de görüldüğü gibi, bir grafikle değerlendiriniz.

Asit veya asit ve gaz oluşu yöntemi: Karbonhidratların assimilasyonu asit veya asit ve gaz (CO_2 ve / veya H_2) oluşuyla bir deney tüpündeki sıvı besiyerinde incelenebilir. Asit oluşu besiyerine uygun bir ayıraç, örneğin bromkrezol moru, bromtimol mavisi, fenol kırmızısı veya Andrade ayracı (100 ml dest. suda 0.5 g fuksin, 15 – 18 ml N NaOH) katmak suretiyle kolaylıkla görülebilir. Gaz oluşu için de besiyerinin hazırlanması sırasında deney tüpünün içine küçük bir tüp (Durham tüpü) konur. Bu amaç için kullanılan besiyerinin bileşimi incelenecek mikroorganizma grubuna bağlıdır.

MATERYAL:

1. Hayward besiyeri (asit ve gaz oluşu için):

Pepton (Oxoid)	% 0.5 (w/v)
Maya ekstraktı	% 0.3 (w/v)
Na-asetat (susuz)	% 0.5 (w/v)
Tween 80	% 0.1 (v/v)
Şeker (Sakkaroz)	% 2.5 (w/v)
Tuz A	% 0.5 (v/v)

Tuz B		% 0.5 (v/v)
Tuz A:	KH_2PO_4	10 g
	$K_2H\ PO_4$	10 g
	Dest. su	100 ml
Tuz B:	$MgSO_4.7H_2O$	11.5 g
	$MnSO_4.2H_2O$	2.4 g
	$FeSO_4.7H_2O$	0.68 g
	Dest. su	100 ml

2. Besiyeri (Şeker deneyi için):

Hayward besiyerine şeker olarak maltoz ve indikatör olarak da bromtimol mavisi katılarak kullanılır.

3. İçlerinde Durham tüpleri ve 1 ve 2 No'lu besiyerleri bulunan 2 tüp.

4. Hayward besiyerinde yetiştirilmiş 48–72 saatlik *Lactobacillus* ..... kültürü.

5. Steril Pasteur pipetleri.

6. Diğer malzeme.

İŞLEM:

1. İçlerinde 1 ve 2 no'lu besiyerleri bulunan iki tüpe bakteri kültüründen Pasteur pipeti yardımıyla aseptik koşullarda birer damla aşılayınız.

2. 37 °C'de inkübasyon yapınız.

3. Sonraki uygulamada tüpleri inceleyiniz. Asit ve gaz deneyinde sarı renk "asit pozitif" ve Durham tüpünde gaz varsa (+) değişiklik yoksa (—) olarak işaretleyiniz.

Kromatografik yöntem: Bu yöntem fermantasyonda kullanılan mayanın besiyerindeki çeşitli şekerlere karşı durumunu göstermesi bakımından önemlidir.

MATERYAL:

1. Besiyeri:	$(NH_4)_2SO_4$	% 0.5
	KH_2PO_4	% 0.1
	$MgSO_4.7\ H_2O$	% 0.05

$CaCl_2.2\ H_2O$	% 0.1	
NaCl	% 0.01	
Deney şekeri	% 0.5	
Biyotin	2 µg	
Ca–pantotenat	400 µg	
İnozitol	2000 µg	
Niyasin	400 µg	
P–Aminobenzoikasit	200 µg	yerine maya suyu
Piridoksin (HCl)	400 µg	
Tiyamin (HCl)	400µg	
Riboflavin	200 µg	
Su	10 µg	
veya		
Pepton (Difco)	% 1	
Deney şekeri	% 2	
Su	100 ml	

2. Whatman 1 kromatografi kâğıdı.

3. Taşıyıcı butil alkol-asetikasit-su (4:1:5).

4. Ayraç olarak difenilaminin etilalkoldeki % 2'lik çözeltisinden 5 kısım, alaninin etilalkoldeki % 2'lik çözeltisinden 5 kısım ve % 85 'lik fosforik asit çözeltisinden 1 kısım karışımı.

5. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Bir tüpe içerisinde deney şekeri bulunan besiyerinden 5 ml koyunuz.

2. Besiyeri üzerine 0.05 ml vitamin çözeltisi veya 2 damla maya suyu ve 1 damla maya süspansiyonundan ilâve ediniz.

3. Aynı zamanda içerisinde deney şekeri bulunmayan bir kontrol hazırlayınız.

4. Tüpleri 25 °C'de 4 hafta inkübasyona bırakınız.

5. Bu süre sonunda her tüpten 0.05 ml örnek alarak Whatman 1 kromatografi kâğıdına naklediniz.

6. Aynı nakil işini standart şeker çözeltisinden de yapınız.

7. Taşıyıcı çözeltisiyle arka arkaya 5 defa geliştirme yapınız.

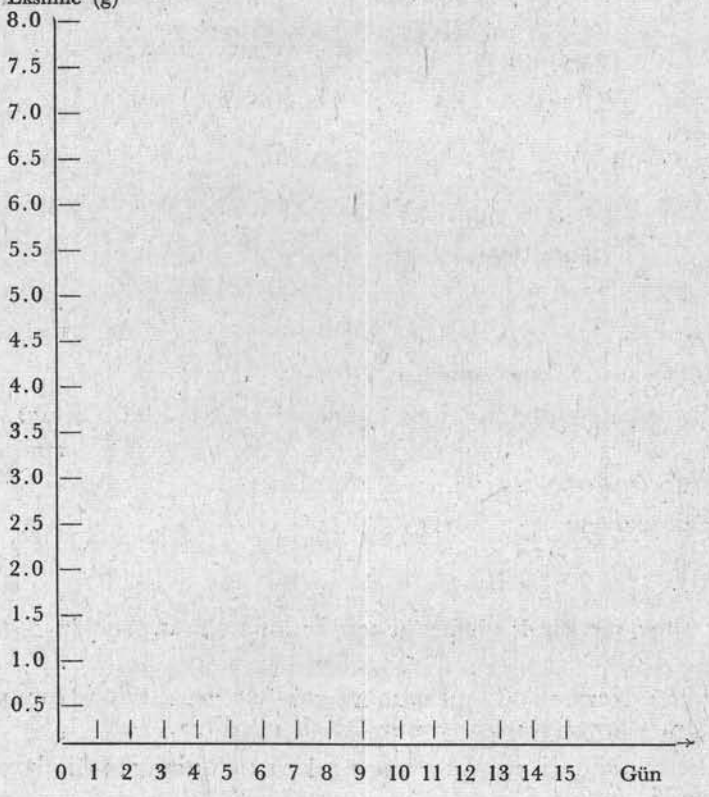
8. Ayraç çözeltisi leke yerlerine püskürtüldükten sonra 70–80° C'de ısıtınız.

9. Kromatogramı değerlendiriniz ve çiziniz.

SONUÇ

Ağırlık Eksilme Yöntemi

●—●—● = A mayası
△—△—△ = B mayası
■—■—■ = C mayası



Asit ve Gaz Oluşu Yöntemi

Mikroorganizma	Asit	Gaz
Laktobacillus		

Not: _____

_____

_____

SONUÇ

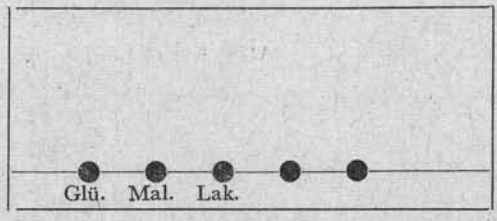
Kromatografik yöntem

Mikroorganizma	Glükoz	Maltoz	Laktoz
S. cerevisiae			
L .bulgaricus			

(+) = Assimilasyon var

(—) = Assimilasyon yok

Kromatogram



Not: _____

_____

_____

SORULAR:

1. Sizce deney mayaları A, B ve C arasında en sür'atli fermantasyon yapan maya hangisidir? Neden?

2. Durham tüpleriyle çalışmanın sakıncası nedir?

3. Deney mayaları bütün deney şekerlerini assimile edebildi mi? Nedeni?

4. Substratta çeşitli şekerlerin bulunması halinde pratik olarak ne önerirsiniz?

Tarih:

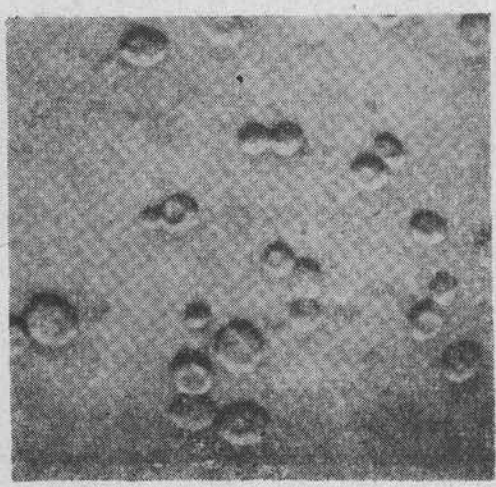
Kontrol eden
İmza

VIII. UYGULAMA

Alt ve Üst Fermantasyon Maya Tiplerinin Ayırt Edilmesi

GENEL BİLGİ: Teknikte kullanılan mayalar alt ve üst fermantasyon tipi mayalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu ayırma yalnız morfolojik değil, aynı zamanda fizyolojik özelliklere de dayanmaktadır.

Her iki tip mayanın mikroskop altındaki görünüşleri aynıdır, yani şekil, büyüklük ve stoplazmik görünüş bakımından belirgin hiçbir fark yoktur. Ancak tomurcuklanma bakımından her iki tip arasında, bir fark görülmektedir.



Şekil: 3 Alt fermantasyon tipi maya (Saccharomyces carlsbergensis). X 680

Şekil: 4 Üst fermantasyon tipi maya (Saccharomyces cerevisiae). X 680

Alt fermantasyon tipi maya hücreleri çoğalma ve fermantasyon sırasında sıvı içinde tek veya ikili olarak bulundukları halde, üst fermantasyon tipi maya dallanmış bir tomurcuklanma gösterir. Ancak fermantasyon sırasında sıvı içinde ortaya çıkan hareket sonucu bu tomurcuklanma topluluğu parçalanarak hücreler serbest hale geçerler.

Alt ve üst fermantasyon maya tipleri arasında görülen farklardan bir diğeri de fermantasyonun görünüşüdür. Gerçekten de üst fermantasyon mayası fermantasyon sırasında daha çok sıvı üst kısımlarında bulunduğundan sıvı yüzeyinde yağımsı bir tabaka ve kabın cidarında bir halka oluşur. Diğer maya tipi ise, kabın dibine oturur ve sıkı bir tortu yapar. Buna karşılık üst fermantasyon maya tipinin bir kısmı dibe oturmakla beraber oluşan tortu gevşektir.

Bu her iki tip maya arasındaki fizyolojik yönde mevcut olan farklılıklara gelince, hiç kuşkusuz bunların başında melibiyozun assimilasyonu gelir. Gerçekten de α-galaktozidaz (= melibiyaz) içeren alt fermantasyon tipi maya melibiyoz şekerini de assimile edebildiğinden raffinozun tamamını yıkıma uğratır.

Alt ve üst fermantasyon mayaları arasında başka bir enzim bakımından da fark olduğu son zamanlarda bulunmuştur. Buna göre alt fermantasyon mayaları hemen istisnasız pektinaz oluşturdukları halde, üst fermantasyon mayaları enzim deneylerinde daha çok negatif bulunmuşlardır. Mayaların bu özelliğinden yararlanarak bir işletme mayasında alt ve üst fermantasyon mayaları basit olarak ayırt etmek için "Pektinaz Deneyi" adıyla bir yöntem geliştirilmiştir. Aşağıda işlemi verilecek olan bu yöntemin pratikte uygulanabilirliği yüksektir. Bunu, fermantasyon durumunu esas alan "Hansen Deneyi" ile karşılaştırmak suretiyle daha iyi anlıyabiliriz.

Alt fermantasyon tipi maya işletmede uzun süre kullanıldığında sporlanma kaabiliyetlerini giderek kaybeder. Aynı zamanda sporlanma süresi çoğunlukla 60–72 saat kadar sürer. Buna karşılık üst fermantasyon tipi mayanın sporlanma kaabiliyetleri hem yüksek hem de daha sıktır. Örneğin sporlanma için çoğunlukla 48 saat yeterlidir.

Bu her iki maya tipi arasında solunum faaliyetleri bakımından da fark vardır. Üst fermantasyon tipi maya enzimce daha zengindir, ve kısmen bu nedenle fermantasyon faaliyetleri daha kuvvetlidir. Alt fermantasyon tipi maya yalnız fermantasyon faaliyetinde bulunur. Buna karşılık üst fermantasyon tipi maya, diğerine göreceli olarak daha belirgin solunum faaliyeti gösterir. Fermantasyon sırasında sıvının üst katlarına çıktıklarından oksijeni daha kolaylıkla sağlar. Bu nedenlerle metabolizma faaliyetleri % 42 oranında daha fazladır. Elde olunan maya biyokitlesi alt fermantasyon tipi mayada aşılanan mayanın 3–4 katı iken, bunda 6 katıdır.

Alt ve üst fermantasyon maya tipleri arasında katalazın optimum pH değerleri ve sıcaklık dereceleri arasında da fark vardır. Örneğin pH ve sıcaklık aralıkları ilkinde 6.5–6.8 ve 15°C iken, sonuncusunda bunlar sırasıyla 6.2–6.4 ve 20°–24°C'dir. Bu da gösteriyorki, alt fermantasyon maya tipi düşük sıcaklık derecelerine daha az hassastır.

Üst fermantasyon maya tiplerinin sıvı içinde dağılması ve sıvının üst katmanlarında bulunmasının nedeni üzerinde değişik görüşler ileri sürülmektedir.

Bir defa bu tip mayaların tomurcuklanması çok dallı olduğundan oluşturdukları yüzey fermantasyon sırasında çıkan gazın tutulmasına ve dolayısıyla mayanın yukarıya doğru sürüklenmesine neden olur.

Bazı araştırıcılar ise bu olayı maya ile CO_2'in elektrik yükleri arasındaki ilişkiye bağlamaktadırlar. Buna karşılık başkaları alt fermantasyon tipi mayanın fermantasyonun sonuna doğru dibe oturmasını bu mayanın çok miktarda glikojen içermesine ve böylece daha yüksek bir özgül ağırlığa sahip olmasına atfetmektedirler.

MATERYAL:

–Pektinaz deneyi için:

1. Alt ve üst fermantasyon maya kültürleri
2. YEP-Agar (Pektinatjel–Besiyeri):

Glükoz	8 g
Bacto-Pepton (Difco)	8 g
Bacto-Mayaekstrakt (Difco)	4 g
Doymuş $CaCl_2$ çözeltisi	1 ml*
Bacto-Agar (Difco)	4 g

3. Pektinat çözeltisi

8 g düşük esterleşen pektin alınır ve az bir miktar etilalkolle ısıtılır. Üzerine 40 ml 0.2 M Na_2HPO_4 çözeltisi ve 100 ml dest. su ilâve edilir ve ısıtılarak eritilir. Üzerine 60 ml 0.1 M sitrat çözeltisi konduktan sonra vejetatif hücreler kaynatmayla öldürülür.

4. Petri kapları
5. Drigalsgi spatülü
6. Diğer malzeme

* 60 g $CaCl_2$ 100 ml dest. suda karıştırarak eritilir. Sıvı kısmı aktarılarak alınır.

-Hansen deneyi için:

1. Kizelgurla filtre edilmiş % 12 E'li malt şırası.

2. Protein çöktürmesi için 120°C'ye ısıtılmış ve bir stabilizatör olan «stabiquick» katıldıktan sonra 7°C 'ye soğutulmuş ve filtre edildikten sonra ilaç şişesinde 3 gün süreyle 28°C'de yetiştirilmiş 50 ml maya.

3. 160°C'de 2 saat süreyle kuru sterilize edilmiş ve çapı 5 cm olan ölçme silindiri.

4. Diğer malzeme.

İŞLEM:

— Pektinaz deneyi için:

1. YEP-Agar 200 ml dest. suda çözünüz, sterilize ediniz, yak. 50°C'ye soğutunuz ve bundan yak. 15 ml. Petri kaplarına dökünüz.

2. Kaynatılmış ve yak. 50°C'ye soğutulmuş 20 ml pektinatı içinde donmuş YEP-agarı bulunan Petri kabına dökünüz. Bir gece bekletilerek elastiki bir kalsiyum pektinat jel oluşturunuz.

3. Maya kültürünü yak. 10^3/ ml hücre içerecek şekilde seyreltiniz.

4. Maya kültüründen 1-2 damla jel platları üzerine koyarak Drigalsgi spatülü ile yayınız.

5. 28°C'de 2 gün süreyle inkübasyondan sonra pektinaz negatif kolonilerden pektinaz pozitifleri ayırt ediniz.

—Hansen deneyi için:

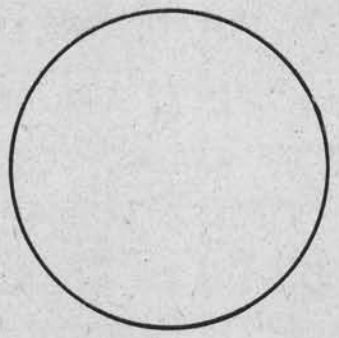
1. 50 ml maya kültürünün tamamını bir ölçme silindirine aktarınız.

2. Ölçme silindirini steril şırayla en az 30 cm bir yüksekliğe kadar doldurunuz ve 28°C'de inkübe ediniz.

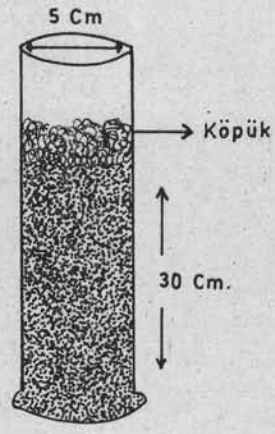
3. Üst fermantasyon mayalarının şıra üzerinde köpük oluşturduğuna dikkat ediniz.

SONUÇ

Pektinaz deneyi:
Streomikroskop
büyütmesi: ×



Hansen deneyi:



Not: _____

SORULAR:

1. Alt ve üst fermantasyon mayaları arasındaki morfolojik farklar nelerdir?

2. Alt ve üst fermantasyon mayaları arasındaki fizyolojik farklar nelerdir?

3. Alt ve üst fermantasyon mayalarının değişik süspansiyon durumlarını açıklayan teoriler nelerdir?

4. Pektinaz veya Hansen deneyi belli olmayan bir işletme mayası kullanilmamalıdır. Nedeni?

Tarih:

Kontrol eden
İmza

IX. UYGULAMA

Mayalarda Topaklanma Hızının Tayini

GENEL BİLGİ: Mayaların bazıları faaliyetleri sırasında sıvı içerisinde toz gibi dağılmışlardır. Bu gibi mayalar ancak uzun bir zaman geçtikten sonra dibe otururlar. Bu gibi mayalara "toz mayalar" denilir. Buna karşılık bazı mayalar da kısa bir zaman sonra sıvı içinde küçük, mikroskobik topakçıklar halinde birleşerek sıvı kısımdan ayrılırlar ve dipte sıkı bir tortu meydana getirirler ki, bu gibi mayalara da "topak mayalar" adı verilir. Bu olaya bilim dilinde "agglütinasyon", "sedimentasyon " veya "flokkülasyon" terimleri de kullanılmaktadır.

Mayalarda rastlanılan bu karakterler kalıtsaldır. Yapılan araştırmalarda bu özellik ile hücre duvarının bileşimi arasında bir ilişki bulunduğu anlaşılmıştır. Gerçekten de papain ile muamele edilen hücreler bu özelliklerini kaybetmişlerdir. Diğer yönden fermantasyon kaabiliyeti düşük olan mayalarda topaklanma erken meydana gelmektedir. Buna ilâve olarak mayşenin havalandırılma derecesinin de topaklanmanın erken meydana çıkışı üzerine etkisi olduğu anlaşılmıştır. Keza maya miktarı ile topaklanma arasında da bir ilişki vardır. Yani maya konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa topaklanma olayı kendini o kadar erken gösterir. Bunlara ilâve olarak yüksek sıcaklık da topaklanmayı teşvik eder.

Mayanın topaklanması pratikte birkaç bakımdan önemlidir. Bir defa fermantasyon sıvısı daha çabuk berraklaşır. Diğer yönden mayanın topaklanmaya başlaması fermantasyonun sona erdiğine bir işaret olarak kabul edilebilir. Buna ilâve olarak yavaş bir topaklanma fermantasyon derecesinin de yüksek olmasına yardım eder.

MATERYAL:

1. Çapı 38 mm olan 250 ml'lik bir ölçme silindiri.
2. Puffer çözeltisi (pH 4.5).

3. Toz ve topak maya kültürlerinden santrifüj edilmiş 20 g maya keki (13 g paket mayası).

4. Diğer malzeme.

İŞLEM:

1. Ölçme silindirine pufferle yapılmış maya süspansiyonundan 170 ml koyunuz.

2. Maya süspansiyonunun sütümsü ve ince zerrecikler halinde homojen olarak dağılmış olmasına dikkat ediniz.

3. Hemen oluşan ve aşağıya doğru yavaş bir iniş gösteren kenar çizgisinin 150 ml'den 90 ml'ye (54 mm) gelişine kadar geçen süreyi saptayınız.

4. Formülüne göre topaklanma hızını ölçünüz.

NOT: Süreyi ölçmeye başlamadan önce ve kenar çizgisinin 170 ml'den 150 ml'ye (18 mm) düşmesi sırasında süspansiyon içinde topaklar oluşur. Süspansiyondan katı fazın ayrılması sırasında turbulens görülmekle beraber, kenar çizgi belirgin bir şekilde izlenebilir. Topaklanma hızı 150 ml'nin altında hızla maksimuma ulaşır ve sonra azalır. Topaklanma hızı her bir °C'de yak. % 5 oranında artar. Bu nedenle sıcaklık sabit tutulmalıdır (20°C)

SORULAR:

1. Mayaların topaklanması üzerindeki etkenleri sayınız.

2. Mayaların topaklanmasının pratikteki faydaları nelerdir?

3. Deney mayasının topaklanma kaabiliyetini yukarıdaki verilere göre değerlendiriniz.

Tarih

Kontrol eden
İmza

X. UYGULAMA

Bir İşletme Mayasında Yabanî Mayaların Ayırt Edilmesi

GENEL BİLGİ: Bütün diğer fermantasyon endüstrisi kollarına göre biracılıkta daha yüksek oranda saf maya kullanılmaktadır. Bu bakımdan, aynı zamanda biranın doğası da dikkate alınarak, biracılıkta kullanılan işletme mayasının bakteriler gibi yabanî mayalarla bulaşık olması büyük önem taşır.

Yabanî mayaların biracılık işletme mayasına bulaşması biranın bozulmasına neden olur. Bu nedenle işletme mayasının bu yönden de zaman zaman kontrol edilmesi gerekir. Bu kontrolü yalnızca mikroskobik incelemelere dayandırarak şekil bakımından yabanî ve kültür mayalarını birbirinden ayırmak her zaman olası değildir.

Bir işletme mayasında bulunan yabanî mayanın tanınması için Hansen'in "sporlanma deneyi" bugün yerini daha pratik ve hassas, aynı zamanda zaman israfını da önleyen yöntemlere bırakmıştır. Son yıllarda bu alanda en yeni teknik olarak "immunoflorasans" kullanılmaktadır. Bu yöntem kullanılarak 5 antiserumla yapılan bir araştırmada işletme mayasındaki bulaşık suşlar % 92 oranında teşhis edilebilmiştir. Bu yöntem seroloji ve florasans mikroskopi tekniklerinin bir kombinasyonu olduğundan, seroloji tekniğinin bilinmesini gerektirir. Diğer yöntemler arasında *Saccharomyces*-cinsinin yabanî mayaları ile bu cinse ait olmayan diğerleri arasında bir ayırıma olanak sağlaması bakımından kristal viyole ve lisin agarı deneyi tercih edilir. Hatta kültür mayalarıyla yabanî mayalar arasında bir ayrım yapılması isteniyorsa, o takdirde her iki yöntemi kombine eden bir yöntemin kullanılması önerilmiştir.

MALZEME:

1. Kristal viyole besiyeri:

Malt şırası (% 11–12 E)	11
Kristal viyole	20 mg (20 mg 0.2 ml % 95'lik
Agar	1.5 g etilalkolde)

Not: Diğer maddelerin ilâvesinden önce malt şırası 121°C'de 10 dakika ısıtılır. Süzülür. Sterilizasyon arka arkaya 2 gün 15 dakika 100°C 'de yapılır.

2. Lisin agar:

Yeast Carbon Base (Difco)	2.35 g
A	
Dest. su	100 ml
Lisin (HCl)	0.46 g
Agar	4 g
B	
Dest. su	100 ml

NOT: A kısmı steril filtre edilir.

B kısmı 15 dakika 121°C'de sterilize edildikten sonra henüz sıcak haldeyken A kısmının üzerine aseptik koşullar altında ilâve edilir (1:1)

3. Şıra yatık agarında ve oda sıcaklığında geliştirilmiş 3–4 günlük maya kültürleri.

4. Bir gün önceden hazırlanmış ve 24 saat süreyle kapağı yukarıda olmak üzere 28°–37°C'de tutulmuş şıra, lisin ve kristal viyole agarları içeren 3 adet Petri kabı (Kristal viyole agar platının 4–5 mm' den daha az kalınlıkta olmamasına dikkat ediniz).

5. Drigalski spatülü

6. 0.1 ml taksimatlı steril pipetler

7. Diğer malzeme.

İŞLEM:

1. Yatık agar üzerinde geliştirilmiş maya kültürlerinden sür'atli bir çalışmada steril damıtık suyla veya fizyolojik suyla (% 0.85'lik NaCl çözeltisi) süspansiyon hazırlayınız (süspansiyonlar gözle görülebilecek kadar bulanık olmalıdır). Bu durumda süspansiyonun mililitresinde yak. 500 000 maya hücresi var demektir.

2. Lisin agar deneyinde süspansiyon hazırlarken besiyerinden bir bulaşma olmamasına özellikle dikkat ediniz.

3. Sıvı kültürlerinden süspansiyon hazırlıyorsanız, mayayı önceden steril koşullar altında esaslı bir şekilde yıkayınız.

4. Maya süspansiyonlarından agar platlar üzerine bir steril pipetle 0.1 ml maya süspansiyonu nakledíniz.

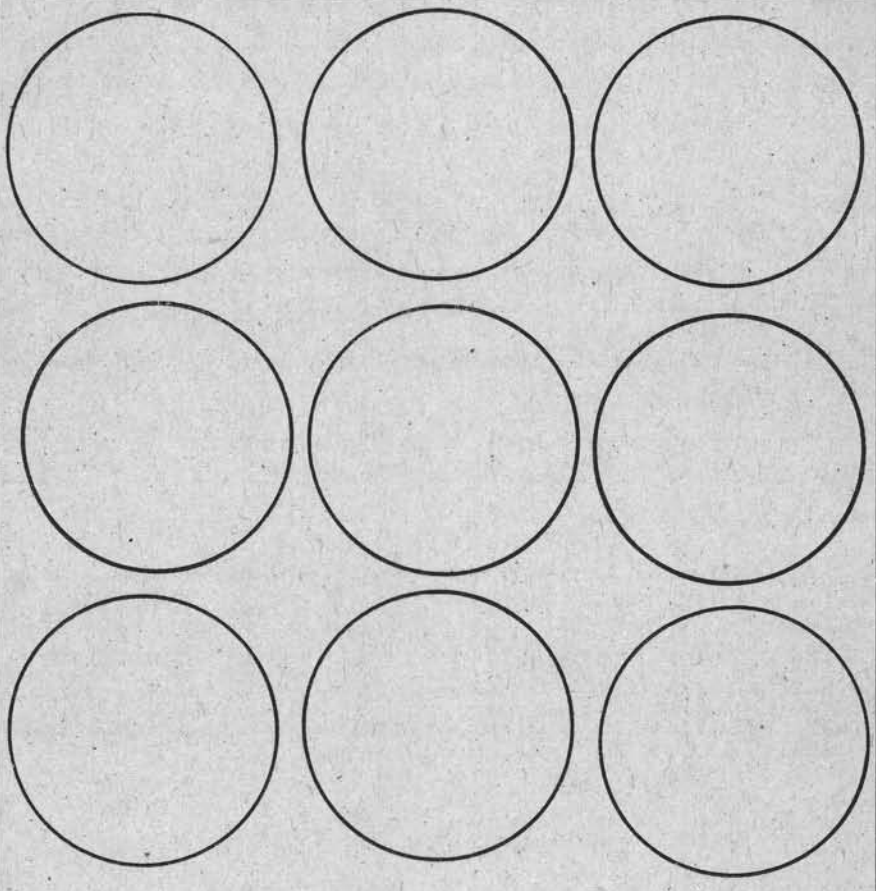
5. Maya süspansiyonunu steril bir Drigalski spatülü kullanarak plat üzerinde iyice yayınız.

6. Platları 48 (daha uzun süre değil) saat 28°–30°C'de bırakınız.

7. Maya suşlarının şıra agarındaki kuvvetli gelişmesini (+++) ile değerlendiriniz. Buna göre kristalviyole ve lisin agardaki gelişmeleri kuvvetli = +++; orta = ++; zayıf = +; gelişme yok = — işaretlerini kullanarak değerlendiriniz.

SONUÇ

Maya kültürleri	Gelişme		
	Şıra agar	Kristal viyole agar	Lisin agar
Saccharomyces cerevicsiae			
S. diastaticus			
Candida utilis			



Not:

SORULAR:

1. Bir işletme mayasına yabanî mayaların bulaşmış olmasının sakıncası nedir?

2. Bir işletme mayasında bulaşmış yabanî mayaların tayininde mikroskopik bir inceleme yeterli olabilir mi? Değilse, nedeni?

3. Sporlanma deneyi nedir? Bugün neden kullanılmıyor?

4. İmmunoflorasans deneyinin kullanılabilmesi için gerekli serolojik ve florasans teknikleri nedir?

5. Yalnız başlarına kristal viyole ve lisin agar deneyleri yabanî mayaların tayini için yeterlimidir? Değilse nedeni?

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XI. UYGULAMA

Bir İşletme ve Paket Mayasının Genel Görünüşü

GENEL BİLGİ: Bir işletme mayasının genel görünüşü hem morfolojik hem de mikroskobik gözlemlere dayanır.

Morfolojik gözlemden işletme mayasının kokusu, tortulanması, mayanın ve maya yıkama suyunun rengi anlaşılır. Bu gibi özelliklerin tayininde herhangi bir özel alete gereksinim yoktur. Gözlem yapmak için ağzı geniş cam kaplar içinde laboratuvara getirilmiş işletme mayası örneği mümkünse derhal incelenmelidir. Bu husus özellikle sıcak mevsimlerde bir zorunluktur.

Yıkanmış ve sağlıklı bir işletme mayasının rengi sarımsı beyaz olmalıdır. Gri veya donuk renkteki bir işletme mayası bozulmuş demektir. Yıkanmamış işletme mayası, fermantasyon ürününün rengine tâbi olarak az veya çok bir yabancı renge sahiptir. İncelenen maya örneği paket mayası ise o takdirde iki parmak arasında hafif bir basınçla sıkıldığı zaman parçalanabilmeli, luzucî olmamalıdır.

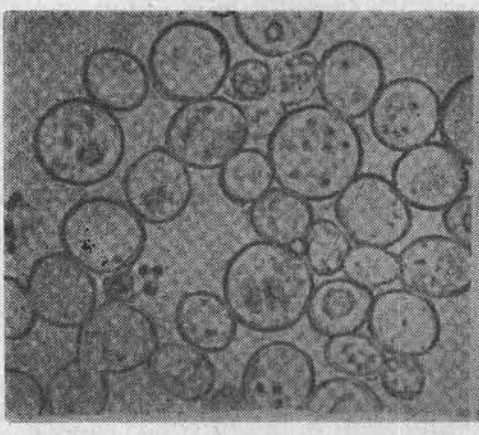
Sağlıklı bir mayanın kokusu da hoşa giden bir meyve kokusunu andırmalıdır.

Maya yıkama suyuna gelince, mayanın kullanıldığı amaca uygun bir renk gösterirse de, iyi yıkanmış bir mayadan renksiz bir yıkama suyunun çıkması gerekir.

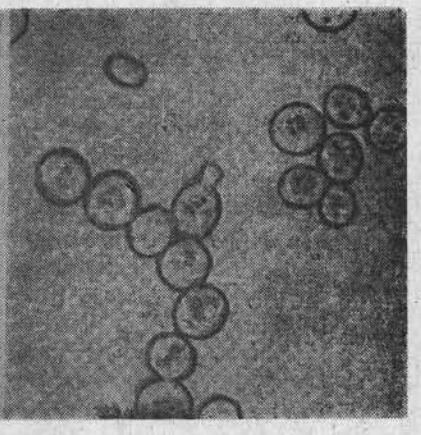
Mikroskobik gözlemlere gelince, mayanın temizlik derecesini saptamak ve ilerideki biyolojik çalışmalara bir ön hazırlık olmak üzere yapılır. Bu gözlemde hücrenin şekli, büyüklüğü, fizyolojik durumu, yabancı mikroorganizmaların adedi ve aynı zamanda diğer şeyler tayin edilmelidir.

Sağlıklı ve kuvvetli mayalar Şekil: 5'de de görüldüğü gibi, hemen hemen aynı büyüklüktedirler ve protoplazmaları içinde vakuol bulunmaz. Protoplazması tanelenmiş ve içinde küçük vakuoller bulunan hücreler ise zayıflamıştır (Şekil 6).

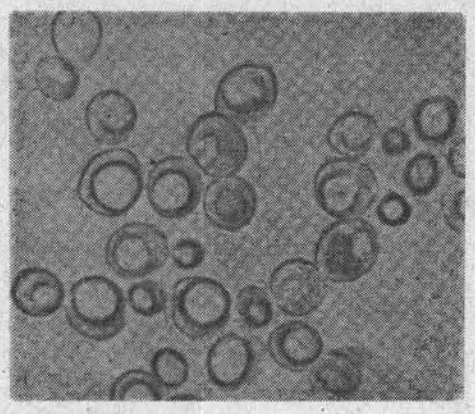
Yaşlı hücrelerde ise vakuoller belirgin olarak görülürler ve plazma kısmen hücre duvarından çekilmiştir. Keza içlerinde ışığı şiddetle kıran yağ danecikleri oluşmuştur (Şekil: 7). Bir işletme mayasında böyle hücrelerin oranı % 5'den yukarı olmamalıdır.



Şekil. 5: Fizoylojik durumu iyi olan maya hücreleri. X 700



Şekil. 6: Çok kullanılmış büyük danecikler içeren hücreler. Hücrelerin birkaçı ölmüş, plazma koagüle olmuş. X 800



Şekil. 7: Yaşlı ve çok zayıf maya hücreleri. Vakuoller belirgin, plazma büzülmeye başlamış. X 700

Mayanın fizyolojik durumu hakkında deneysel olarak bir fikir edinebilmek için mayanın canlılığının ve aynı zamanda glikojen ve volutin niteliğinin tayin edilmesi gerekir.

Mayanın canlılığı basit bir boyama ile tayin edilebilir. Bu amaçla aşağıda bileşimi verilen metilen mavisi çözeltisi kullanılır.

Metilen mavisinin bileşimi

Çözelti I

Metilen mavisi	0.02 g
Damıtık şu	50 ml

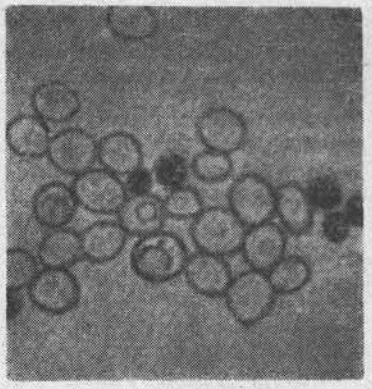
Çözelti II

$Na_2HPO_4.12\ H_2O$	0.018 g
KH_2PO_4	2.7 g
Damıtık su	50 ml
pH	4.6

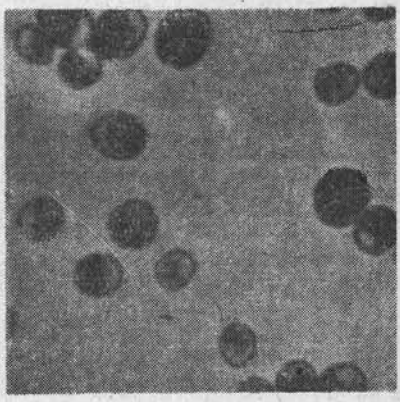
Yukarıda bileşimleri verilen her iki çözelti ayrı ayrı hazırlandıktan sonra 1:1 oranında olmak üzere karıştırılır ve renkli bir şişede saklanır. Ancak stoplazmanın boyayı kabul etmesi ortamın pH değeri ve ozmatik basıncıyla ilgilidir. Örneğin ortamın pH değeri 2 olduğu zaman hücrelerin hiçbirisi boyanamaz. Buna karşılık kalevi bir ortamda ise, hücrelerin büyük kısmı boyanabilir. Ozmotik basınç da bir ölçüde boyanmayı etkiler. Bu bakımdan en iyisi boyama belli bir pH değerinde ve aynı zamanda puffer (primer ve sekunder fosfatlar) kullanılarak yapılmalıdır. Diğer yönden metilen mavisinin konsantrasyonu da boyama da önem kazadır. Örneğin metilen mavisinin konsantrasyonu % 0.01'den daha kuvvetli olursa, metilen mavisi hücre üzerine toksik etki yapar. Yapılan bir araştırma da % 0.1'lik bir çözeltiyle 3 katı daha fazla hücre boyanmıştır. Genellikle kullanılan % 0.01 konsantrasyonundaki boya dahi, hücreler uzun bir zaman boyayla temas halinde kaldıkları takdirde, toksik etki ortaya çıkabilir. Bu nedenle preparat bekletilmeden incelenmelidir. Mikroskop altında görülen koyu mavi renge boyanmış hücreler ölü, açık mavi renge boyanmış olanlar ise, zayıf hücreler olup, çoğalma ve fermantasyon yapabilme kaabiliyetindedirler. Hücrelerin metilen mavisiyle farklı boyanmalarının nedeni oksidoredüktazlar ile ilgilidir. Bilindiği gibi metilen mavisinin indirgenmiş şekli renksizdir. Bu nedenle ölü hücrelerde inaktifleşen bu enzim metilen mavisini indirgeyemez (Şekil: 8).

Ölü hücre oranını saptamak için en az 15 mikroskop alanındaki toplam hücre miktarına ölü hücre miktarı oranlanır. Ancak hücre süspansiyonunun her bir mikroskop alanına 200 adet hücre isabet edecek şekilde seyreltilmesi gerekir. Normal olarak bir işletme mayasında % 5'den fazla ölü hücre bulunmamalıdır.

Mayanın fizyolojik durumu hakkında bize bir fikir verecek diğer bir işlem glikojen tayinidir. Ancak kuvvetli ve sağlıklı hücreler gliko-



Şekil. 8: Ölü hücreler metilen mavisiyle boyanmış. Canlı hücreler renksiz. Zayıf hücreler hafif maviye boyanmış ve normal hücrelerden belirgin ve koyu bir hücre duvarıyla ayrılmış.



Şekil. 9: Lugol çözeltisiyle hücrelerin boyanması (Koyu renkli hücreler glikojen içeriyorlar. Buna karşılık sarı renkte olanlar glikojen içermiyorlar).

jen içerirler. Mayada bulunan glikojen miktarı mayanın yetiştiği ortamla büyük ölçüde ilgilidir. Örneğin maya uzun süre (3–5 gün) su içerisinde bırakılırsa, glikojen tamamiyle kaybolur. Çünkü bu süre içerisinde besin maddesi bulamayan maya kendisinin depo maddesi olan glikojeni sarfetmiş olur. Fermantasyonun geç ve zor başlaması çoğunlukla hücredeki glikojenin azlığından ileri gelir.

Glikojenin niteliği hücrenin fizyolojik durumundan başka, mayanın yıkanıp yıkanmadığını, saklama süresini, yetiştirme sıcaklığını ve diğer bazı parametreler üzerinde bir fikir edinmemize de hizmet eder. Normal olarak fermantasyonu bitirmiş bir maya % 70'i iyotla esmer kırmızı bir renk almalıdır. Glikojen içermeyen hücreler ise, proteinin iyotla verdiği sarı renkte görülürler (Şekil: 9). Değerlendirme metilen mavisiyle yapılan boyamadaki gibi yapılır.

Bu boyamada adı geçen iyot çözeltisinin bileşimi aşağıda verilmiştir:

İyot çözeltisi (Lugol çözeltisi)

İyot	1 g
Potasyum iyodür	3 g
Damıtık su	60 ml

Bu çözelti hazırlanırken önce iyotla potasyum iyodür bir tartı kabında 10 ml suyla iyice ezildikten sonra üzerine 50 ml su ilâve edilir. Sonra renkli bir şişede saklanır.

Son olarak mayanın fizyolojik durumu hakkında bir fikir veren mayanın "Volutin" niteliği üzerinde duralım.

Volutin birçoklarına göre, mayanın fermantasyon kaabiliyeti ve aynı zamanda gelişme durumu hakkında bir fikir edinmeye yarar. Besiyerinde fosforlu bileşikler bulunmadığı takdirde, hücrede volutin oluşmaz. Buna ilâve olarak hücrenin volutin içeriği hücrenin yaşını ve dejenere olup olmadığını da gösterir. Volutin maddesi metilen mavisi, kongo kırmızısı ve toluidin mavisi gibi, çeşitli boyalarla boyanabilir. Bu amaçla kullanılan bir boyanın bileşimi aşağıda verilmiştir:

Volutin boyaması için kullanılan metilen mavisi çözeltisi

Metilen mavisi	1 g
Alkol (% 25'lik)	100 ml

Bu boyayla yapılan bir preparatta hücre içerisindeki volutin danecikleri koyu mavi renge boyandıkları halde, hücrenin geri kalan kısmı boyanmadan kalır.

MATERYAL:

1. Mikroskop
2. Lam ve lamel
3. Metilen mavisi (% 0.01 ve % 1'lik) ve lugol çözeltileri
4. Genç, fermantasyonu bitirmiş ve ölü maya içeren bir kültür
5. Diğer malzeme

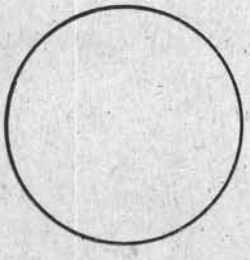
İŞLEM:

1. Temiz bir lam üzerine metilen mavisi çözeltisinden bir damla koyunuz.
2. Kültürden bir aşı iğnesi gözü naklediniz ve karıştırınız.
3. Üzerine lamel kapatınız.
4. Hazırlanan preparatı en fazla 600 büyütmeyle mikroskop altında inceleyiniz.
5. Mikroorganizmaların şekillerini boş daireler içine çiziniz.

SONUÇ

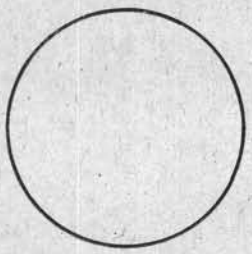
Mikroskop büyütmesi: ×

% 0.01'lik metilen mavisi



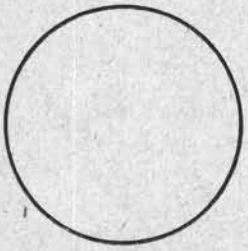
Lügol çözeltisi

S. cerevisiae



S. cerevisiae

% 1'lik metilen mavisi



S. cerevisiae

Not: _____

SORULAR:

1. Metilen mavisi ile hücrenin boyanması üzerinde etken olan faktörler nelerdir?

2. Koyu ve açık mavi, renksiz hücreler ne anlam taşırlar?

3. % 0.01 metilen mavisiyle yapılan boyama deneyinin sonucu nasıl değerlendirilir? Değerlendiriniz.

4. Lügol boyamasından elde ettiğiniz bulguları değerlendiriniz.

5. Volutin boyamasından elde ettiğiniz bulguları değerlendiriniz.

6. Hücrelerin metilen mavisiyle boyanmalarının nedenini açıklayınız.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XII. UYGULAMA

Bir İşletme Mayasının Biyolojik İncelenmesi

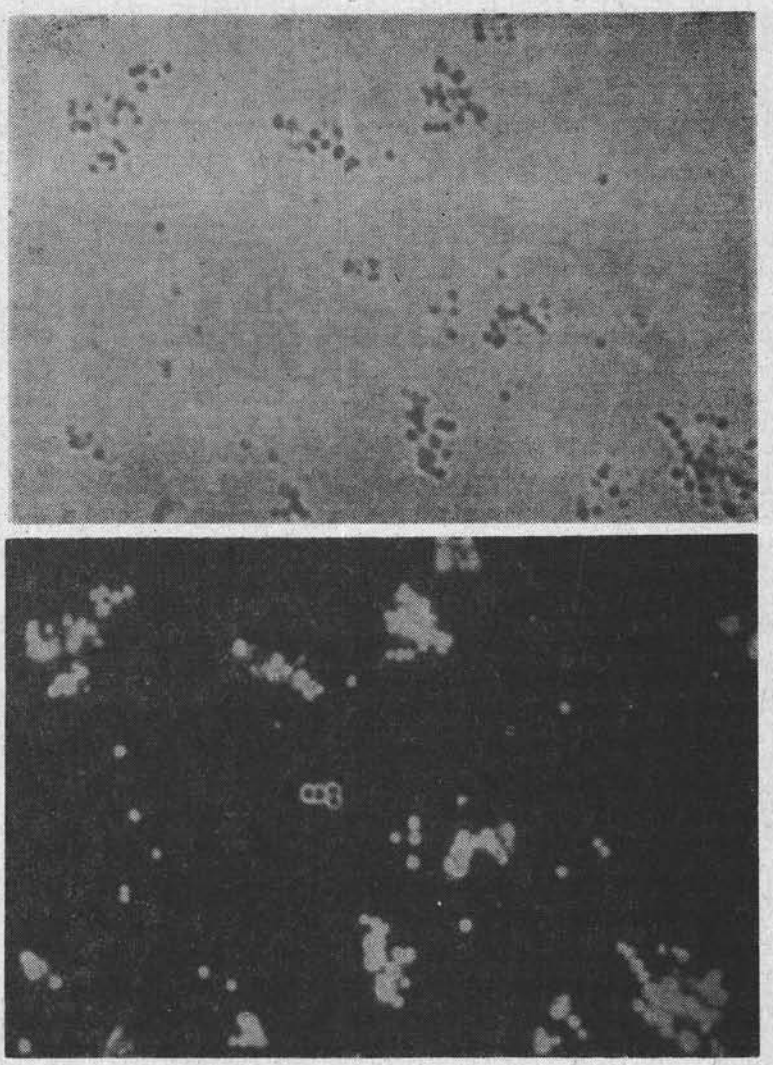
GENEL BİLGİ: Bir işletme mayasının genel görünüşüne ait incelemenin tam olabilmesi için mikroskop altında bakteriyolojik yönden de incelemenin sürdürülmesi gerekir. Buna işletme mayasının "Biyolojik Analizi" veya "Biyolojik Kontrolu"da diyebiliriz. Böylece fermantasyon ürününü bozabilecek olan bakteriler tayin edilmiş olur. Bunlar değişik cins ve çeşitler veya belli başlı gruplar halinde tanımlanmışlardır. Laktik, asetik, bütirik, pediyokok, coliform, proteolitik v.b. bakteri grupları gibi.

Bir işletme mayasının mikroskop altında bakteriyolojik yönden incelenmesine geçmeden önce bazı esasları bilmemiz gerekir.

Doğrudan mikroskobik bir inceleme, maya tortusu dışında ender olarak yeterli bir bilgi edinmemize yardımcı olur. Çünkü içerisinde ml'de 10^4 hücre içeren bir örnekten yapılan bir preparatı 500 büyütmeyle inceleyecek olursak, her mikroskop alanında ancak 3–4 maya hücresi görebiliriz. Böyle bir durumda bakteri bulaşmasının mayanın % l'ini oluşturduğu (tehlikeli bir bulaşma sınırı) varsayılsa, o takdirde bakteri bulaşmasını mikroskopla tayin etmek olası değildir. Maya hücresi sayısının 10^4'e çıktığını varsaysak dahi, % 1 bakteri bulaşmasını tayin etmek zor olacaktır. Çünkü her üç veya dört mikroskop alanının birinde ancak bir bakteri görülebilecektir. % 0.1 bakteri bulaşmasının tayini ise, mikroskobik yöntemle olanaksızdır. Buna örnekte bulunan yabancı maddelerin miksroskop alanının iyi incelenmesini zorlaştırdığını da ilâve etmeliyiz. Bu nedenle seyreltik örneklerin incelenmesinde devreye bir "zenginleştirme" yöntemi sokulmalıdır veya doğrudan "membran filtre" yöntemi kullanılmalıdır. Bütün bunlara rağmen, bir işletme mayasının doğrudan incelenmesi bize değerli ip uçları verebilir.

Şekil 10: Kaleviyle hazırlanmış bir preparatın görünüşü. Preparatın sağ tarafında kalevinin yayıldığı kısımda protein danecik veya kümeleri çözünmüş. Maya hücresi yalnız başına kalmış.

Bir işletme mayası mikroskobik inceleme sırasında araştırıcıyı yanıltabilen bazı maddeler içerir. Bunlar çoğunlukla protein yapısında bulanıklık maddeleridir. Çoğu kez bu maddelerden büyük ve kaba kümecikler halinde olanları kolaylıkla ayırt edilebilirlerse de bazan bakteri büyüklüğünde küresel danecikler halinde maya içerisinde kitle halinde bulunan kok benzeri oluşmaları kok şeklindeki bakterilerden ayırt etmek olanaklı değildir. Bunlar tanenli protein bileşiklerini oluşturan glüten danecikleridir. Bu gibi hallerde preparatın hazırlanmasında protein daneciklerini ortamdan uzaklaştırmak için potasyum veya sodyum hidroksit ve asetikasit çözeltilerinden yararlanılır. Sırasıyla % 5 ve % 50 konsantrasyonlarda kullanılan bu maddeler protein daneciklerini ve içerisinde bakterileri de saklayan maya çamurunu eritirler (Şekil: 10). Bu maddeleri kullanarak doğrudan preparat hazırlanabilirse de, en iyisi işletme mayasından alınan küçük bir örnek saat camı üzerinde bu maddelerle birkaç dakika temas halinde bırakılır. Böylece proteinin çözünmesi daha olasıdır. Bütün bunlara karşın, çözünmemiş protein danecikleriyle karşılaşılması ender olaylardan değildir. Bu nedenle incelemede karanlık alanlı mikroskobun kullanılması tavsiye edilmiştir Buna göre aydınlık alanda protein ve organizma birbirine çok benzediği, karanlık alanda ise organizmalar çoğunlukla cam gibi ışığı geçirgen oldukları ve örneğin koklar bir ışık halkası gibi göründükleri halde, protein danecikleri daha çok homojen, içi dolu, ışığı kuvvetle kıran oluşum görünümündedirler (Şekil: 11).



Şekil 11: Karanlık alanlı mikroskopda organizma ve kok benzeri oluşumların görünüşü. Ortadaki ışığı geçirgen halkalar bira sarsinalarına ve içi dolu, ışığı kuvvetle kıran diğer halkalar ise protein kümeciklerine aittir.

Bir işletme mayasında yapılan bakteriyolojik inceleme sonucunun değerlendirilmesi bir esasa göre yapılmalıdır. Bu amaç için aşağıda verilen ve 50 mikroskop alanında sayılan yabancı mikroorganizma sayımına dayalı bir sınıflandırmadan yararlanılabilir. Ancak pratikte bu miktarda sayım yapmak oldukça zordur.

Yabancı mikroorganizma sayısı	Enfeksiyonun derecesi
1	İz
3	Çok az
6	Az
8	Zayıf (Orta)
> 8	Kuvvetli

Yukarıda verilen değerlendirmeye göre ayrı mikroorganizmalar için müsaade edilebilir enfeksiyon dereceleri ise şöyledir:

Mikroorganizma	Enfeksiyon derecesi
Yabanî maya	Çok az
Bakteriler (Çomak, Laktik asit bakterileri, Pediyokoklar)	Az
Zararsız mikroorganizmalar (Koklar ve Torula)	Orta

Bu esaslara göre bir işletme mayası her kullanımdan önce iyice kontrol edilerek ölü hücre sayısı gibi enfeksiyon derecesi tayin edilmelidir.

MATERYAL:

1. Mikroskop (aydınlık ve karanlık alanlı)
2. Bir işletme mayası örneği
3. % 5'lik NaOH çözeltisi
4. Temiz saat camı
5. Aşı iğnesi gözü
6. Diğer malzeme

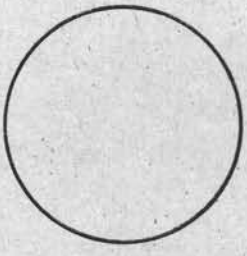
İŞLEM:

1. Bir bira fabrikasından steril bir ilâç şişesine yak. 10 ml örnek alınız ve ağzı formalinle sterilize edilmiş kapakla kapatınız. Örnek maya lapasından alınacaksa, ağzı geniş hermetik kapaklı bir kavanoza yarıya kadar doldurunuz. Uzak mesafelere gidecekse, buz parçalarıyla karıştırılmış talaş içine koyunuz. Laboratuvarda buz dolabında saklayınız.

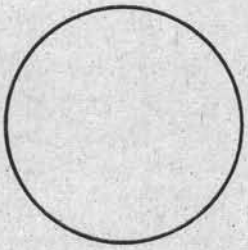
2. Maya lapasından bir preparat hazırlamadan önce her bir mikroskop alanında ortalama 100 hücre bulunacak şekilde bir seyreltme yapınız.

3. 10 mikroskop alanını inceleyeniz ve bakteri hücrelerini sayınız. Bulduğunuz rakamı seyreltme oranıyla çarpınız.

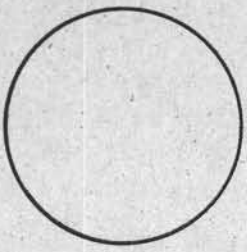
SONUÇ



Aydınlık alanlı mikroskopta görünüş (×)



Karanlık alanlı mikroskopta görünüş (×)



Aydınlık alanlı mikroskopta görünüş (Kaleviyle muamele edilmiş) (×)

Bakteri cinsi	Bakteri Sayımı	
	Ortalama	Enf. derecesi
Çomak		
Kok		

Not: _____

SORULAR:

1. Bir işletme mayasının çoğu kez doğrudan mikroskop altında bakteriyolojik incelenmesinin yapılmamasının nedenlerini söyleyiniz.

2. Böyle durumlarda ne yapılmalıdır?

3. Kok benzeri oluşumlar nedir ve nasıl bertaraf edilebilir?

4. Kok benzeri oluşları hangi mikroskop çeşidiyle kolay tanımlayabiliriz? Neden.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XIII. UYGULAMA

İşletme Mayası Dışındaki Materyalin Biyolojik İncelenmesi

GENEL BİLGİ: Bir işletmenin biyolojik kontrolu kapsamına işletme mayası dışında kalan materyal de girer. Bunlar başlıca fermantasyon ve dinlendirme kapları, aletler ve makinalar, boru ve hortumlar, kaplar ve şişeler, işletme suyu ve havası v.b. gibi işletmenin hijyenik koşullarını dolaylı olarak etkileyen materyaldir. Bütün bu materyalin biyolojik kontrolu çoğu kez işlem olarak birbirine benzer. Bu işlemleri 3 grup altında toplayabiliriz:

1. Örnek alma
2. Bakteri sayımı
3. Coli-form grubu bakterilerin tayini

Bunlardan ilk iki işlem için kullanılan yöntemler büyük ölçüde birbirlerine benzerler. Üçüncü işlem için koliform bakterisi olup olmadığını ortaya çıkaran "Coli-titer" deneyi ile koliform bakterileri içinde fekal koliform olanlarının bulunup bulunmadığını saptamak için "Pozitif İhtimal", "Pozitif Pekiştirme" ve "Tamamlama" deneylerinin yapılması gerekir.

1. Örnek alma: Biyolojik kontrolun ilk aşamasını "Örnek alma" oluşturur. Yukarıda başlıcalarının adlarını verdiğimiz materyalin son yıkama suyundan veya işletme ve temizlik sularından, örneği alanın ellerinden veya üstünden bir bulaşma olmayacak şekilde alınan örnekler, cam kapaklı steril şişelere alınırlar. Örnek şişeleri sterilize edilmeden önce dengeli bir iç ve dış basınç sağlamak amasıyla içerilerine bir miktar damıtık su konmalı ve alınacak su örneği bir musluk veya benzeri şeylerden alınıyorsa, o takdirde örnek almadan önce su 10 dakika süreyle akıtılmalıdır.

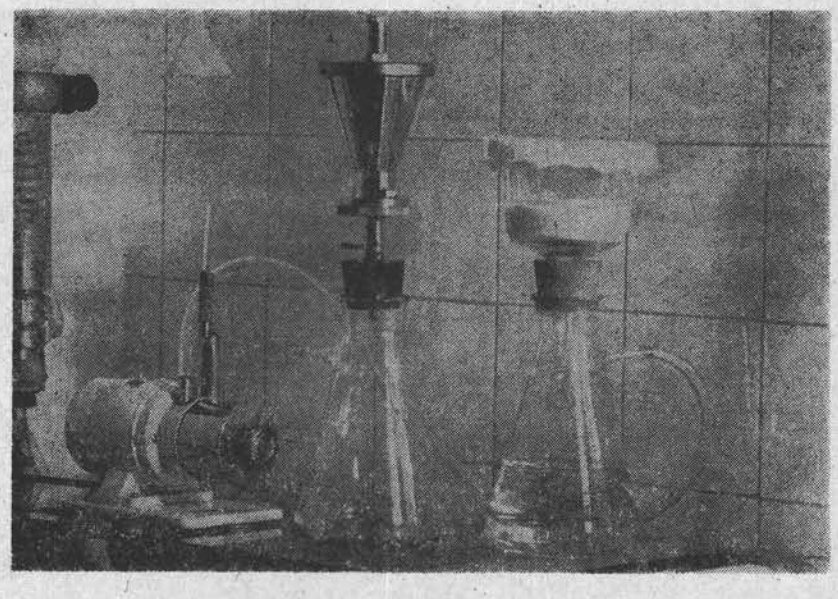
Bu genel çerçevenin dışında alete veya materyale göre biyolojik kontrol şekillerinde değişiklikler olabilir. Örneğin bir yıkama aletinin biyolojik kontrolunda, başka deyimle temizleme etkinliğini tayin etmek için temizlenmiş şişe içerisine 10 ml jelatinli bir besiyeri konarak yaymak veya 100 ml steril su konarak çalkalamak yapılacak ilk işlemlerdendir.

Alınan örnekler uzak mesafelere gönderilecekse, içerisine buz parçaları konulmuş hızar talaşı içinde olmak üzere paketlenmelidir. Ayrıca yolda geçecek sürenin 12 saati geçmemesi gerekir. Çünkü böylece sıcaklık 10°C'nin altında seyredeceğinden bakteri florasında hiçbir değişme olmayacaktır. Ondan sonraki süre içinde bir miktar artış beklenmelidir. Ancak 12 saatten sonra bu artış kuvvetli olur. En iyisi bütün bu süre içinde sıcaklığı 4°C'de sabit tutmaktır.

2. Bakteri sayımı: Bir işletmenin çeşitli yerlerinden ve materyalinden alınan örnekler laboratuvara getirildikten sonra bakteri sayımına geçilir. Bunun için doğrudan "Mikroskobik", "Plat kültür" ve "Membran filtre" sayımı yöntemleri kullanılır. Bu üç sayım yönteminden membran filtre tekniği en yenisi ve steril suyla yıkanarak alınan örneklerdeki mikroorganizmaların saptanması çalışmaları için en uygunudur. Bu yöntem, diğer yöntemlerde yıkama suyunun ancak birkaç santimetre küpünün incelenmesine karşılık, göreceli olarak daha fazla miktarda yıkama suyunun incelenmesine olanak verir. Aynı zamanda az sayıda mikroorganizma içeren yıkama suyu örnekleri için çok kullanışlıdır (Şekil: 12).

Membran filtre belli bir hacim örneğin belli bir yüzey alanı olan bir filtreden geçirilmesi ve bu sırada filtre tarafından tutulan "doğrudan bakteri hücresi sayımı"na veya filtrenin uygun bir besiyeri üzerinde inkübe edilmesiyle "Çoğalabilme Yeteneğinde olan Bakterilerin Sayımı"na olanak verir.

Bu yöntemle doğrudan bakteri sayımı "Thoma lamı" ve "Breed Yöntemi" ile sayım gibi, homojen bir dağılım ve belli bir hücre konsantrasyonunu gerektirir. Filtreden geçirilecek örnek miktarını hücre sayısı ve filtrenin büyüklüğü tayin eder. Buna göre hücre konsantrasyonu beher mm^2 başına 1000–3000 hücre olmalıdır. Örneğin membran filtreden geçirilmesinden sonra filtrenin kenarları steril suyla iyice yıkanır. Çok seyreltik olması halinde membran filtreden geçirilecek örnek miktarı daha fazla olmalıdır.



Şekil 12. Mayanın ayrılması için ön filtrasyonlu bir membran filitre

Filtre plağı önceden 20 dakika süreyle kaynatılır. Örnek içerisinde fazla miktarda kaba yabancı maddeler varsa, bunlar aktarma ile alınır. Örneğin alınmasından sonra mikroorganizma sayısında herhangi bir değişikliği önlemek için "toplam hücre sayımı"nda örneğe % 1–2 oranında formaldehit veya % 0.5 oranında OsO_4 katılır. Filtrasyondan sonra membran filtre 50–60°C'de 20 dakika kurutma dolabında veya birkaç saat oda sıcaklığında tutulur. Sonra filtrenin renklendirme işine geçilir. Bunun için membran filtrenin musluğu kapatılır. Filtre plağı üzerine 1:10 seyreltik alkali metilen mavisi veya Giemsa çözeltisi damlatılır. Boya çözeltileri önceden filtre edilerek sayımı zorlaştırabilen renk parçacıkları uzaklaştırılır. 10–30 dakika sonra (obje ve boyamaya göre) musluk açılarak boya alınır. Filtre plağı destile suyla yıkandıktan sonra kurutulur. 5×10 mm büyüklüğünde parçacıklar halinde kesilir. İmmerziyon yağı veya gliserin kullanarak ışığı geçirgen yapılır. Bir lamel üzerine konarak 800 büyütme ile mikroskop altında incelenir. Sayımda bir oküler mikrometreden yararlanılır. Alan başına düşen ortalama hücre miktarından tüm filtre alanı ve sonra filtrat hacminden "toplam hücre sayısı" hesaplanır.

"Çoğalabilen hücre sayımı"na gelince, bu takdirde örnek çok seyreltilmelidir. 50 mm çapındaki bir filtre plağına 50–100 organizma-

dan daha fazla düşmemelidir. Örneğin filtre yüzeyinde iyi dağılması için en az 10–20 ml sıvının filtre edilmesi ve filtrenin kenarlarının steril pufferle veya sıvı besiyeriyle yıkanması gerekir. Filtrasyon aleti 120°C' de 10 dakika süreyle otoklavda veya metal kısımları alevden geçirerek yahut filtre plağını kaynatarak sterilize edilir. Filtrasyondan sonra bir pens yardımıyla filtre plağı alınır ve uygun bir besiyeri üzerine konulur. Gelişen kolonilerin sayım işi "sayım çizelgesi" yardımıyla kolaylaştırılır. Bu yöntemde doğal olarak yalnız seçilen besiyerinde gelişebilen bakteriler sayılmış olur.

3. Coli-form bakterilerin tayini (Coli-Titer): İçme suyunda bulunupta laktoz-pepton besiyerinde fermantasyon yapabilen koli-form bakterilerin türlerinin ayırt edilmesine gidildiği halde, bir fermantasyon işletmesi suyunda genellikle buna gerek yoktur. Ancak bir işletme suyunun beher 100 ml'sinde maksimum yak. 20 koliform bakteriden fazlası istenmez.

MATERYAL:

1. Örnek alma işlemi:
— Şişelerin biyolojik kontrolu için:
1.1. Temiz ve kirli bira şişeleri
1.2. % 10 jelatin veya % 3 agarlı malt şırası
1.3. Kağıda sarılı steril pamuk tıpalar
1.4. Diğer malzeme
— Bir işletme ve yıkama suyunun biyolojik kontrolu için:
1.1. Membranfiltre
1.2. Hermetik kapaklı steril örnek alma kapları
1.3. Pürmüz lambası
1.4. Diğer malzeme.
— Bir işletme havasının biyolojik kontrolu için:
1.1. Malt şırası agar platları
1.2. Diğer malzeme
2. Bakteri sayımı işlemi (Toplam bakteri sayımı):
2.1. İşletme ve yıkama suyu örnekleri
2.2. Membran filtre
2.3. Formaldehit
2.4. Alkali metilen mavisi çözeltisi
2.5. Gliserin
2.6. Oküler mikrometre
3. Coli-form grubu bakterilerin tayini (Coli-Titer):

3.1. İşletme ve yıkama suyu örnekleri
3.2. Seyreltme şişeleri
3.3. İçerisinde 10 ml laktoz - pepton besiyeri* bulunan tüpler
3.4. Durham tüpleri
3.5. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Örnek alma işlemi:

— Şişelerin biyolojik kontrolu için:

1.1. Temiz ve kirli 2 bira şişesi alınız.

1.2. Her bir şişeye 10 ml steril su koyunuz ve şişe cidarında bulunan organizmaların mümkünse tamamını alacak şekilde çalkalayınız.

1.3. Bu yıkama suyu örneğinde membran filtreyle bakteri tayini yapınız.

veya:

1.1. Temiz ve kirli iki şişe alınız

1.2. Şişelerin her birinin içerisine % 3 agar veya % 10 jelatin içeren 10–50 ml (şişenin büyüklüğüne göre) malt şırası koyunuz. Agarlı besiyerinin sıcaklığı 50–55°C arasında olmalıdır.

1.3. Ağzını alevden geçirdikten sonra steril pamuk tıpayla kapatınız.

1.4. Su banyosu içinde ve iki el arasında döndürerek besiyerinin şişenin bütün iç yüzeyinde muntazam olarak dağılmasına çalışınız. (Dönen şişe yöntemi). Bu sırada banyonun sıcaklığı jelatinli besiyeri için 21°C'yi geçmemelidir.

1.5. İnkübasyonu jelatinli besiyeri için oda sıcaklığında (20°C) 3–5 gün, agarlı besiyeri için 28°–32°C'de 3 gün süreyle yapınız. Koliform bakteriler için 37°–38°C'yi, termofil sporlu bakteriler için de 55°C'yi seçiniz.

1.6. Hücrelerden gelişen kolonileri sayarak değerlendirme yapınız.

---

* Laktoz–pepton besiyeri:

Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Laktoz	5 g
Dest. su	1000 ml
pH	6.7

— Bir işletme ve yıkama suyunun biyolojik kontrolu için:

1.1. İşletme ve yıkama suyunun alınacağı yeri pürmüz lambasının alevinden geçiriniz.

1.2. Sonra örnek alma kabının ağzını alevden geçiriniz.

1.3. Yeteri kadar örnek aldıktan sonra kabın ağzını sür'atle alevden geçirerek kapatınız.

1.4. Membran filtre yöntemiyle değerlendirme yapınız.

— Bir işletme havasının biyolojik kontrolu için:

1.1. Malt şırası agar platları şıra soğutma odasında 15 dakika, fermantasyon mahzeninde en az yarım saat kadar Petri kabının kapağı açık tutularak havaya arzediniz.

1.2. Platları 25°C'de 72 saat inkübe ediniz.

1.3. Plat üzerinde oluşan kolonileri sayarak belli bir süre içinde belli bir alana ne kadar hücre düştüğünü Schnegg denkleminden yararlanarak bulunuz.

NOT:

Schnegg denklemi:

1 saatlik süre içerisinde her cm^3' e düşen organizma $\frac{z \times 60 \times k}{d \times h \times f}$

f = Petri kabının yüzeyi, cm^2
d = Arzetme süresi, dakika
k = Şıranın soğutma veya fermantasyonun süresi, saat
h = Şıranın veya mayşenin yüksekliği, cm
z = Hücre sayısı, adet
100 hl için bulunan sayı 10^7 ile çarpılmalıdır.

2. Bakteri sayımı işlemi:

2.1. Yıkama suyu örneklerini (Bkz: Madde 1.3) membran filtreden geçiriniz.

2.2. Metin içinde açıklanan işlemi aynen uygulayınız.

2.3. Değerlendirmeyi toplam hücre sayımı yöntemiyle yapınız.

3. Coli-form grubu bakterilerin tayini:

3.1. İçinde laktoz-pepton besiyeri ile Durham tüpleri bulunan tüplere yıkama suyu örneklerinden 1 ml, 0.1 ml ve 0.01 ml naklediniz. Her seri için beşer tüp kullanınız.

3.2. 37°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakınız.

3.3. Bu sürenin sonunda gaz oluşup oluşmadığını kontrol ediniz

3.4. Gaz oluşmuşsa "En Olası Sayı" çizelgesinden yararlanarak koli form bakteri sayısını bulunuz.

SONUÇ		
Dönen şişe yöntemi		
Örnek	Organizma	Koloni (Hücre) sayımı/ml
Temiz şişe yıkama suyu	Maya	
	Küf mantarı	
	Bakteri	
Kirli şişe yıkama suyu	Maya	
	Küf mantarı	
	Bakteri	
Membran filtre yöntemi		
Örnek	Organizma	Hücre sayısı / ml
Temiz şişe yıkama suyu	Bakteri	
Kirli şişe yıkama suyu	Bakteri	

Not: _____

SONUÇ

Membran filtre yöntemi

Örnek	Organizma	Hücre sayısı / ml
İşletme suyu	Bakteri	
Yıkama suyu	Bakteri	

Not : _____

_____

_____

Malt şırası–plat yöntemi

Örnek	Organizma	Koloni sayısı / plat	Hücre sayısı / 100 hl
Şıra soğutma odası havası	Bakteri		
	Maya		
	Küf mantarı		
Fermantasyon mahzeni havası	Bakteri		
	Maya		
	Küf mantarı		

Not: _____

_____

_____

SONUÇ

Kod No:	Örnek	Seyreltme	Gaz	Koliform bakteri sayısı / ml
1	Temiz şişe yıkama suyu	Tanık		
		1 / 10		
		1 / 100		
		1 / 1000		
		1 / 10000		
2	Kirli şişe yıkama suyu	Tanık		
		1 / 10		
		1 / 100		
		1 / 1000		
		1 / 10000		

Koliform Deneyleri İçin "En Olası Sayı"(E.O.S.) Çizelgesi

1()			(2)	(1)			(2)	(1)			(2)	(1)			(2)	(1)			(2)	(1)			(2)
10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1		10	1.	0.1		10	1	0.1	
0	0	0	-	1	0	0	2	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	5	0	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	36	5	4	1	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	23	1	10
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	0	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250

SORULAR:

1. Örnek şişelere konulan agarlı besiyeri sıcaklığının 55°C'yi geçmemesinin nedenini söyleyiniz?

2. Coli - form grubu bakterilerin fermantasyon mamüllerinde bulunması neden temiz çalışılmadığına bir işaret olarak kabul edilmektedir?

3. Coli-Titer deneyinde laktozun kullanılmasının nedenini açıklayınız.

4. Membran filtrenin bakteri sayımında giderek yaygın kullanılmasının nedenlerini söyleyiniz.

5. Agar platların havaya arzında değişik sürelerin esas alınmasının nedenini söyleyiniz.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XIV. UYGULAMA

Biyokitlenin Bulanıklık Ölçme Yöntemi (Nefelometri) İle Tayini

GENEL BİLGİ: Bulanıklık ölçme biyokitle tayini için kullanışlı bir yöntemdir. Fakat yalnız homojen süspansiyonlar için kullanılabilir.

Suda süspansiyon halinde bulunan ve kırılma endeksleri onları çevreleyen ortamdan farklı olan parçacıklar bulanmaya neden olurlar. Bulanıklık su-parçacık sınır yüzeyine düşen ışınların yansımasına tâbidir. Bu nedenle örnekten geçen "ışık yoğunluğu" azalır. Buna göre bulanıklık ya belli bir açı dahilinde yansıyan ışık yoğunluğu yahut süspansiyon içindeki yansımayla ortaya çıkan ışık yoğunluğundaki azalma; yani optik yoğunluk (Optik yoğunluk = $2-\log_{10}$ % transmisyon) ile ölçülebilir. Birincisine "yansıma ölçme", ikincisine ise "bulanıklık ölçme" yöntemi denilir.

Yansıyan ışığın yoğunluğu parçacık sayısıyla doğru orantılıdır. Ancak bu durum parçacık sayısı dışındaki bütün faktörler sabit tutulduğu ve seyreltik süspansiyonlar kullanılırsa geçerlidir. Bilindiği gibi, gelişme halindeki bir bakteri süspansiyonunda parçacık sayısı dışında parçacık büyüklüğü ve onun kırılma endeksi de değişebilir. Buna ilâve olarak oluşan pigment nedeniyle bir absorpsiyon etkisinden söz etmek gerekir. Bundan dolayı her organizma, her kültür koşulu ve gelişme evresi için deneysel olarak bulunmuş bir standart eğrinin yapılması gerekir. Bakteriyoloji pratiğinde özellikle "bulanıklık ölçme" yöntemi daha basit yürütülmesi ve daha kullanışlı olması nedeniyle tercih edilir.

MATERYAL:

1. Fotometre (Yansıma ölçme için Zeiss-Photometer Elko II; bulanıklık ölçme için Eppendorf–Photometer)

2. Bir tüp fizyolojik suyla yıkanmış (% 0.9 NaCl çözeltisi) bakteri süspansiyonu

3. Diğer malzeme.

İŞLEM:

A. Aletin kullanılışı:

1. Fotometrede ışık dalga boyu (λ) = 660 nm ve küvet genişliği (d) = 0.5 cm seçiniz.

2. Bakteri süspansiyonundan fizyolojik su kullanarak optik yoğunlukları 0.05–0.5 arasında olacak şekilde tüplerde seri seyreltik süspansiyonlar hazırlayınız (Dikkat! Nefelometrik ölçme ile hücre sayısı arasındaki doğru orantı ancak bu optik yoğunluklar arasında vardır).

3. Her bir süspansiyonun optik yoğunluğunu ve Thoma–lamı kullanarak hücre sayısını, hücre kuru maddesini veya hücre proteinini tayin ediniz (Dikkat! Yetişme koşulları hücre proteininin çeşit ve miktarını etkileyeceğinden her protein fotometrik tayinde değişik değerler verir. Bu nedenle protein tayini ancak logaritmik evrede sabit koşullar altında biyokitle için orantılı bir ölçüdür. Hücre kuru maddesinin esas kısmını protein oluşturduğundan yukarıdaki yargı hücre kuru maddesi üzerinden biyokitle tayini için de geçerlidir).

4. Optik yoğunluk rakamları ordinat, hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı veya hücre proteini absis olmak üzere grafik çiziniz.

5. Elde olunan standart eğriyi ölçümü yapılacak bakteri süspansiyonları için kullanınız.

B. Hücre sayısının tayini: (Doğrudan hücre sayımı yöntemleri, (Bkz.: Pamir, 1967 ve Köşker, 1976):

C. Hücre kuru maddesi tayini:

1. Bakterileri destile suyla yıkayınız.

2. Süspansiyonu uygun bir kapta 80°C 'de vakuum veya 110°C' de normal basınç altında kurutunuz.

3. İçerisinde P_2O_5 bulunan eksikatöre koyunuz ve tartınız.

4. Bakteriler membran filtre üzerinde de tutularak yıkandıktan sonra kurutulabilirler.

D. Hücre proteini tayini (Biuret Yöntemi):

1. Logaritmik veya stasyoner evrede bulunan bakteri kültürünü santrifüj yapınız.

2. Optik yoğunluğunu fizyolojik suyla 0.7–0.8 arasında ayarlayınız (λ = 660 nm, d = 0.5 nm). Bu süspansiyonda ve 1:2–1:7 seyreltiklerinde optik yoğunluk tayin ediniz.

3. Her birinden 2 ml alarak bunlarda protein tayini yapınız.

4. Bu örnekleri 30 ml'lik mikro–Kjeldahl balonlarına koyduktan sonra üzerlerine 10 ml N/1 NaOH ilâve ediniz ve 10 dakika süreyle kaynayan su banyosunda tutunuz.

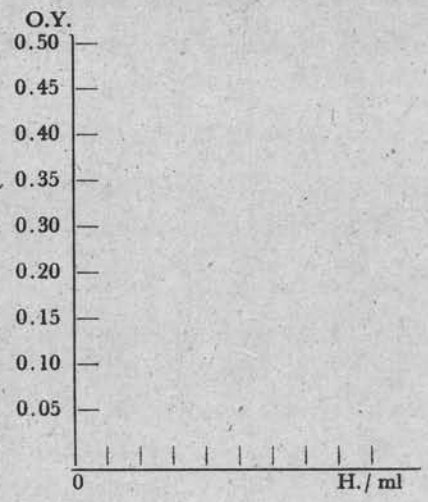
5. Oda sıcaklığına kadar soğuttuktan sonra üzerine 0.1 ml % 25'lik $CuSO_4.5\ H_2O$ çözeltisi ilâve ediniz ve hemen birkaç dakika kuvvetli çalkalayınız.

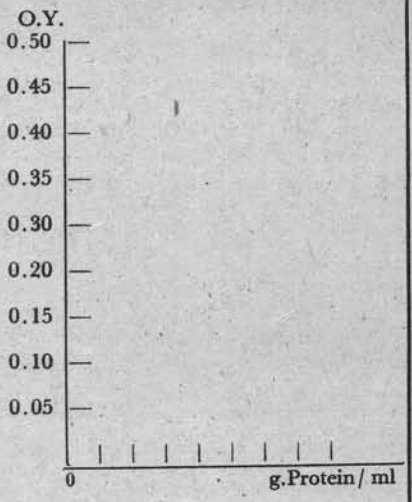
6. Santrifügasyondan (5000 g, 5 dak.) sonra sıvı kısmın optik yoğunluğunu proteinsiz tanığa karşı okuyunuz (Eppendorf–Photometer, Filtre 578, d = 1.0 cm).

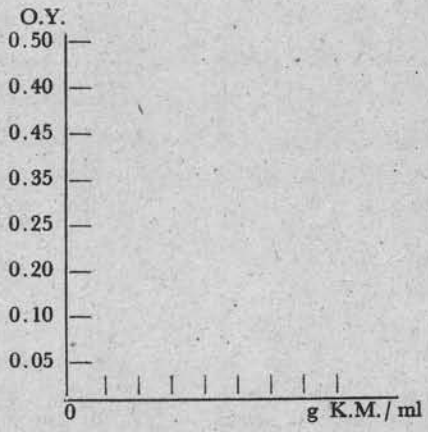
7. Standart eğriyi 1–10 mg albuminle yapınız. Koordinata süspansiyonun optik yoğunluğu (λ = 660 nm, d = 0.5) cm), absise ise protein değerinin (mg protein/ml) koyunuz.

SONUÇ

Standart Eğriler







Not: _____

SORULAR:

1. Optik yoğunluk hangi koşullarda hücre sayısıyla doğru orantılıdır?

2. Bir organizma kültürünün doğrudan optik yoğunluğunu tayin etmek doğru sonuç verir mi? Doğru değilse ne yapmak gerekir?

3. Bir organizmaya ait standart eğri her organizma için kullanılabilir mi? Kullanılamazsa nedenini ve çözümünü anlatınız.

4. Hücre proteini veya kurumaddesi üzerinden biyokitle tayininin hücre sayımına oranla daha az hassas oluşunun nedenini anlatınız.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XV. UYGULAMA

Biyokitle Gelişme ve Çoğalmasının Tayini

GENEL BİLGİ: Organizmalar bütün substrat isteklerinin karşılandığı bir besiyerine nakledildikleri ve uygun koşullar altında tutuldukları zaman kültürün beher hacim ve hücre başına protein, RNA ve DNA miktarlarında bir artışın ortaya çıkması organizmanın "gelişme"sini ifade eder. Çoğunlukla "gelişme"yi bir süre sonra hücre bölünmesi ve "çoğalma" izler.

"Gelişme" hacim başına biyokitledeki bir artış olarak ölçülür. Gelişme hızı (μ), bir zaman birimi içinde biyokitlenin katlanmasının sayısını ifade eder. Biyokitlenin katlanması için geçen zaman aralığına ise "katlanma süresi" denilir.

Organizmaların çoğalması hacim başına organizma sayısındaki artış olarak ölçülür. Bölünme hızı (n) hücre veya organizma sayısındaki katlanmanın sayısıdır. Hücre sayısının katlanması için geçen süre aralığına ise "jenerasyon süresi" (g) denilir. Besiyerinde çoğalma sürecinin başında ortamda bulunan bakteri sayısı (a), çoğalma süresinin (t) sonunda ortamda bulunan bakteri sayısı ise (b) ile gösterilir. Buna göre bir "kesik yöntem" (batch system)'de meydana gelen hücre sayısı "üs cinsinden çoğalma" safhasında $b = 2\,a^n$ ile bulunabilir.

Buradaki (n) denkleminden, $n = \dfrac{\log b - \log a}{\log 2}$, $n = \dfrac{t}{g}$ eşitliğinden faydalanılarak da "jenerasyon süresi "bulunur. $g = \dfrac{t \times \log 2}{\log b - \log a}$

Sürekli yöntem (continue system)'de ise çoğalma hızı ($\mu = \dfrac{dx}{dt}$),

yüksek besin maddesi konsantrasyonunda çoğalma hızı (μ_m), hücre sayısı ($\bar{x}$), ürün katsayısı (y), fermantördeki substrat konsantrasyonu (x_2), substrat-doymuşluk derecesi (k_2) ve substrat seyreltme oranı (D) gibi ögelerin ilişkilerinden çıkan denklemiyle bir fermantördeki hücre sayısı bulunabilmektedir. Bu çoğalma şekli yalnız üs cinsinden

$$\bar{x} = y(k_x - s_r \cdot \frac{D}{\mu_m - D}) .$$

çoğalma evresinde vardır. Ancak bunun için herşeyden önce kültür koşullarının ve ortamdaki substrat konsantrasyonunun uygun olması gerekir. Yani kültürdeki besiyeri devamlı olarak yenilenerek substrat konsantrasyonunun düşmesi; pH değerinin değişmesi, gelişmeyi önleyici maddelerin birikimi ve ortamda erimiş oksijen konsantrasyonunun kritik bir düzeyin altına düşmesi önlenmelidir. Aksi halde çoğalma eğrisi "duraklama" evresine geçmiş olur. Bu evrede artık bölünme durduğundan toplam hücre sayısında bir değişme olmaz veya ancak lize olan yaşlı hücrelerin sayısı kadar yeni hücre oluşur.

MALZEME:

1. Mikroskop
2. Fermantör
3. Thoma lamı
4. Maya *(Saccharomyces cerevisiae)* kültürü
5. Besiyeri (Üzüm şırası)
6. Steril Pasteur pipetleri
7. % 5 v/ v'lik formaldehit
8. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Kesik yöntem:

a) 48–72 saatlik bir maya kültüründen % 1 hesabıyla daha önce içerisine üzüm şırası konulduktan sonra sterilize edilmiş fermantöre aşılama yapınız.

b) Fermantasyonu 28°C'de yapınız.

c) Fermantasyon süresince her 10 dakikada bir miktar örnek alarak (Dikkat! Hücre sayımları hemen yapılmıyacaksa, örnekler ya buz banyosuna konulmalı yahut üzerine % 5 (v/v)'lik formaldehit ilâve ederek hücre çoğalması durdurulmalıdır) Thoma lamıyla toplam hücre sayımı yapınız.

d) Bulduğunuz rakamları ordinat ve süreyi de absis olarak alınız ve grafik çiziniz.

2. Sürekli yöntem:

a) ve b) maddeler için "kesik" yöntemdekinin aynı işlemleri uygulayınız.

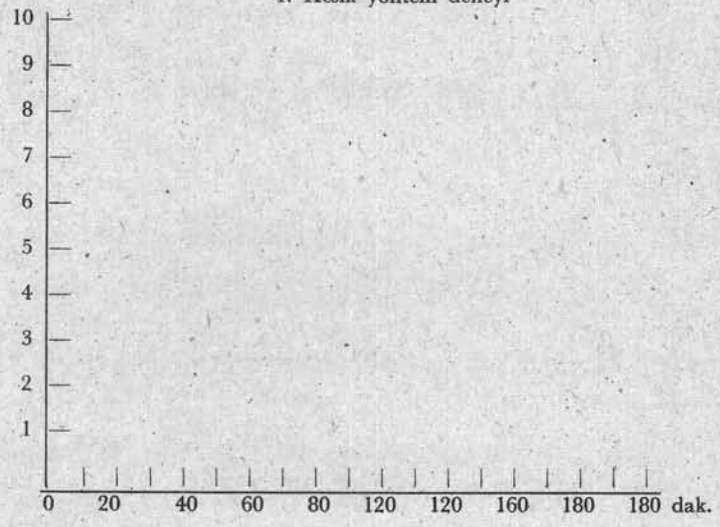
c) Fermantasyon süresince fermantöre alındığı kadar besiyeri ilâve ediniz. Bunu yaparken seyreltme oranını (D) ve fermantördeki substrat konsantrasyonunu (s_r) optimumda tutmaya çalışınız.

d) Fermantasyon süresince her saatte bir örnek alarak (Bkz.: Kesik yöntem) Thoma lamıyla toplam hücre sayımı yapınız.

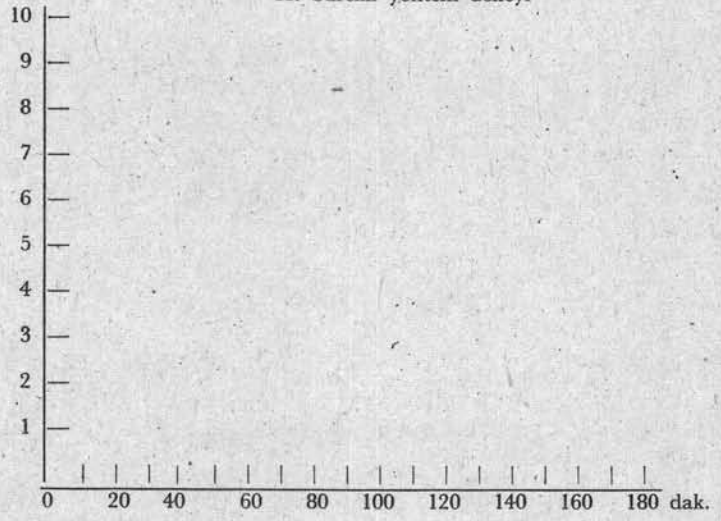
e) Bulduğunuz rakamları ordinat ve süreyi absis olarak alınız ve grafik çiziniz.

SONUÇ

I. Kesik yöntem deneyi



II. Sürekli yöntem deneyi



Not: _____

_____

_____

SORULAR:

1. Biyokitle gelişme ve çoğalmasını tanımlayınız.

2. Kesik yöntem deneyinden faydalanarak jenerasyon ve katlanma sürelerini hesaplayınız.

3. Sürekli yöntem deneyinden faydalanarak çoğalma hızı (μ), yüksek besin konsantrasyonunda çoğalma hızı (μ_m), hücre sayısı ($\bar{x}$), fermantördeki substrat konsantrasyonu (s_r), substrat doymuşluk derecesi (k_s) ve substrat seyreltme oranı (D)'nı veriniz.

4. Çoğalmanın üst cinsinden çoğalma evresinde tutulabilmesinin koşullarını veriniz.

Tarih:

Kontrol Eden
İmza

XVI. UYGULAMA

Misel Oluşturan Organizmalarda Biyokitle Gelişiminin Tayini

GENEL BİLGİ: Misel oluşturan organizmaların linear gelişmesinde de, diğerlerinin gelişmelerinde olduğu gibi, sıcaklık, pH ,besin maddesinin konsantrasyonu, engelleyici maddelerin çeşit ve miktarları etkilidir. Bu organizmalarda gelişme ile misel kuru ağırlığı arasında belli bir ilişki yoktur. Misel kuru ağırlığında çoğunlukla hafif eğilmiş (S) şeklinde bir artış görülür. Mantar besince fakir olan besiyerlerinde zengin olandan daha hızlı bir şekilde gelişir. Ancak misel örtüsü birincilerde ikincilere göreceli olarak daha incedir. Havaî misel ve konidi oluşması da substratla ilgili olarak değişir. Linear gelişmenin seyri herşeyden önce mantarın uç gelişmesiyle ilgilidir. Sitoplazma uç kısma nakledilir. Bölünme ve dallanmadan sonra geriye kalan hifler vakuolize ve hücre içeriği kısmen otolize olur. Ancak bir mantar kolonisinin hücrelerinin küçük bir kısmı daima gelişmeye ve bölünmeye istidatlıdır. Bir mantar kolonisinin yayılması ile besin, gelişme veya engelleyici maddelerinin konsantrasyonu arasında kantitatif bir ilişki bulunur. Bu ilişkiyi bir deneyle tayin etmek olanaklıdır. Bu deney bir tüpte yapılıyorsa misel gelişmesinin uzunluğu veya bir koloninin çapı bir tanıkla belli süre aralıklarıyla ölçülür. Koşul gerek uzamanın gerekse yayılmanın konsantrasyon değişmelerine yanıt vermesidir.

Sıvı besiyerinde mantar gelişmesinin şekli suş ve kültür koşullarının özellikleriyle çok ilgilidir. Hareketsiz duran bir besiyeri yüzeyinde gelişmeye elverişli olduğu gibi derin kültüre de elverişli suşlar izole edilmişlerdir. Bu sonuncular küçük, yuvarlak misel kümecikleri (pellet) oluştururlar. Bu misel kümecikleri hifler halinde parçalansalar dahi sonradan aynı toplulukları yeniden oluştururlar. Bu oluşum kuvvetli

çalkalanan bir sıvı içerisinde misel ve ortam arasındaki besin alışverişini ve son ürünün eldesini kolaylaştırır.

Mantar kümecikleri santrifügasyon veya filtrasyon ile kültür sıvısından ayrılırlar ve kuru ağırlıkları veya ıslak hacimleri birim hacim başına oluşan biyokitle için bir ölçü olarak kabul edilir. Şayet besiyeri kompleks yapıda ve $CaCO_3$, yağ, soja kırması gibi çözünmeyen maddeler içeriyorsa, o takdirde bu ölçmeler yanlış sonuçlar verebilir. Bu gibi maddeler kısmen asitlerle ve organik çözücülerle ekstre edilerek uzaklaştırılabilir. Fakat bu arada hücre maddeleri de zayi olabilir. İşleme sırasında mantar hifleri patlayarak içerikleri dışarı çıkabilir. Filtreye sıkı tutunması miselin filtreden alınmasını zorlaştırır. Bu filtrasyonda bir sakınca oluşturur. $Al_2(SO_4)_3$ gibi koagulasyon maddelerinin veya $CaCl_2$ (1–3 g/ l) veya filtre yardımcı maddelerinin (Hyflo–Supercel) ilâvesi filtrasyon işlemini kolaylaştırır ve teşvik eder.

MALZEME:

1. Malt şırası yatık agarı üzerinde spor verdirilmiş *Aspergillus niger* kültürü
2. Steril pipet
3. İçerisinde 100 ml besiyeri (Maya ekstraktı 10 g, Pepton 20 g, Glükoz 20 g, $CaCO_3$ 5 g, KNO_3 1 g, KH_2PO_4 1 g, Damıtık su 1000 ml, pH 6.5) bulunan 500 ml hacimli karıştırıcılı Erlenmeyer kapları
4. Çalkalayıcı inkübatör
5. G 2–filtresi
6. Su trompu
7. Kurutma dolabı
8. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Spor verdirilmiş bir tüp yatık kültürü üzerine 5 ml steril su ilâve ediniz ve çalkalayarak sporların suya geçmesini sağlayınız.
2. İçerisinde besiyeri bulunan Erlenmeyerlere spor süspansiyonundan 2 ml aşılayınız.
3. Erlenmeyerleri 24–36 saat süreyle 25°C'de çalkalayıcılı bir inkübatörde tutunuz.

4. Miselin oturmasını önlemek için her defasında Erlenmeyerin içindeki kültür sıvısını iyice çalkaladıktan sonra G 2 filtresi üzerine dökünüz.

5. Küçük hacimli kültür sıvıları için G 2 filtresi üzerine analitik bir filtre kâğıdı koyunuz ve bununla beraber kurutarak tartınız. Bu önlem miselin filtre üzerinden kolay alınmasına yardım eder.

6. Filtreyi birkaç defa suyla yıkadıktan sonra alınan biyokitleyi en iyisi vakuumlu bir kurutma dolabında 80°C'de, bu yoksa, normal basınç altında 110°C'de kurutunuz.

7. Tartmadan önce bir eksikatöre koyunuz.

8. Kültür sıvısındaki misel küçük topaklar halindeyse, ölçülü bir santrifüj tüpünde "ıslak hacim" tayin edebilirsiniz.

SORULAR:

1. Yüzey ve derin kültüre elverişli suşların gelişme şekillerini tanımlayınız.

2. Gelişme üzerinde etkili faktörleri veriniz.

3. Miselin gelişmesiyle kuru ağırlığı arasında nasıl bir ilişki vardır?

4. Bir yatık ve plat agarda misel gelişmesi kantitatif olarak nasıl belirlenir?

5. Miselin kültür sıvısından ayrılması ve ölçülmesi ile ilgili yöntemleri anlatınız.

6. Deney sonunda bulduğunuz kuru biyokitle ağırlığına göre glükoz üzerinden verimi hesaplayınız.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XVII. UYGULAMA

Dış Etkenlerin Küf Mantarının Gelişmesi Üzerinde Etkisi

GENEL BİLGİ:

1. Nemin etkisi: Küf mantarlarının gelişmesi üzerinde, özellikle katı substratların ne kadar su içermesinden çok bu suyun "nisbî buhar basıncı" önemlidir. Çünkü organizmanın faydalanabileceği suyun miktarını bu faktör tayin eder. Bir substratın küflenebilmesi için içerdiği suyun buhar basıncının % 80'den yukarıda olması, hatta küflenmenin belirgin olarak görülebilmesi için bunun % 85 'in üstüne çıkması gerekir. % 85–95 arasında ise çoğunlukla yeşil, sarı veya hatta siyah renkte *(Penicillium* ve *Aspergillus)* küf mantarlarının geliştikleri görülür. Bunun üstünde çoğunlukla *Mucor* ve *Rhizopus* türlerine de rastlanır.

Bu % 85 nisbî buhar basıncı pratikte pudra şekerinin topaklanmasıyla tayin edilebilir. Tuzun sulanması ise % 76'lık bir nisbî buhar basıncına karşılıktır. Küf mantarlarının nisbî buhar basıncını basit bir deneyle saptamak olanaklıdır. Bu deneyde kullanılacak değişik nisbî buhar basıncındaki çözeltileri hazırlamak için 100 ml suda eritilecek mutfak tuzunun miktarı aşağıda verilmiştir

Nisbî buhar basıncı	% 100	% 95	% 90	% 85	% 80
100 ml suda g NaCl	0	8	16	23	Doymuş çözelti

Küf mantarlarının 0°C'nin altında çalışması enderdir. Bazıları için min. 8°C, bazıları için ise 8–12°C'dir. Max. sıcaklık derecesi bazıları için 40°C iken, bazıları için de 60°C'yi bulur. Opt. sıcaklık aralığı 20–30°C'dir. Bununla beraber *Aspergillus* ve *Rhizopus* türleri için opt. sıcaklık aralığı 30–40°C'ye kadar yükselebilir.

2, İz elementlerin etkisi: İz elementler adından da anlaşılacağı üzere besiyerinde ancak iz miktarlarda bulunan element demektir. Bu elementler çok az miktarlarda gelişmeyi teşvik ettikleri halde daha yüksek miktarlarda gelişmeyi engelleyici, hatta organizmaya toksik etkide bulunurlar. Bu elementler demir, çinko, bakır, manganez ve molibdendir. Ancak iz element isteği mantardan mantara değişiklik gösterir.

Küf mantarlarının mikroelement istekleri genellikle 0.001–0.5 mg/1 konsantrasyonları arasında değişir. Bu elementler istenilen miktarın yukarısında toksik etki yaparlar.

İz elementler çeşitli enzimlerin aktif olabilmeleri için gereklidir. Bu elementler aynı zamanda vitaminlerin ve diğer metabolitlerin sentezi ve normal gelişme ve sporlanma için istenirler.

MALZEME:

1. Yatık agar üzerinde *Aspergillus* kültürü
2. Malt şırası agarı
3. Halkalı lam ve lameller
4. Steril petri kapları
5. İz element deneyi için besiyeri:

NH_4NO_3 (Proanaliz)	0.4 g
KH_2PO_4 (Proanaliz)	0.1 g
$MgSO_4 7H_2O$ (Proanaliz)	0.1 g
Eriyebilir nişasta (Merck)	2 g
Damıtık su (Bidestile)	200 ml

6. İz element çözeltisi:

$ZnSO_4$ (Proanaliz)	1.2 g
Damıtık su (Bidestile)	100 ml

7. Erlenmeyer kapları (yıkama çözeltisinden sonra bidestile damıtık suyla yıkanmış).
8. İnkübatör
9. Diğer malzeme

İŞLEM:

1. Nemin etkisi:

a) Yatık agar kültürü üzerine 5 ml steril su ilâve ederek spor süspansiyonu hazırlayınız.

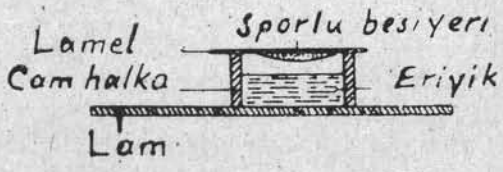
b) 5 adet lamel üzerine birer damla erimiş haldeki malt agarından naklediniz.

c) Malt agarı donduktan sonra ortasına gelecek şekilde spor süspansiyonundan bir aşı iğnesiyle aşılama yapınız.

d) Üzerinde yüksekliği 1 cm olan halkalı 5 adet lam alınız ve halka içerisine yarıya kadar nisbî buhar basıncı % 80, % 85, % 90, %95 ve % 100 olan çözeltilerden koyunuz.

e) Hazırlanmış lamelleri (c) ters çevirerek vazelin sürülmüş halkalar üzerine sırasıyla yerleştiriniz (Şekil: 13).

f) Küf mantarının gelişme şekli ve koloni oluşturmalarını mikroskop altında inceleyiniz.



Şekil: 13. Çoğalma eğrisi

Şekil: 13. Küf mantarlarının gelişmesi üzerinde nemin etkisi deneyi

2. Sıcaklık etkisi:

a) Petri kaplarında hazırlanmış malt şırası agar platı üzerine ortaya gelecek şekilde bir parça misel naklediniz.

b) Aşılanmış platı 3 gün arayla 20°, 25°, 30°, 35° ve 40°C'de inkübatörde bırakınız.

c) Misel gelişmesini inceleyiniz ve resmini çiziniz.

3. İz elementlerin etkisi:

a) Hazırlanmış besiyerini 4 Erlenmeyer kabına eşit bir şekilde dağıtınız.

b) Bu Erlenmeyer kaplarından üçüne sırasıyla 0.3, 1.0 ve 10 ml $ZnSO_4$ çözeltisinden ilâve ettikten sonra hepsini sterilize ediniz.

c) Erlenmeyer kapları soğuduktan sonra her birini 1 ml spor süspansiyonu ile aşılayınız.

d) 2–3 hafta 35°C'de inkübe ediniz.

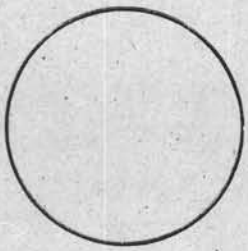
e) Oluşan miselin kuru ağırlığını tayin ederek karşılaştırma yapınız.

SONUÇ

1. Nemin etkisi deneyi

	Nisbî buhar basıncı				
	% 80	% 85	%90	% 95	% 100
Koloninin çapı (mm)					

2. Sıcaklığın etkisi deneyi



Koloninin 20°, 25°, 30°, 35° ve 40°C'de üçer gün arayla görünüşü

3. İz elementlerin etkisi deneyi

	İlâve edilen $ZnSO_4$ çözeltisi		
	0.3 ml	1.0 ml	10 ml
Misel kuru ağırlığı (g)			

Not: _____

SORULAR:

1. Substratın içerdiği suyun nisbî buhar basıncını tayin eden faktör nedir?

2. Pratikte nisbî buhar gücünden nasıl ve nerede faydalanabiliriz?

3. Her bir organizma için belli bir sıcaklık aralığının bulanmasının anlamı sizce nedir?

4. İz elementler arasında da organizma ve iz element arasındaki ilişkiye benzer bir ilişki vardır. Bunun mekanizması nedir?

Tarih:

Kontrol eden

İmza

XVIII. UYGULAMA

Küf Mantarlarının Nişasta ve Proteini Parçalamaları

GENEL BİLGİ: Küf mantarları enzim bakımından çok zengindirler. Bu nedenle çok çeşitli C–ve N– kaynaklarından beslenmelerinde faydalanabilirler.

Nişastanın endüstriyel ölçekte şekerlendirilmesinde bugün birçok küf mantarı çeşidinin adı geçmektedir. Bunlardan başta *Aspergillus oryzae* olmak üzere *Mucor rouxii*, *Rhizopus delemar* ve *Botrytis cinerae* ve daha sonra *Asp. niger*'i saymak olanaklıdır.

Küf mantarlarının proteolitik enzimleri içermeleri gıda sanayiinde özellikle küflü peynir imalinde önemlidir. Bu çeşit peynirlerin olgunlaşma aşamasında gelişmesi istenilen küf mantarı meydana getirdiği protein metabolizma ürünleriyle peynire karakter kazandırır.

MALZEME:

1. Malt şırası yatık agarı üzerinde bir *Aspergillus niger* kültürü
2. Steril Petri kabı
3. İyot çözeltisi
4. Steril ve ağzı mantarla tıpalanmış ilâç şişesi
5. Cam baget
6. Hidroklorik asit

İŞLEM:

1. Nişastanın parçalanması deneyi:

1.1. Eritilmiş malt şırası agarına % 0.2 oranında eriyebilir nişasta ilâve ettikten sonra iyice karıştırınız.

1.2. Hazırlanan agarlı besiyerini steril Petri kabına aseptik koşullar altında dökünüz.

1.3. Agarlı besiyeri donduktan sonra *Asp. niger* kültüründen bir aşı iğnesi ile alacağınız bir misel parçasını platın ortasına gelecek şekilde koyunuz.

1.4. 30°C'de birkaç gün bırakarak küf mantarının iyi gelişmesini sağlayınız.

1.5. Platın üzerine iyot çözeltisinden dökünüz.

1.6. Nişasta hidrolize olmuşsa, koloninin çevresinde ışığı geçiren bir halka oluşur. Platın diğer kısımları ise, nişasta -iyot tepkimesi sonucu mavi renk alır.

2. Proteinin parçalanması deneyi:

2.1. Steril bir ilâç şişesi içerisine küflü peynirden steril bir pens yardımıyla bir miktar örnek koyunuz.

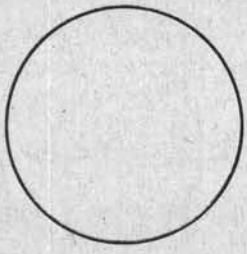
2.2. 30°C'de birkaç gün gelişmeye bırakınız.

2.3. Şişenin kapağını açınız ve içerisine hemen hidroklorik aside (yak. % 10'luk HCl) batırılmış bir cam bageti sokunuz veya ıslatılmış bir parça kırmızı turnusol kağıdı atınız.

2.4. Proteinin parçalanması aminoasidin deaminasyonu sonucu açığa çıkan NH_3'ın HCl ile tepkimesi sonucu NH_4Cl buharlarının oluşup oluşmadığını, turnusol kâğıdı kullanıldığında ise kırmızı rengin maviye dönüşüp dönüşmediğini inceleyiniz.

SONUÇ

1. Nişastanın parçalanması deneyi



İyotla muamele edilmiş koloninin görünüşü

2. Proteinin parçalanması deneyi

Mikroorganizmanın adı	Ayraç	
	HCl	Turnusol

Not: _____

SORULAR:

1. Amilolitik ve proteolitik organizmanın tanımlanmasını yapınız.

2. Nişastanın ve proteinin parçalanma ürünlerinin neler olduğunu inceleyiniz.

3. Nişasta ve protein parçalanma ürünlerinin mikrobik metabolizmada kullanılmasını inceleyiniz.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

XIX. UYGULAMA

Küf Mantarlarının Organik Asit Oluşturmaları

GENEL BİLGİ: Küf mantarları endüstride bazı organik asitlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ucuz ham madde ve yüksek verimli suş gibi kimyasal sentez yapan endüstriye nazaran daha yüksek maliyet oluşturmasına neden olan bazı sorunları halledildiği takdirde ise, daha pek çok organik asit üretimi için küf mantarlarının kullanılması olanaklıdır. Sitrik asit söz konusu olduğu zaman çeşitli küf mantarları arasından *Aspergillus* cinsi ön planda gelir. Bu cinsin "*niger*" türüne dahil bazı suşlar bugün endüstride başarıyla kullanılmaktadır. Bu mikroorganizma glükozun yıkımı sırasında oksalasetat ve asetil CoA'dan, özellikle C/N oranı yüksek olan besiyerlerinde sitrik asit oluşturur. Bu sırada bir miktar oksal ve glükonik asit de meydana gelir.

MALZEME

1. Deney besiyeri:

Sakkaroz	190 g
NH_4NO_3	2.3 g
KH_2PO_4	1.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.25 g
pH 3.0	
Damıtık su	1000 ml

Besiyerinin pH ayarı sterilizasyondan sonra 2 N HCl kullanılarak yapılır.

2. *Aspergillus niger*'in yatık agar kültürü
3. Fernbach kapları
4. G2, G3 ve G4 filtresi

5. 0.1 N NaOH çözeltisi

6. % 10–15'lik $CaCl_2$ çözeltisi

7. Derişik NH_3

8. % 60 ve % 96 'lık alkol

9. 1 N HCl çözeltisi

10. Na-asetat

11. Seyreltik N_2SO_4

12. N/10 $KMnO_4$

İŞLEM:

1. 1800 ml'lik Fernbach kabına deney besiyerinden 1000 ml koyunuz.

2. *Asp. niger* kültüründen hazırlanmış konidi süspansiyonundan besiyerine 5 ml nakledíniz ve 30°C'de inkübe ediniz.

3. Çözeltiden her iki günde bir steril koşullarda 2 ml alarak titre ediniz. Bu sırada kabı hafif eğerek misel tabakasının bozulmasını önleyiniz.

4. Asitlik maksimuma eriştiği zaman (2–3 hafta) bütün çözeltiyi G2 filtresinden geçiriniz. Filtre üzerinde kalan misel tabakasına üzerinden batırarak bütün çözeltinin filtrata geçmesini sağlayınız. Filtratı 5 l 'ye tamamlayınız.

5. Filtrattan 10 ml alınız ve kaynayıncaya kadar ısıtınız. Çözelti bu sıcaklıktayken üzerine % 10–15'lik $CaCl_2$ çözeltisinden ilâve ediniz. Ortaya çıkan tortu Ca-oksalattan ibarettir.

6. Çözeltiyi bir gece bırakınız ve sonra filtre ediniz. Çözeltide sitrik asit ve fermantasyon sırasında oluşmuşsa, glükonik asit kalmıştır.

7. Sitrik asidin tayini için çözeltiyi kaynayıncaya kadar ısıtınız. NH_3 ilâve ederek ortamı kalevi yapınız ve 1/3 çözelti kalıncaya kadar buharlaştırınız. Buharlaştırma sırasında arasıra NH_3 ilâve ederek pH'yı yüksek tutunuz.

8. Ortaya çıkan Ca-sitrat tortusunu çözelti sıcakken G4 filtresinden geçirerek sıvı fazdan ayırınız.

9. Filtreyi kaynayan destile suyla ve % 60'lık alkolle iyice yıkayınız.

10. Filtreyi 100°C'de ağırlığı sabit kalıncaya kadar kurutunuz. Elde olunan susuz Ca-sitratın 1 gramında 0.77 g susuz sitrik asit bulunur.

11. Ca–oksalat tortusunu ise gerektiği kadar 1 N HCl ilâve ederek çözünüz ve Na-asetat ilâve ederek tekrar çöktürünüz. Bu sırada ayraç olarak kongo kırmızısı kullanınız.

12. Tortuyu seyreltik sıcak H_2SO_4 ile çözünüz ve çözeltiyi N/10 permanganat ile titre ediniz. 1 ml 0.1 N $KMnO_4$ 4.5 mg susuz oksalik asite karşılıktır.

13. Ca–sitrat tortusunun filtratındaki glükonik asidin tayini için, çözeltiyi koyu bir kıvam alıncaya kadar buharlaştırınız.

14. Ortaya çıkan tortu çözününceye kadar % 96'lık alkol ilâve ediniz.

15. Ağzı kapalı bir kapta ve buzdolabında 2–3 gün süreyle bırakınız.

16. Ortaya çıkan tortu Ca-glükonattan ibarettir. Çözeltiyi G3 filtresinden geçirdikten sonra tartınız (Bkz.: Madde 9).

SONUÇ

1. Maksimum asit oluşumunun izlenmesi deneyi

Gün	Sarfedilen 0.1N NaOH ml	Gün	Sarfedilen 0.1N NaOH ml
0		12	
2		14	
4		16	
6		18	
8		20	
10		22	

2. Asitin nitel ve nicel tayini'deneyi

Asit çeşidi	Miktar g.	% Verim (Sakkaroz üzerinden)	Sit./ Oks./ Glük. asit oranı
Sitrik asit			
Oksalikasit			
Glükonikasit			

Not: _____

SORULAR:

1. Küf mantarlarıyla yapılan asit oluşumu deneylerinde neden Fernbach kaplarını kullandınız?

2. Bir besiyerinde bulunan C ve N elementlerinin oranı yüksekse *Aspergillus niger*'in sitrik asit oluşturması teşvik edilmiş olur. Nedeni?

3. Besiyeri pH'sının sitrik, oksalik ve glükonik asit oluşundaki rolünü inceleyiniz.

Tarih:

Kontrol eden
İmza

LİTERATÜR

Boix, M. ve Leveau, J. Y. 1980. *Detection of Wild Yeasts in Brewing Yeasts by Double Fluorescense.* MBAA Technical Quarterly. 17.4. 163–166.

Dechau, P. ve Emeis, C.C. 1973 a. *Abbau von Pektinstoffen durch Hefen der Gattung Saccharomyces.* Mschr. Brauerei. 26. 125–131.

Dechan, P. ve Emeis, C.C. 1975 b. *Pektinabbau durch Hefen.* Mschr. Brauerei. 28.125–131.

Drews, G. 1976 *Mikrobiologisches Praktikum.* Springer-Verlag. Berlin.

Dittrich, H. H. 1963. *Bakterien, Hefen, Schimmelpilze.* Kosmos-Verlag Frankh. Stuttgart.

Jansen, H.E. ve Mendlik, F. 1951. *European Brewery Convention.* Ebserier Publishing Company. Amsterdam.

Jörgensen, A. 1956. *Mikroorganismen der Gärungsindustrie.* Verlag Hans Carl Nürnberg.

Minnarik, E., Laho, L. ve Navara, A. 1960. *Beitrag zur Bestimmung der Zuckerassimilation von Weinhefen mittels Papierchromatographie.* Mitt. 10. 1–2, 23–27.

Moore-Landecker, E. 1972. *Fundamentals of the Fungi.* Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N–J.

Köşker, Ö. 1976. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu.* A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 586.

Köşker, Ö. 1976. *Süt ve Mamülleri Mikrobiyolojisi ve Hijyeni uygulama Klavuzu.* A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 585.

Pamir, M. H. 1967. *Fermantasyon Teknolojisinde Mikrobiyolojik Metodlar.* A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 283.

Pamir, M. H. 1977. *Fermantasyon Mikrobiyolojisi.* A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları: 639.

Pamir, M.H. ve Kibaroğlu, A. N. 1974. *Yabanî ve Kültür Mayalarının Ayırt Edilmesinde Kristal Viyole Metodu ve Sorbik Asidin Bu Amaçla Denenmesi.* A. Ü. Ziraat Fakültesi (Diploma Tezi).

Öner, M. 1971. *Mikoloji I .Myxomycetes, Phycomycetes ve Ascomycetes.* Bornova. E. Ü. Matbaası.

Öner, M. 1972. *Mikoloji II.* Fungi Imperfecti, Basidiomycetes, Bornova E. Ü. Matbaası.

Rehm, H.J. ve Reed, G. 1981. *Biotechnology.* Vol. 1. Verlag Chemie. Weinheim.

Seidel, H. 1972. *Differenzierung zwischen Brauerei-Külturhefen und Wilden Hefen.* Brauwissenschaft 25. 12. 384–389.

Weinfurtner, F. 1957. *Richtlinien für Hefereinzucht, Biologische Brauerei Betriebskontrolle, Desinfektionsmittelprüfung.* Verlag Hans Carl Nürnberg.