

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GELENEKSEL PEYNİRLERİN ÜRETİMİNE UYGUN DOĞAL STARTER
KÜLTÜRLERİN ÜRETİMİ İLE BU KÜLTÜRLERİN LAKTİK ASİT
BAKTERİ FLORALARININ TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Gülten ŞENOCAK SORAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2018**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GELENEKSEL PEYNİRLERİN ÜRETİMİNE UYGUN DOĞAL STARTER
KÜLTÜRLERİN ÜRETİMİ İLE BU KÜLTÜRLERİN LAKTİK ASİT
BAKTERİ FLORALARININ TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Gülten ŞENOCAK SORAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2018**

Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK danışmanlığında, Gülten ŞENOCAK SORAN'ın hazırladığı '**Geleneksel Peynirlerin Üretimine Uygun Doğal Starter Kültürlerin Üretimi İle Bu Kültürlerin Laktik Asit Bakteri Floralarının Tanımlanması ve Karakterizasyonu**' konulu bu çalışma 30.04.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK.....

Üye : Prof. Dr. A. Ferit ATASOY.....

Üye : Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN

Üye : Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ.....

Üye : Prof. Dr. Mustafa GÜRSES

Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALGIN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 1026

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Kuramsal Bilgiler	4
2.1.1. Laktik asit bakterileri	4
2.1.1.1. <i>Lactococcus</i> cinsi bakteriler	5
2.1.1.2. <i>Leuconostoc</i> cinsi bakteriler	5
2.1.1.3. <i>Streptococcus</i> cinsi bakteriler	6
2.1.1.4. <i>Enterococcus</i> cinsi bakteriler	6
2.1.1.5. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakteriler	8
2.1.2. Diğer cins bakteriler	10
2.1.3. Starter kültür tipleri	10
2.1.3.1. Geleneksel starter kültürler	11
2.1.3.1.1. Doğal (artisanal) starter kültürler	11
2.1.3.1.2. MSS kültürleri	12
2.1.3.2. DSS kültürleri	13
2.1.4. Laktik asit bakterilerinin izolasyon ve tanımlanması	14
2.1.4.1. Fenotipik ve biyokimyasal testlerle tanımlama	14
2.1.4.2. Moleküler yöntemlerle tanımlama	15
2.1.4.3. API kiti ile tanımlama	17
2.1.5. Laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özellikleri	21
2.1.5.1. Asit oluşturma kapasitesi	21
2.1.5.2. Antimikrobiyal maddeler	22
2.1.5.2.1. Hidrojen peroksit	22
2.1.5.2.2. Bakteriosinler	23
2.1.5.2.3. Diğer antimikrobiyal bileşenler	24
2.1.5.5. Tat-aroma bileşiklerinin üretimi	26
2.2. Literatür Özeti	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	41
3.1. Materyal	41
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Geleneksel Kültürlerin Üretimi	41
3.2.1.1. Doğal kültürlerin üretilmesi	41
3.2.1.2. MSS kültürlerinin üretilmesi	42
3.2.2. Geleneksel kültürlerin mikrobiyal florasının tespit edilmesi	42
3.2.2.1. Laktik asit bakterilerinin sayımı	42
3.2.2.2. İstenmeyen kontaminantların varlığı ve yükü	43
3.2.3. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması	43
3.2.4. Laktik Asit Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu	44
3.2.4.1. Morfolojik, fenotipik ve biyokimyasal yöntemler	44
3.2.4.1.1. Gram reaksiyonu	44
3.2.4.1.2. Morfolojik İnceleme	44
3.2.4.1.3. Katalaz reaksiyonu	44
3.2.4.1.4. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilme	45
3.2.4.1.5. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme	45
3.2.4.1.6. Fermentasyon testi	46
3.2.4.2. Bakteri izolatlarının PCR yöntemi ile tanımlanması	46

3.2.4.2.1. DNA izolasyonu	46
3.2.4.2.2. DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik ölçümü	47
3.2.4.2.3. Rep-PCR protokolü	48
3.2.4.2.4. PCR örneklerinin agaroz jelde yürütülmesi.....	49
3.2.4.3. API yöntemi	50
3.2.4.4. Bakteri izolatların teknolojik karakterizasyonu.....	51
3.2.4.4.1. Antagonistik aktivite	51
3.2.4.4.2. Asit oluşturma kapasitesi.....	51
3.2.5. İstatistiksel analizler	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	53
4.1. Geleneksel Starter Kültürlerin Mikrobiyolojik Özellikleri	53
4.2. Telemesi Haşlanan Taze Peynirin Mikrobiyolojik Özellikleri	58
4.3. Bakteri İzolatlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	63
4.3.1. Gram boyama, katalaz testi ve morfolojik özellikler	63
4.3.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilme.....	64
4.3.3. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme	65
4.3.4. Fermantasyon testi	67
4.4. Bakteri izolatlarının moleküler karakterizasyonu	70
4.5. Bakteri izolatlarının API yöntemi ile tanımlanması	76
4.6. Tanımlanan Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik Özellikleri	81
4.6.1. Antagonistik aktivite	81
4.6.2. Asit Üretimi	84
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	87
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	104

ÖZET

Doktora Tezi

GELENEKSEL PEYNİRLERİN ÜRETİMİNE UYGUN DOĞAL STARTER KÜLTÜRLERİN ÜRETİMİ İLE BU KÜLTÜRLERİN LAKTİK ASİT BAKTERİ FLORALARININ TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gülten ŞENOCAK SORAN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK
Yıl:2018, Sayfa:106

Bu çalışmada, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde farklı süt işletmelerinden alınan çiğ inek (10 adet) ve koyun (10 adet) sütlerinden toplam 60 adet geleneksel starter kültür (20 adet termofilik DSK, 20 adet mezofilik MSS, 20 adet termofilik MSS) üretilerek, kültür floralarının laktik asit bakteri yükü ile istenmeyen kontaminant varlığı ve yükleri (koliform grubu bakteri, fekal koliform grubu bakteri, *E. coli*, *S. aureus* ve maya-küf) araştırılmıştır. Ayrıca, geleneksel starter kültürlerin floralarından laktik asit bakteri izolatları alınarak tanımlanmış ve tanımlı bakteri suşlarının asit oluşturma kapasiteleri ile *E. coli* bakterisine karşı antagonistik aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen geleneksel starter kültürler (termofilik DSK, mezofilik MSS ve termofilik MSS) laktik asit bakteri yükleri açısından özellikle Diyarbakır Örgü peyniri, Dil, Lavaş ve Yaprak peyniri gibi pasta filata tipi yöresel peynirlerin endüstriyel üretiminde kullanılabilecek uygunlukta oldukları, ancak istenmeyen kontaminant yükleri açısından aynı durumun geçerli olmadığı tespit edilmiştir. Geleneksel starter kültürlerin LAB florasında, 62 adet *Lactococcus* spp. (50 adet *Lc. lactis* spp. *lactis*, 11 adet *Lc. lactis* spp. *cremoris*, 1 adet *Lc. raffinolactis*), 29 adet *Lactobacillus* spp. (19 adet *Lb. plantarum*, 4 adet *Lb. rhamnosus*, 3 adet *Lb. brevis*, 2 adet *Lb. pentosus*, 1 adet *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*), 25 adet *Enterococcus* spp. (12 adet *E. faecium*, 7 adet *E. avium*, 6 adet *E. faecalis*), 17 adet *Leuconostoc* spp. (8 adet *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, 5 adet *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum*, 4 adet *Leu. lactis*) ve 8 adet *Pediococcus* spp. (*Ped. pentosaceus*) tanımlanmıştır. Tanımlanan bakteri suşlarından toplam 20 adet suşun, *E. coli* bakterisine karşı antagonistik aktivite gösterdiği, tüm suşlarının ise sterilize rekonstitüe sütün asitliğini (24 saat) pH<5.5 değerinin altına düşürdükleri tespit edilmiştir. Mevzuata uygun şartlarda sağılan çiğ sütün kullanımı sonucu elde edilecek geleneksel starter kültürler, ülkemizde yöresel peynirlerin endüstriyel üretiminde önemli bir fırsat olacağı değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, özellikle AB ülkelerinde çeşitli yöresel peynirlerin üretiminde kullanımı teşvik edilen geleneksel kültürlerin, pasta filata tipi peynirler başta olmak üzere yöresel peynirlerin üretiminde kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmaların yapılması ülke ekonomisi ve tüketici istekleri açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, tanımlanan LAB suşları arasında simbiyotik ilişkileri tespit edilen suşlardan oluşan starter kültür kombinasyonları oluşturulmalı peynir ve tereyağı üretim denemelerinde kullanılarak uygunlukları araştırılmalıdır.

ANAHTAR KELİMELEER: Geleneksel starter kültürler, mikrobiyolojik flora, laktik asit bakterileri, bakterilerin teknolojik özellikleri

ABSTRACT

PhD Thesis

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TRADITIONAL STARTER CULTURES AND IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIAL FLORA OF THESE CULTURES

Gülten ŞENOC AK SORAN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK
Year: 2018, Page: 106

In this study, a total of 60 traditional starter cultures (20 thermophilic DSK, 20 mesophilic MSS, 20 thermophilic MSS) were obtained from raw cow (10 samples) and sheep (10 samples) milk taken from different dairy plants in Diyarbakır and Şanlıurfa provinces and the presence of lactic acid bacteria and undesired contaminants and loads (coliform group bacteria, fecal coliform group bacteria, *E. coli*, *S. aureus* and yeast-mold) of the culture flora were investigated. In addition, lactic acid bacterial isolates were identified from the flora of traditional cultures, and also the acidity-building capacities and antagonistic activities against *E. coli* were determined. It has been determined that traditional starter cultures (thermophilic DSK, mesophilic MSS and thermophilic MSS) developed within the scope of this study are suitable for industrial production of regional pasta filata cheeses such as Diyarbakır Örgü, Dil, Lavaş and Yaprak cheese especially for lactic acid bacteria loads, however has also been found that the same situation is not valid in terms of unwanted contaminant loads. In the LAB flora of traditional starter cultures, 62 *Lactococcus* spp. (50 *Lc. lactis* spp. *lactis*, 11 *Lc. lactis* spp. *cremoris*, 1 *Lc. raffinolactis*), 29 *Lactobacillus* spp. (19 *Lb. plantarum*, 4 *Lb. rhamnosus*, 3 *Lb. brevis*, 2 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paracasei* spp. *paracasei*), 25 *Enterococcus* spp. (12 *E. faecium*, 7 *E. avium*, 6 *E. faecalis*), 17 of *Leuconostoc* spp. (8 *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, 5 *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum*, 4 *Leu. lactis*) and 8 *Pediococcus* spp. (*Ped. pentosaceus*) has been identified. A total of 20 strains from the identified lactic acid bacteria strains were determined to exhibit antagonistic activity against *E. coli* and all LAB strains were found to reduce the acidity of sterilized reconstituted milk below pH 5.5 for 24 hours. The traditional starter cultures obtained from high quality raw milk, can be considered as an important opportunity to safely transfer the locally produced raw milk cheese to the industry. In this context, scientific studies on the use of traditional cultures (which are encouraged in the production of various local cheeses in EU countries) in the production of local cheeses especially pasta filata types are of great importance in terms of country's economy and consumer demands. In addition, scientific studies on symbiotic relationships between defined LAB strains, and the use of different starter cultures combinations in the experimental production of local cheeses and butter.

KEY WORDS: Traditional starter cultures, microbiological properties, lactic acid bacteria, technological properties of bacteria

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, araştırma konusunun seçiminde ve çalışmanın yürütülmesi aşamasında ilgi ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK' e, Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zülal KESMEN' e, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN' a, GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü çalışanı Ziraat Yüksek Mühendisi Ümrân AKGÜN YILDIRIM' a; ayrıca tezin her aşamasında maddi ve manevi her yönüyle destek olan eşim İsa Ensar SORAN' a ve babam Mehmet İhsan ŞENOCAK' a teşekkür ederim.



ŞEKİLLER DİZİNİ

	SayfaNo
Şekil 2.1. API kuyusu.....	18
Şekil 2.2. API 20 STREP testi için yapılan işlemler.....	19
Şekil 2.3. API 20 Strep testi.....	19
Şekil 2.4. API 50 CH testi için yapılan işlemler.....	20
Şekil 2.5. API 50CHL testi.....	21
Şekil 3.1. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.....	52
Şekil 4.1. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri izolatlarına ait PCR bantlarının agaroz jel elektroforezinden ayrıştırılması ile ilgili örnek elektroforogram.....	71
Şekil 4.2. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan tanımlı laktik asit bakterinin <i>E. coli</i> bakterisine karşı oluşturdukları antagonistik aktivite (zon çapı).....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SayfaNo
Çizelge 2.1. Starter kültür bileşiminde yer alan kok şekilli bakterilerin ayırıcı karakteristik özellikleri.....	8
Çizelge 2.2. Bakteriosin üreten bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriosinler ve etki spektrumları.....	13
Çizelge 3.1. LAB izolatlarının fenotipik olarak cins düzeyinde tanımlanması.....	47
Çizelge 3.2. rep-PCR işlemi sırasında uygulanan sıcaklık ve süre.....	51
Çizelge 4.1. Geleneksel starter kültürlerin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları.....	56
Çizelge 4.2. Geleneksel starter kültürlerin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin ortalama değerler ve oluşan gruplar (log CFU/g).....	57
Çizelge 4.3. Telemesi haşlanan taze peynirin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.4. Telemesi haşlanan taze peynirin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin ortalama değerler ve oluşan gruplar (log CFU/g).....	63
Çizelge 4.5. Farklı kültür tipi ve telemesi haşlanan peynirlerden alınan bakteri izolatlarının Gram reaksiyonu ve Katalaz testi sonuçları.....	64
Çizelge 4.6. Farklı geleneksel kültür ve telemesi.....	65
Çizelge 4.7. Farklı geleneksel kültür ve telemesi haşlanan peynirlerden elde edilen kok/kokobasil şekilli laktik asit bakteri izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarına tolerans durumları.....	65
Çizelge 4.8. Farklı geleneksel kültür ve telemesi haşlanan peynirlerden elde edilen kok/kokobasil şekilli laktik asit bakteri izolatların farklı sıcaklıklarda gelişme durumları.....	66
Çizelge 4.9. Farklı geleneksel kültür ve telemesi haşlanan peynirlerden elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının fermentasyon testi sonuçları.....	67
Çizelge 4.10. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri izolatlarının bazı biyokimyasal testler sonucunda cins düzeyinde tanımlanması.....	69
Çizelge 4.11. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri izolatlarının rep-PCR sonucu cins düzeyinde tanımlanması.....	72
Çizelge 4.12. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri suşları arasında genetik yakınlığı belirten dendogram grafiği.....	73
Çizelge 4.13. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri izolatlarının API test kiti kullanılarak tür/suş düzeyinde tanımlanması.....	78
Çizelge 4.14. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir florasından tanımlanan laktik asit bakterilerinin asitlik oluşturma kapasiteleri ile <i>E. coli</i> bakterisine karşı gösterdikleri antagonistik aktiviteleri.....	80
Çizelge 4.15. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir florasından tanımlanan laktik asit bakterilerinin rekonstitüe sütte inkübasyonu sonucu oluşan gruplar.....	82

SİMGELER DİZİNİ

AB	Avrupa Birliği
API	Automation pour identification
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
MSS	Mixed Strain Starters
DSS	Defined Strain Starters
FDP	Fructose Di Phosphat
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
LAB	Laktik asit bakterileri
Ent.	Enterococcus
Lb	Lactobacillus
Lc	Lactococcus
Str	Streptococcus
MRS	Man Rogosa and Sharpe
PAS	Peynir altı suyu
PEP	Phosphoenolpiruvat
PTS	Fosfotransferaz
RNA	Ribonükleik asit
Cit ⁺	Sitrat pozitif
UHT	Ultra yüksek sıcaklık

1. GİRİŞ

Gıda mikrobiyolojisinde faydalı bakteriler, temel olarak fermente gıdaların üretilmesinde kullanılan çeşitli mikroorganizmaları tanımlamaktadır. Süt; zengin bileşim öğeleriyle insanlar için değerli bir gıda olduğu kadar mikroorganizmalar için de iyi bir beslenme kaynağıdır. Süt, sağımıyla birlikte mikroorganizmalarla kontamine olmakta ve bulaşan mikroorganizmalar uygun sıcaklıkta hızla çoğalmakta ve sütün dayanıklılığını azaltmaktadır. Bu nedenle, dayanıklılık süresini arttırmak, naklini kolaylaştırmak ve gıda çeşitliliğini arttırmak için eskiden beri süt çeşitli ürünlere işlenmektedir. Bu bağlamda, yoğurt ve peynir, insanlığın en eski kültür miraslarından sayılmaktadır. Özellikle peynir, süt ürünleri içerisinde çeşitliliği en fazla olan üründür ve dünyanın hemen her bölgesinde tüketilen bir süt ürünüdür (Gölge, 2009; Kamber, 2005; Kaynar, 2011).

Ülkemizde, 130 civarında yöresel peynir çeşidinin üretildiği tahmin edilmektedir. Bu peynirler, daha çok küçük ölçekli mandıra ve aile işletmelerinde çiğ süttten üretilmekte ve çoğunlukla üretildikleri bölgelerde tüketilmektedir. Bunlardan üretim teknolojileri birbiriyle benzerlik gösteren Dil, Örgü, Yaprak ve Lavaş gibi fermente telemesi haşlanan peynirler Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde geleneksel yöntemlerle üretilmektedir. Ancak bu peynirler, son yıllarda ülkemizin farklı bölgelerindeki büyük ölçekli süt işletmelerinde de çiğ veya pastörize inek sütünden üretilmeye başlanmıştır (Karaca ve Güven, 2004; Tan, 2004; Anonim., 2005).

Yoğurt, peynir ve tereyağı gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde rol alan laktik asit bakterileri doğal olarak sütte bulunmakta veya starter kültür olarak süte ilave edilmektedir (Lombardi ve ark., 2004; Köse ve Ocak, 2014). Peynirin olgunlaşma prosesinin ilk aşamasında LAB' i laktoz fermantasyonunda önemli rol almakta ürettikleri laktik asit ile peynir pıhtısına asit tadı vermekte, pıhtılaşmaya yardımcı olmakta ve karakteristik peynir tekstürünün oluşumuna yardımcı olmaktadır. Ayrıca fermente süt ürünlerinde bozulmaya neden olabilecek bakterilerin gelişimini inhibe etmekte ve çeşitli aroma bileşiklerini üretmektedirler (Duan ve ark., 2007).

Çiğ sütten üretilen peynirlerin tüketilmesi sonucunda çeşitli enfeksiyon ve intoksikasyon riski bulunmaktadır. Pastörize sütten üretilen peynirlerde ise tüketicinin arzuladığı tekstürel ve duysal özelliklerin oluŐmadıđı bilinmektedir. Endüstriyel peynir üretimlerinde, gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından sütün mutlaka pastörize edilmesi, ürünün tekstür ve karakteristik duysal özellikleri bakımından üretimde starter kültür kullanılması teknolojik bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır.

Peynir retiminde geleneksel starter kültürler ile DSS tipi starter kültürler kullanılmaktadır. Geleneksel starter kültürlerin bakteri bileşimi tanımlı değildir, çoğunlukla kaliteli çiğ süt veya PAS'nun fermentasyonu sonucu üretilmekte ve doğrudan veya çoğaltıldıktan sonra pastörize sütün kullanıldığı peynir üretiminde kullanılmaktadır. DSS tipi starter kültürler ise, bakteri bileşimleri bilinmekte, ticari olarak çoğunlukla konsantre liyofilize formda, çoğaltılmadan direk üretimde kullanılmaktadır. Ancak, DSS tipi starter kültürlerin kullanımı sonucu üretilen peynirlerin tekstür ve karakteristik duysal özellikleri, geleneksel olarak çiğ sütten üretilen muadillerini karŐılamaktan uzaktırlar. Bu problem, yöresel peynirlerimizin pastörize sütten yapılacak üretimlerinde, özellikle küçük ve orta ölçekli süt işletmelerinde, geleneksel starter kültürlerin kullanımı ile çözülebileceğine inanılmaktadır. Bu bağlamda termize ve pastörize sütten üretilen Geleneksel Dil peynirinin tekstürel ve duysal özellikleri bakımından, çiğ sütten yapılan muadili ile farklılığın tespit edilmediği bildirilmiştir.

Bu bağlamda, ülkemizde özellikle yoğurt ve ekmek hamuru üretiminde, halk arasında maya olarak adlandırılan ve bir önceki üretimden alınan yoğurt ve ekşi hamur, starter kültür olarak yaygın bir Şekilde kullanıldığı, ancak yöresel peynirlerimiz tümünün hala çiğ sütten retildeği bilinmektedir.

Avrupa Birliği (AB) lkelerinde çeşitli peynirlerin rimi için geliştirilen ve son yıllarda geleneksel peynirlerimizin endüstriyel üretimlerinde kullanımı yaygınlaŐan DSS tipi starter kültürlerinin, geleneksel peynirlerimizin karakteristik duysal özelliklerini kazandırma noktasında yetersiz kaldığı bilinmektedir. Bu

nedenle, çiğ süt ve çiğ sütten yapılan peynir floralarından tanımlanan yöreye özgü laktik asit bakteri kombinasyonlarından oluşan farklı starter kültürlerin geleneksel peynirlerin endüstriyel üretimlerine uygun starter kültür tipi/tiplerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca İtalya, Almanya ve İsviçre başta olmak üzere AB lkelerinde farklı peynirlerin üretiminde kullanılan geleneksel starter kültürlerin yöresel pasta filata tipi peynirlerimiz (Kaşar, Dil, Diyarbakır rg ve Lavaş vs.) başta olmak üzere yöresel peynirlerimizin üretimlerine uygunluklarının araştırılması toplum sağlığı ve tüketici istekleri açısından önem taşımaktadır.

Bu alışmada, Diyarbakır ve şanlıurfa illerinde (Karacadağ bölgesi) farklı süt işletmelerinden bireysel olarak alınan çiğ sütten geleneksel starter kültür elde edilmesi, üretilen bu kültürlerin yöresel peynirlerimizin pastörize sütten gerçekleştirilen üretimlerine uygunluklarının irdelenmesi ile bu kültürlerin laktik floralarının tanımlanması, tanımlanan bakterilerin bazı teknolojik özelliklerinin tespit edilerek DSS tipi starter kültür olarak kullanılma performanslarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kuramsal Bilgiler

2.1.1. Laktik asit bakterileri

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar başlamıştır. İlk kez 19. Yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır (Yıldırım, 2001).

Morfolojik açıdan çok değişken özellik gösteren (kısa veya uzun, çomak veya kok şekilli) familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedir. Tüm üyeler Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, çoğunlukla homofermentatif, hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Bu bakterilerin doğal ortamları süt ve süt mamülleri, işlenmemiş taze veya fermente olmuş bitkilerdir (Albayrak, 2017; Mathur ve Singh, 2005; Kayagil, 2006; Kushi ve ark., 2009).

Laktik asit bakterilerinin morfolojik özellikleri, glukozu fermente edebilme yetenekleri, farklı sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında gelişebilme ve asit/alkali ortamlara karşı direnç göstermelerine göre sınıflandırılabilmektedir. Bu bakteriler, zorunlu homofermentatif ve zorunlu heterofermentatif olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Ancak *Lactobacillus* cinsi için üçüncü bir grup olarak fakültatif grup da bulunmaktadır (Axelsson, 2004).

Laktik asit bakterileri, *Aerogenes*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactocabillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconotoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* olmak üzere 17 gruptan oluşmakta

(Stiles ve Holzapfel, 1997; Albayrak, 2017), ancak bunlardan *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconotoc* ve *Streptococcus* olmak üzere 4 grup süt endüstrisinde kullanılan starter kültür kombinasyonlarında yer almaktadır. *Enterococcus* grubunun ise bağırsak orijinli olmaları ve bazılarının patojen olmalarından dolayı, starter bileşimlerinde yer alıp/almamaları ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Ancak bu bakteriler, geleneksel starter kültürler ile olgun peynir florasında baskın bir şekilde bulundukları ve aroma gelişimine olumlu katkı sağladıkları bilinmektedir. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconotoc* ve *Streptococcus* türleri morfolojik olarak kok, *Lactocabillus* türleri ise basil formundadır (Kılıç, 2001).

2.1.1.1. *Lactococcus* cinsi bakteriler

Lactococcus (*Lc.*) cinsi bakteriler homofermentatif, mikroaerofilik, Gram-pozitif bakterilerdir. Bu bakteri cinsinin üyeleri, 10 °C' de gelişebilirken 45 °C' de gelişim gösteremezler ve glukozdan L(+) laktik asit oluşturma yeteneğine sahiptirler. *Lactococcus* cinsi bakteriler *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* ve *Lc. lactis* olmak üzere beş farklı tür içermektedir. Ancak, bu türler arasında yalnızca *Lc. lactis* süt teknolojisinde starter kültür olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu tür, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* olmak üzere iki alt tür ile önceleri *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* olarak bilinen daha sonra Cit⁺ *lactococci* olarak adlandırılan bir biovaryete içermektedir (Schleifer ve ark., 1985; Stiles ve Holzapfel, 1997). Cit⁺ *lactococci*, yüksek diasetil üretme yeteneği ile *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alt türlerinden ayırt edilmektedir (Samarzija ve ark., 2001).

2.1.1.2. *Leuconostoc* cinsi bakteriler

Leuconostoc (*Leu.*) cinsi bakteriler, morfolojik olarak zincir ya da grup kok şeklinde, şekeri heterofermentatif olarak fermente etmeleri, D-laktat sentezlemeleri ile *Lactococcus* türlerinden ayırt edilmektedirler. *Leuconostoc* cinsi bakteriler tereyağı üretiminde kullanılan starter kültür bileşimlerinde yer alırlar ve sitrat metabolizmaları sonucunda diasetil sentezlemelerinden dolayı aroma oluşumunda önemli role sahiptirler (Cogan, 1995).

2.1.1.3. *Streptococcus* cinsi bakteriler

Streptococcus (Str.) cinsine ait yaklaşık 50 tür ve alttür bulunmaktadır. Gram pozitif olan bu tür ve alttürler yuvarlak şekilli ve zincir formunda (0.2—0.5 µm çapında) bulunurlar (Cogan, 1995). Bu cins bakterilerin en tipik özellikleri, kalın hücre duvarına sahip olmaları ve glukozu aerobik yolla metabolize etmeleridir. *Streptococcus* cinsine ait bazı türler patojenik karakter taşıırken bazı türler ise hastalık etmeni olmayan saprofit karakterlidirler. *Streptococcus* cinsine ait yalnızca *Str. thermophilus* türü starter kültür bileşimlerinde yer almaktadır. Bu bakterinin en yaygın kullanıldığı süt ürünleri yoğurt, Kaşar ve bazı İtalyan ve İsviçre tipi sert peynir çeşitleridir (Limsowtin ve ark., 2002).

Str. thermophilus bakterisi, çiftli ve zincir olarak kok şekilli hücrelerden oluşmakta, karbonhidratları glikoliz yoluyla metabolize ederek L-laktat sentezlemekte, ancak galaktozu fermente edemediği bildirilmektedir. Bu bakterinin 45 °C’de gelişebilmesi, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türlerinin ise 40 °C’de gelişememesi, bu bakteri türlerini birbirinden ayırt etmektedir. Bu özelliğinden dolayı *Str. thermophilus* bakterisi, geleneksel starter kültürlerde bulunan *Enterococcus* türleri ile karıştırılmasına neden olmaktadır. Ancak, birçok *Enterococcus* sp. 10 °C, 6.5 g NaCl/L tuz ve pH 9.6’da gelişebilmesine rağmen, bu bakteri gelişmemektedir (Cogan, 1995).

2.1.1.4. *Enterococcus* cinsi bakteriler

Enterococcus (E.) cinsi bakteriler, hayvan ve insan bağırsak sisteminde, süt ürünleri ve diğer fermente gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bakteriler, 0.5-1.0 µm çaplı oval, uzun zincir formunda bulunur ve genellikle hareketsizdirler. *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* süt ürünlerinde en sık rastlanan türlerdir (Andrighetto ve ark., 2001; Giraffa, 2003; Suzzi ve ark., 2000).

Tuza ve asitliğe karşı olan dirençlerine bağlı olarak bu bakterilerin popülasyonları peynirlerde 5-7 kob/g düzeylerine kadar ulaşabilmektedir. Sitratı

metabolize edebilme yeteneklerinden dolayı peynirin olgunlaşmasına ve aroma gelişimine katkıda bulunabilmektedirler. *Enterococcus* cinsi bakteriler, Feta, Mozzarella ve Cebreiro gibi farklı Avrupa tipi peynirler başta olmak üzere peynir endüstrisinde starter kültür kombinasyonunda kullanılmaktadırlar (Giraffa, 2003).

Bu bakteriler, hayvanların sindirim atıklarında, toprakta, kirli suda, hayvansal gıdalarda bulunabilmektedirler. Bu bakteriler primer patojen olarak bilinmezler, fakat genellikle ikincil patojen olarak özellikle insan bağışıklığını tehlikeye atan bakteriler içinde tanımlanmaktadır (Larson ve ark., 2008). Ayrıca gıdalarda istenmeyen biyojen aminlerin oluşumunda bu bakterilerin etkili olduğu bildirilmektedir (Düz ve Fidan, 2016; Göncü ve ark., 2017). Tüm bu olumsuzluklara rağmen, *Enterococcus* cinsi bakteriler, asitlik, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri, sitratı metabolize etmeleri, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin sentezleme yeteneklerinden dolayı, fermente gıda endüstrisinde önemli oldukları bildirilmektedir (Andrighetto ve ark., 2001; Sarantinopoulos ve ark., 2001; Franz ve ark., 2003; Foulque Moreno ve ark., 2006; Ogier ve Serror, 2008).

Enterococcus cinsi bakterilerin pastörizasyon normuna dirençli olmaları, farklı substratları metabolize etmeleri, düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonlarına adapte olmaları nedeniyle, süt ve et gibi çiğ ve ısıtılmış işleme uygulanan gıda ürünlerinden izole edilebilmektedirler. Ayrıca bu bakteri grubu, ürün işleme süresince son üründe bulunmalarından dolayı, özellikle peynir ve fermente et gibi ürünlerin florasında baskın olarak bulunmaktadır (Franz ve ark., 2003, Giraffa, 2003).

Ayrıca *Enterococcus* cinsi bakteriler, geleneksel starter kültürlerin florasında önemli düzeyde bulunmaktadır (Mohammed ve ark., 2009). *E. faecium* ve *E. faecalis* türleri birçok fermente üründe tespit edilmiştir. Bu iki bakteri hızlı asit üretmeleri, mezofilik kültürlerin kullanıldığı Cheddar peyniri gibi sert peynirlerin üretiminde uygulanan yüksek sıcaklık normunda canlılıklarını koruyabilmeleri nedeniyle starter kültür olarak kullanılabilmeleri için ideal özellikler taşımaktadırlar. Geleneksel kültürler ile olgun peynirlerin florasında önemli sayıda bulunmaları ve bu

peynirlerin aromalarının oluşumunda pozitif etki göstermelerine inanıldığından dolayı, yukarıda anılan iki bakteri türünün starter kültür olarak kullanımlarının yeniden tartışılması gerektiği düşünülmektedir. Her iki bakteri türü, 10 ve 45 °C sıcaklıkta ve pH 9.6'da gelişebilmekte ve D grup antijen içermektedir. Ancak, *Enterococcus* cinsi birçok yeni tür, D grup antijen içermemekte, 45 °C' de ve yüksek tuz konsantrasyonunda gelişmemekte, dolayısıyla klasik ve konvansiyonel metotlarla identifiye edilmeleri mümkün olmamakta ve *Lactococcus* türleri ile ayırt edilememektedir (Axelsson, 2004; Cogan, 1995; Çetin, 2002).

Çizelge 2.1. Starter kültür bileşiminde yer alan kok şekilli bakterilerin ayırıcı karakteristik özellikleri

Bakteri türleri	Laktat izomeri	Gelişme durumu		
		10 °C	45 °C	6.5g NaCl/L
<i>Lactococcus</i> sp.	L	+	-	-
<i>Leuconostoc</i> sp.	D	+	-	-
<i>Str. thermophilus</i>	L	-	+	-
<i>Enterococcus</i> sp.	L	+	+	+

2.1.1.5. *Lactobacillus* cinsi bakteriler

Lactobacillus (Lb.) cinsi bakteriler, gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen çubuk ya da kokobasil şeklindedirler. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanan *Lactobacillus* cinsi bakteriler ya homofermentatif (%85' den fazla laktik asit) ya da heterofermentatif (laktik asit, CO₂ ve etanol ve/veya asetik asit) özellik gösterirler. Bu cins bakteriler, starter ve/veya destek kültür (adjunct culture) ya da starter olmayan LAB olarak peynirin olgunlaşması ve aroma gelişimine etki etmektedirler. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sitrat metabolizması sonucu oluşan asetat, etanol, asetaldehit ve diasetil gibi karbonil bileşikler, peynirin tat- aroma gelişimine katkıda bulunmaktadır (Rea ve Cogan, 2003; Mama ve ark., 2002).

Lb. paracasei subsp. *paracasei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* bakterilerine ait suşlar peynir üretiminde kültür ya da destek kültür olarak kullanılabilmektedir (Giraffa ve Rosetti, 2004).

Bu cins bakteriler karbonhidrat metabolizmasına bağlı olarak thermobacterium, streptobacterium ve betabacterium olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar. Thermobacterium grubu bakteriler, obligat homofertatiftirler, hekzozları laktata metabolize ederler, pentozları fermente edemezler, glukozdan gaz oluşturmazlar ve 15-45 °C’de gelişebilirler. Bu grup içinde yer alan *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *Lb. helveticus* bakterileri, ticari starter kültür bileşimlerinde yer almaktadırlar. *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* bakterisi ise muhtemelen laktozu fermente edemediğinden dolayı starter kültür bileşiminde yer alamamaktadır. Bağırsak orijinli olan *Lb. acidophilus* bakterisi, yoğurt üretiminden sonra yoğurda ilave edilmekte, ancak asit üretiminde önemli bir rolü olmadığından dolayı, starter kültür olarak kabul görmemekte, ancak sağlık üzerinde olumlu etkisinin olduğu düşüncesiyle starter bileşimlerinde yer almaktadır (Kılıç, 2001).

Streptobacterium grubu bakteriler, hekzozları fakültatif heterofermentatif olarak fermente ederler. Bu bağlamda yüksek şeker konsantrasyonunda hekzozları glikoliz yoluyla laktata parçalarlar, düşük şeker konsantrasyonunda ise, hekzozları heterofermentatif olarak laktat, etanol/asetat ve CO₂’te fermente ederler, pentozları ise fosfoketolaz yoluyla laktat ve etil alkol/asetat ve CO₂’te metabolize etmelerinin yanı sıra, pentozlardan laktik asit ve asetik asit oluşturma özelliklerine sahiptirler ve 23-35 °C’de gelişirler (Kılıç, 2001). Temelde 4 alttürden oluşan *Lb. casei* ve *Lb. plantarum* bakterileri, geleneksel kültür floralarında yaygın olarak bulunurlar. Bu iki bakteri *Lb. curvatus* ile birlikte olgun peynir florasında da bulunurlar. Bu grup bakteriler şekerleri homofermentatif olarak metabolize ederler, 15 °C’ de gelişebilirler, ancak 45 °C’ de gelişemezler (Cogan, 1995).

Betabacterium grubu bakteriler ise heterofermentatif türlerdir ve heksozları %50 oranında laktik asit, etanol ve CO₂’ e fermente ederler. Glukozdan gaz, fruktozdan mannitol oluşturmurlar, 15 ve 45 °C’de gelişimleri türlere göre değişiklik gösterirler. *Lb. fermentum*, artisanal kültür floralarında yaygın olarak bulunmakta olup, obligat heterofermentatif olup ve 45 °C’ de çoğalabilir (Kılıç, 2001).

2.1.2. Diğer cins bakteriler

Bifidobacterium, *Propionibacterim* ve *Brevibacterium* türü bakteriler de fermente süt ürünlerinde yüksek sayıda bulunmaktadır. *Bifidobacterium* türleri, sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı üretim sonrası fermente süt ürünlerine ilave edilirler. Bu bakteri türleri katalaz negatif, obligat anaerob ve şekerlerden laktat (ve asetat) üretmelerine rağmen LAB olmayıp, gram pozitif eubacteria'nın *Actinomyces* altında yer alırlar. En fazla yaygın kullanılan türü, *Bf. longum*'dur. Bu bakteriler barsak orijinli olup, N kaynağı olarak NH_4^+ 'de kullanabilirler (Fenderya ve Akalın, 2003).

İsviçre tipi peynirlerde *Propionibacterium* türleri bulunmaktadır. *Propionibacterium* türleri, katalaz pozitif olup, anaerobik şartlarda daha iyi gelişmekte, optimum gelişme sıcaklıkları 30-37 °C' dir. İsviçre tipi peynirlerde laktik asiti (3 mol), propionik asit (2 mol), asetik asit (1 mol) ve CO_2 (1 mol)' e dönüştürürler. Karbondioksit, İsviçre tipi peynirlerde büyük gözenekli yapının oluşmasını sağlamaktadır. Geleneksel İsviçre tipi peynirlerde, peynir üreticileri propionik asit bakterilerinin peynire kontamine olmasını beklemektedirler. Ancak günümüzde adı geçen peynirin üretiminde mayalama öncesi pastörize süte ilave edilen starter kültür bileşimlerinde bu bakteriye yer verilmektedir (Cogan, 1995).

Brevibacterium linens bakterisi, Limburger ve Brick gibi yüzeyi olgunlaştırılan peynirlerin yüzey mikrofloralarında bulunmakta olup gram pozitif ve düzensiz çubuk şekillidirler (Cogan ve Accolas, 1996).

2.1.3. Starter kültür tipleri

Fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan starter kültürler, temel olarak iki gruba ayrılmaktadır (Limsowtin ve ark., 1996). Bunlar;

1. Geleneksel starter kültürler

- a. Doğal (Artisanal) starter kültürler
- b. MSS kültürleri (Mixed strain starters, bakteri karışımı belli olmayan kültürler)

2. DSS tipi kültürler (Defined-strain starters, karışımı belli olan kültürler)

2.1.3.1. Geleneksel starter kültürler

2.1.3.1.1. Doğal (artisanal) starter kültürler

Bu kültürler, direk olarak bir önceki üretimden türetilmektedir. Bunun için, fermente ürünün son üretiminden bir parça alınarak bir sonraki üretimde kullanılmaktadır. Örneğin, bir Yunan peynir çeşidi olan Kopanisti, bir önceki üretimden bir kısım peynir alınarak, drene olmuş pıhtı ile karıştırılması sonucu üretilmektedir (Limsowtin ve ark., 1995). Geleneksel olarak ülkemizde, yöresel yoğurt üretiminde starter kültür olarak bir önceki yoğurttan bir kısım alınarak, ısıtılmış işlem görmüş ve inkübasyon sıcaklığına kadar soğutulmuş sütlere ilave edilmesi, veya ekmek hamuru üretiminde maya olarak ekşi hamurun kullanılması örnek olarak verilebilir.

Daha yaygın bir şekilde, bazı İtalyan ve İsviçre tipi peynir çeşitlerinin üretiminde 'peyniraltı suyu starterleri' (PAS, whey starters) kullanılmaktadır. Bu amaçla, bir önceki günün üretiminden elde edilen PAS, selektif şartlarda (yüksek sıcaklık ve düşük pH) inkübe edilerek PAS starteri elde edilmektedir. Veyahut, bazı İtalyan tipi peynir çeşitlerinin (Italico, Mozzarella, Montasio gibi) üretiminde 'doğal süt starterleri' (natural milk starters) kullanılmaktadır. Bu kültürler, sütün termize edilerek yüksek sıcaklıkta inkübasyonu ile üretilmekte ve genellikle *Str. thermophilus* içermektedir.

Doğal kültürler, peynir işletmesinde her gün üretilmekte, üretim yüksek inkübasyon sıcaklığı, ısıtılmış işlem ve düşük pH gibi selektif şartlarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle, mikrofloranın bileşenleri arasında bir yarışma ve antogonizm sonucu arzulanan mikroflora oluşmaktadır. Sonuç olarak, bu tip kültürlerin bileşimi, kompleks ve nispeten değişken olup tür ve suş seviyesinde tanımlanmamıştır. Genellikle LAB' nin birkaç türünden oluşmuşlardır (Limsowtin ve ark., 1995).

2.1.3.1.2. MSS kültürleri

Artisanal kültürler, fajların bulaşmaması amacıyla herhangi bir özel önlemin alınmadığı işletme ortamında günlük çoğaltılan ve LAB' nin tanımlanmamış karışımından oluşmaktadır. Kültürlerin günlük olarak çoğaltılması, starter bileşiminin düzensiz değişmesine, bu da standart kalitede peynir üretimini zorlaştırmasına neden olmaktadır. Bu problemin çözümü amacıyla, ticari MSS starter kültürleri geliştirilmiştir. MSS kültürlerinin de bileşimi, tam olarak bilinmemektedir (Limsowtin ve ark., 1995). Kaliteli peynir üretilmesini sağlayan doğal kültürler, laboratuvar ortamında kontrollü şartlarda MSS kültürlerinin hazırlanmasında inokül olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber, bu tip karışımı belirsiz kültürlerin kontrollü şartlarda bile sürekli çoğaltılması, kültürü oluşturan bileşenler arasında oransal olarak değişikliğe neden olabilmektedir. Modern uygulamada, çoğaltma işlemleri minimize edilmiş ve MSS kültürleri normal veya konsantre formda dondurularak veya liyofilize edilerek muhafaza edilerek ticareti yapılmaktadır (Limsowtin ve ark., 1996; Üçüncü, 2005).

Normal formda dondurulmuş veya liyofilize edilmiş farklı firmalar tarafından ticareti yapılmaktadır. MSS kültürleri, aseptik olarak steril süte transfer edilmekte, süt pıhtılaşana dek inkübe edilmekte ve ana kültür olarak üretilmektedir. Daha sonra, ara kültür ve işletme kültürü hazırlanmaktadır. Laboratuvar imkanları kısıtlı olan bazı küçük süt işletmelerinde kültürün aseptik şartlarda çoğaltılması, bakımı ve muhafazası problem oluşturduğundan birçok firma MSS kültürlerini, işletme kültürünün direk üretimi veya peynir sütünün direk inokülasyonunu sağlayacak şekilde üretmektedirler (Limsowtin ve ark., 1996; Üçüncü, 2005).

İtalya ve Fransa gibi birçok Avrupa ülkelerinde, termofilik MSS kültürleri İsviçre tipi peynirler ile telemesi yüksek sıcaklıkta ısıtılma işlemi gören peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu kültürler, aseptik olmayan şartlarda çoğaltılmakta, dolayısıyla aynı zamanda faj içermektedirler. Bu kültürler, artisanal PAS kültürlerinden elde edilmektedir. Örneğin, kaliteli Emmental peyniri üreten işletmelerden çok sayıda doğal MSS kültürü toplanarak farklı testlerden

geçirilmektedir. Bu testler sonrası olumlu olarak değerlendirilen kültürler, söz konusu peynir üreticilerine dağıtılmak üzere seçilmektedir. Seçilen kültürler, dondurularak veya liyofilize edilerek muhafaza edilmekte, daha sonra bu kültürlerden sıvı kültürler hazırlanarak peynir işletmelerine dağıtılmaktadır. MSS kültürleri, doğu ve batı Avrupa kıtasında çok geniş bir coğrafyada kullanılmaktadır. İtalya gibi bazı ülkelerde MSS kültürleri veya bunların artisanal prekösürleri, geleneksel peynir üretiminin gerçekleştiği bölgesel idareler tarafından kullanılmaları ısrarla tavsiye edilmektedir. Günümüzde bu tip kültürlerin kullanımına olan ilgi de artmıştır. Son yıllarda MSS kültür teknolojisindeki gelişmeler, bu kültürlerin üretiminde daha fazla kontrol sağlanmış ve daha iyi starter kültür performansı elde edilmiştir (Limsowtin ve ark., 1996).

2.1.3.2. DSS kültürleri

DSS kültürlerinin tür ve suş düzeyinde bileşimleri bilinmektedir. Bu kültürler, genellikle iki veya daha fazla LAB türü içermekte, mezofilik veya termofilik veyahut mezofilik ve termofilik LAB türlerinin bir karışımıdır. (Neve, 1995).

Mezofilik tek tür içeren DSS kültürleri, faj enfeksiyon ihtimalinden dolayı kullanımları sınırlıdır ve faj enfeksiyonu sonucu, aktiviteleri tamamen kaybolmaktadır. Bu nedenle, DSS kültürleri, birden fazla LAB türü kombinasyonundan oluşmaktadır. Faj enfeksiyonunun engellenmesi için en önemli aşama kuşkusuz, kültür çiftlerinden oluşan rotasyon işleminin takip edilmesidir. Günlük olarak, kültürlerin rotasyona tabi tutulmaları önem taşımaktadır. Rotasyon işleminde, iki farklı türün farklı suşları ardışık olarak üretimde kullanılmaktadır. Kullanılan kültür çiftlerinin, faj enfeksiyon duyarlılıklarının farklı olması önemlidir. İdeal olarak, rotasyondaki suşların hiçbirisinin aynı faj tarafından enfekte edilememesi önemlidir (Cogan ve Accolas, 1996; Neve, 1995; Üçüncü, 2005).

Termofilik MSS kültürlerinin başarılı bir şekilde fermente telemesi yüksek sıcaklıkta ısıtılma işlemi gören peynirlerin üretiminde kullanılmaları sonucu, termofilik

MSS kültür kombinasyonları izole edilerek tanımlanmış ve teknolojik karakterizasyon işlemleri yapılarak ticari üretimleri gerçekleştirilmektedir. Günümüzde termofilik DSS kültürleri, dondurulmuş veya liyofilize edilmiş olarak ticareti yapılmaktadır. Fransa' da *Str. thermophilus* ve *Lb. helveticus* bakterilerini içeren termofilik DSS kültürleri, Emmental ve Gruvyere tipi peynirlerin üretimi için geliştirilmiştir. Bakteri türleri, bireysel olarak çoğaltılmakta, santrifüj yardımıyla konsantre edilmekte, liyofilize veya dondurulmaktadır (Limsowtin ve ark., 1995).

Günümüzde sayıları fazla olmayan firmalar, ticari starter kültürleri üretmekte ve uluslararası ticaretini yapmaktadırlar. Ticari starter kültürler, işletme kültürünün hazırlanması (normal) veya direk üretimde (konsantre) kullanılabilecek şekilde dondurulmuş veya liyofilize kültür olarak üretilmektedir. Bu kültürler, genellikle birden fazla tanımlı LAB türlerinin karışımı olarak hazırlanmakta ve performans karakteristikleri (asit üretim, tat-aroma üretimi gibi) ile ilgili işletmelere bilgi sunulmakta, ancak suş bazında kültürün bileşimi sadece üretici firma tarafından bilinmektedir (Üçüncü, 2005).

Ülkemizde direk üretimde kullanılan ticari DSS kültürleri (konsantre liyofilize veya konsantre dondurulmuş kültürler), süt işletmelerinde fermente süt ürünlerinin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Böylece, işletmelerde aktif işletme kültürünün hazırlanmasına gerek kalmamaktadır. Konsantre DSS kültürlerinin üretiminde, dondurma veya liyofilize edilmelerinden dolayı, Ar-Ge çalışmaları için daha fazla yatırıma ihtiyaç duyulmakta ve bu nedenle çoğaltılmalı kültürlerle oranla pahalıdırlar.

2.1.4. Laktik asit bakterilerinin izolasyon ve tanımlanması

2.1.4.1. Fenotipik ve biyokimyasal testlerle tanımlama

Mikroskopta incelendiğinde hücrenin boyutları (eni, boyu, çapı) arasında, kültür koşullarına göre değişkenlik gösterebilen boyuna oranla bakteri çapı daha stabil bir değer göstermektedir. Bu nedenle bir kültürün saflığını değerlendirmeye

yarayan ilk değer, bakterilerin çapına aittir. Laktik asit bakterilerinin cins ve türe göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere 3 farklı morfolojik görünimleri vardır (Kılıç, 2001).

Laktik asit bakterilerinin taksonomik farklılaşmasında, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin kolayca saptanabilmesi ve endüstriyel uygulamalarda çok önemli olduklarının ortaya konulmasının rolü büyüktür. Laktik asit bakteri türlerinin izolasyonu ve sayımı selektif besiyerleri aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Uygun selektif besiyerinden saf kültür olarak izole edilen bakterilerin daha sonra klasik yöntemlerle Gram reaksiyonu, mikroskopik morfolojisi ve katalaz aktiviteleri belirlenmektedir. Yapılan testler sonucunda spor oluşturmayan çubuk/kok şeklinde, Gram-pozitif ve katalaz-negatif olarak değerlendirilen izolatlar laktik asit bakterisi olarak ayrılmaktadır (Schillinger ve Lücke, 1987).

Bakteri suşlarının cins düzeyinde tanımlanmasında, bakterilerin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilmeleri, karbonhidratları fermente edebilme durumları, oksijene karşı toleransı, besin ihtiyacı, antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ve boya maddeleri ile verdiği reaksiyonlar gibi fenotipik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler çoğu zaman bakterilerin sınıflandırmasında karışıklığa neden olmakta ve bakterilerin alttür ve suş düzeyinde tanımlanmalarında yeterli görülmemekte antibiyotik dirençliği, faj içeriği, hücre duvarı bileşiminin tanımlanması, hücre proteinlerinin molekül ağırlıklarının karşılaştırılması, laktat dehidrogenaz gibi enzimlerin elektroforetik teknikler ile belirlenmesi gibi yöntemler de kullanılmaktadır (Coeuret ve ark., 2003).

2.1.4.2. Moleküler yöntemlerle tanımlama

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve fenotipik metotlar hem uzun sürmekte, hem de çoğu zaman sınıflandırmada yetersiz kalmaktadır. Sınıflandırmanın esas amacı, türlerin alt gruplarını tekrar üretilebilir uygun belirteçler (marker) kullanarak tanımlamaktır. Son yıllarda geliştirilen bazı moleküler tekniklerin bakteri türlerinin sınıflandırılmasında

kullanılabileceği belirlenmiştir (Giraffa ve Rossetti, 2004). Aynı türe ait farklı suşların birbirlerinden ayrıştırılması ve tanımlanmasında, SDS-PAGE, spesifik problemler ile DNA hibritasyonu, Randomly Amplified Polymorphic-PCR (RAPD-PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve 16S-23S rDNA sekans dizi analizi gibi modern moleküler tekniklerden yararlanılmaktadır (Giraffa ve ark., 2000; Sofu, 2017). Bu yöntemlerden sadece bir tanesini kullanarak bakteri izolatları cins, tür, alt tür ve suş düzeyinde ve yüksek duyarlılıkta tanımlanmaktadır. Her yöntemin uygulama kolaylığı, tekrar edilebilirlik, ekipman gereksinimi ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri açısından avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Bir bakteri suşu, aynı koşullar altında gelişimini sürdürmesi durumunda aynı proteinleri üretmektedir. Tam-hücre (whole-cell) proteinlerinin SDS-PAGE yöntemiyle ayrıştırılması, tanımlamada kullanılan protein parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Bu teknik basit ve ucuz olması nedeni ile laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (De Angelis ve ark., 2001; Hebert ve ark., 2000).

PCR (Polymerase Chain Reaction), klasik tanımlama yöntemlerinin yanı sıra bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla yaygın olarak başvurulmuş bir tekniktir. Bu teknik ile klonlamaya gerek kalmaksızın hedef DNA'nın in vitro ortamda enzim yardımıyla çoğaltılması sağlanmakta ve 3-5 saatte yaklaşık 20.000 baza kadar olan spesifik genlerin 300 milyon kadar kopyası amplifikasyon sonucu sentezlenmektedir. PCR tekniği, denatürasyon (Çift iplikçikli çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklık derecesinde tekli iplikçiklere ayrılması), hibridizasyon (annealing, primerlerin uygun sıcaklıkta kaynak DNA'ya bağlanması) ve amplifikasyon (extension, DNA polimeraz (Taq, Pfu, Vent, Tth) ile primerlerden itibaren zincirin uzaması) aşamalarından oluşmaktadır. Bu teknik, denatürasyon sonucu birbirinden ayrılmış olan DNA örnekleri 15-30 baz uzunluğunda iki oligonükleotid primerleri (sentetik primerler), yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq DNA polimeraz I enzimi ve dört tür dNTP'nin görev alması sonucu gerçekleşmektedir. Bu enzim polimerleşmeyi 70-

85 °C arasında yapmaktadır. PCR ile uygun şartlarda saniyede 75 nükleotid sentezlemektedir. Çift sarmallı DNA, 90-95 °C’ de 2-3 dakika ısıtılarak birbirinden ayrılmakta, ayrılan herbir iplikçiğin 3’ uçlarına oligonükleotidler (DNA iplikçiklerine eş bazlardan oluşan kısa tek iplikçikli DNA parçası) bağlanmaktadır. Bu bağlanma 45-55 °C arasında gerçekleşmekte ve primer yapısındaki G ve C baz sayısındaki artışa bağlı olarak sıcaklık artışı yapılmaktadır. DNA polimeraz enzimi ortamdaki dNTP’ leri kullanarak 70-75 °C’ de polimerizasyonu tamamlamaktadır. Polimerizasyon 5’→3’ yönünde gerçekleşmektedir (Dilsiz, 2009).

PCR ile çoğaltılan DNA segmenti bundan sonra bir reaksiyon enzimi ile kesilmekte, oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanmakta ve ultraviyole ışık üzerinde incelenmektedir. DNA bantları, DNA’ nın etidyum bromid ile oluşturduğu floresans özelliğine bağlı olarak siyah zemin üzerinde beyaz bantlar halinde görünmektedir (Dilsiz, 2009; Somma ve Querci, 1998).

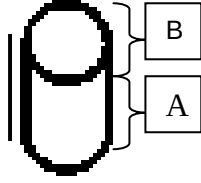
2.1.4.3. API kiti ile tanımlama

Mikroorganizmaların genel grup profillerine göre hazırlanmış çeşitli sayıda klasik biyokimyasal testten oluşan kullanıma hazır API 50 CH, API 20 Strep, LRA Zym ve API AZM gibi enzimatik kitler, saf kültürlerin karbonhidratları fermente edebilme özelliklerinden faydalanılarak, laktik asit bakteri izolatlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Test kitinden alınan sonuçlar, veri tabanında yer alan bakteri türleri ile tanımlanmaktadır (Coeuret ve ark., 2003).

API kitleri ile yapılan tanımlama prosedürü aşağıda özetlenmiştir.

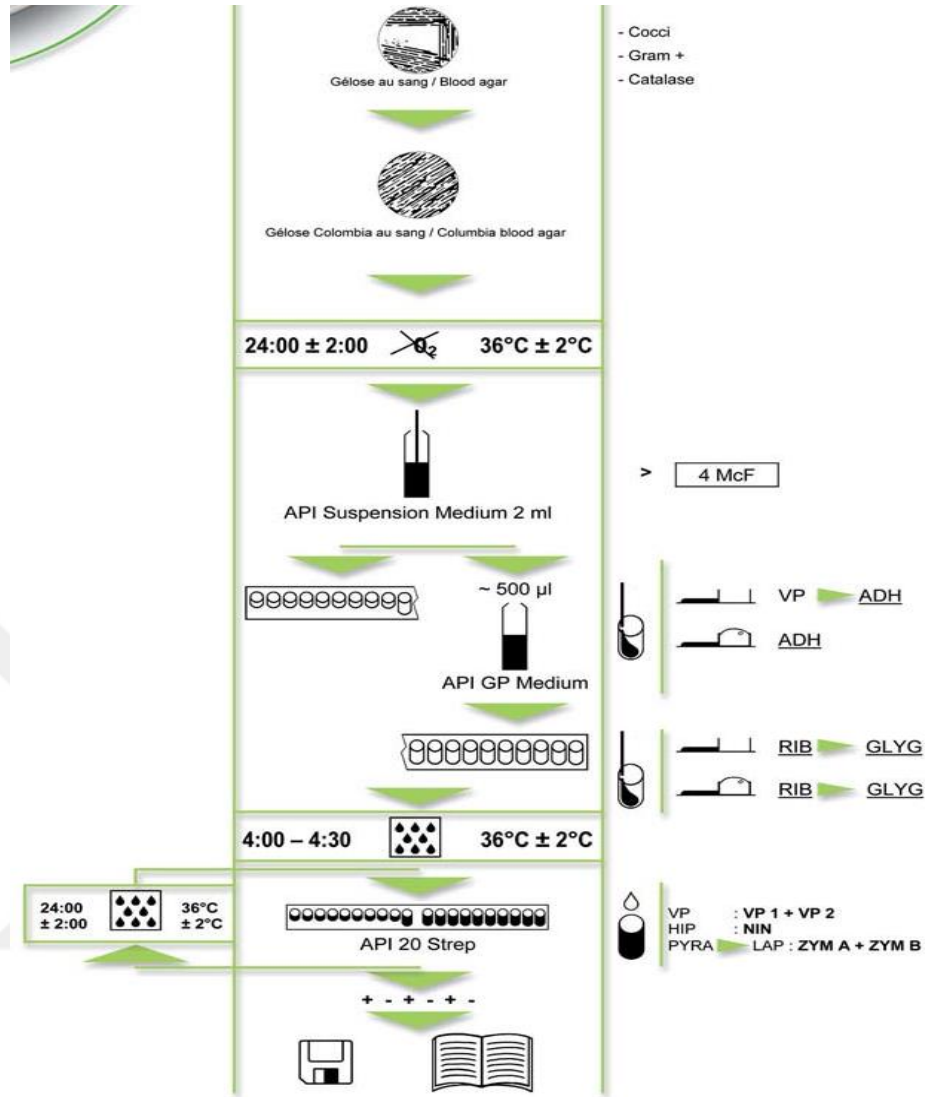
- Saf bakteri kültürü steril tuzlu su veya distile su ile karıştırılarak bakteri süspansiyonu hazırlanmaktadır.
- Bakteri süspansiyonunun prosedürde belirtilen yoğunlukta yani McFarland yoğunluğunda olmasına dikkat edilmektedir.
- Hazırlanan süspansiyon stripteki kuyulara dağıtılmaktadır.
- Altı çizili olan kuyuların üzerine 2 damla mineral yağ damlatılmaktadır (Örneğin ADH kuyusu altı çizili olduğunda bunun üzeri mineral yağ ile kaplanmalıdır)

- NIT şeklinde kuyuların tamamı bakteri süspansiyonu ile doldurulmaktadır.



Şekil 2.1. API kuyusu

- ✓ Normalde API kuyuları A bölümüne kadar süspansiyon ile doldurulmaktadır.
 - ✓ Eğer ilgili kuyunun altı çizili (Ör: ADH) ise A bölümü bakteri süspansiyonu ile B bölümü de mineral yağ ile doldurulmaktadır.
 - ✓ Eğer ilgili kuyunun altı NIT şeklinde ise A ve B bölümleri bakteri süspansiyonu ile doldurulmaktadır.
- Bakteri ile ekimi yapılan strip inkübasyona (24 saat) alınmakta ve bu süre sonunda değerlendirme tablosuna göre değerlendirilmektedir.
 - Sonuçlar API WEB' e girilerek bakteri tanımlanması yapılmaktadır



Şekil 2.2. API 20 STREP testi için yapılan işlemler (Anonim, 2018)

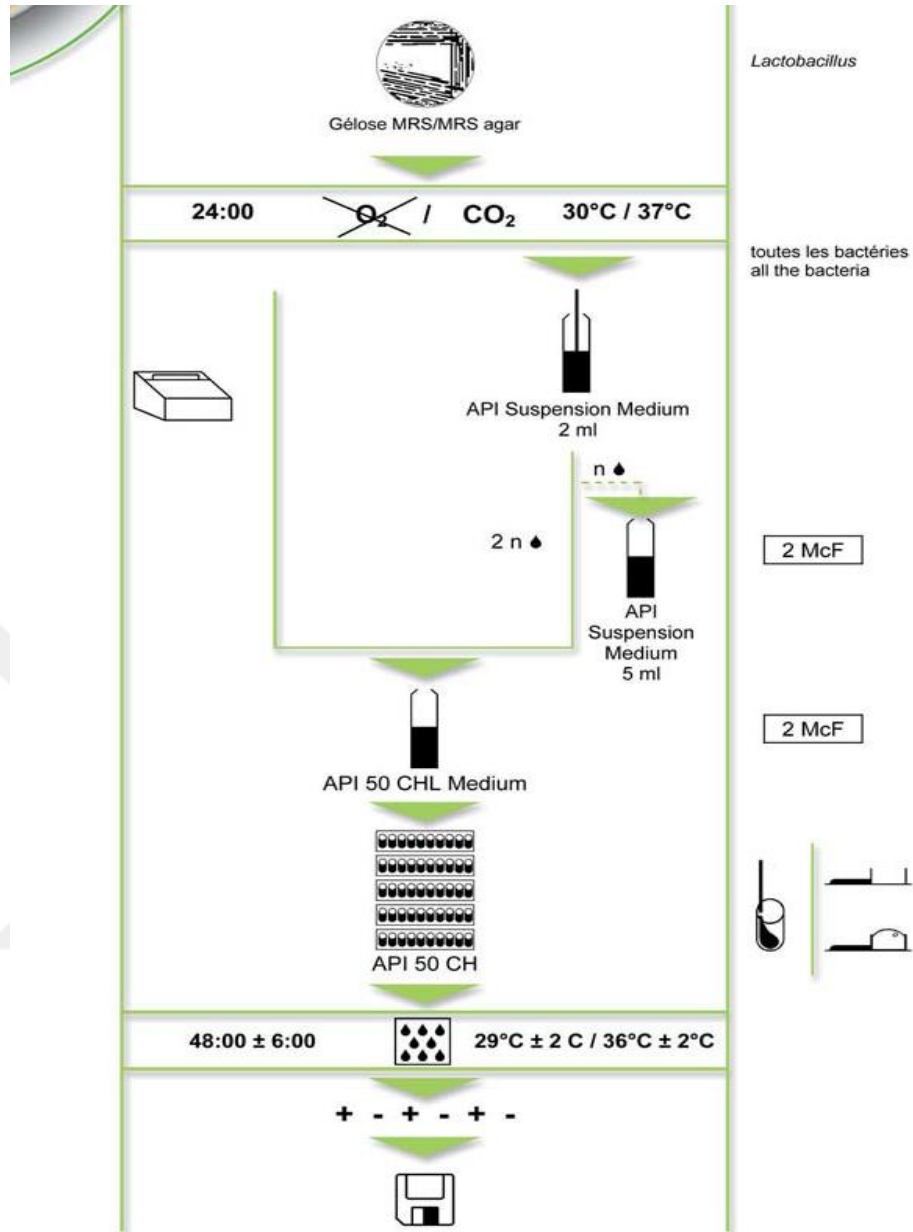


Negatif test

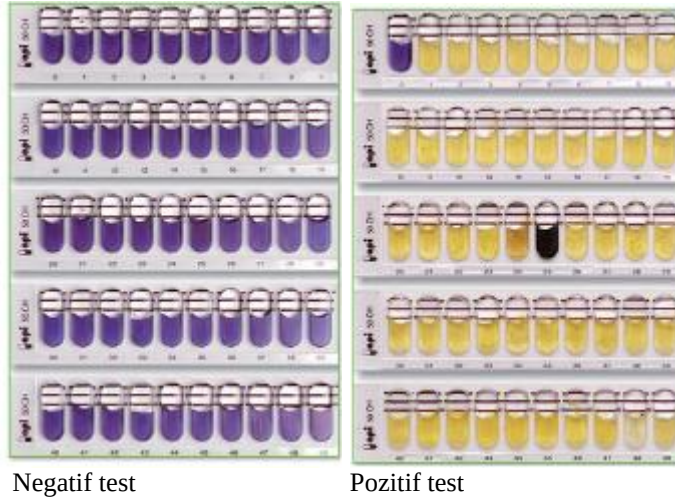


Pozitif test

Şekil 2.3. API 20 Strep testi



Şekil 2.4. API 50 CH testi için yapılan işlemler (Anonim, 2018)



Şekil 2.5. API 50CHL testi

Prensip olarak API stribi, şekerlerin enzimatik aktivitesi ya da fermentasyonunun belirlenmesi için dehidrate substratlar içeren mikrotüplerden oluşmaktadır (Şekil 2.3 ve 2.5). Enzimatik testler, substratları yeniden hidrate etmek için kullanılan saf kültürden yapılmış yoğun organizma süspansiyonu ile inoküle edilmektedir. İnkübasyon periyodu sırasında ortaya çıkan metabolik son ürünler spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişiklikleri meydana gelmektedir. Reaksiyonlar, okuma tablosuna göre okunmakta, tanımlama ise analitik profil indeksi ya da bilgisayar tanımlama programı kullanılarak yapılmaktadır (Anonim, 2018).

2.1.5. Laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özellikleri

2.1.5.1. Asit oluşturma kapasitesi

LAB'i, glukozu yalnızca laktik asit veya bunun yanında diğer ürünlere fermente edebilme özelliklerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olarak 2 ana gruba ayrılmaktadır. Homofermentatif LAB, karbohidratları fruktozdifosfat (FDP) yolu ile fermente ederek (%90) laktik asit üretmektedirler. Heterofermentatif LAB ise, FDP yolunun önemli enzimlerinden aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz enzimine sahip olmadıklarından FDP yolunu kullanamamaktadır. Dolayısıyla bu

bakteriler tarafından glukozun yıkımı, pentozfosfat (PP) yolu ile olmakta ve sonuçta laktik asit ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol/asetik asit ve karbondioksit üretilmektedir (Kılıç, 2001; Cogan ve Accolas, 1996).

Laktik asit bakterileri karbonhidratı metaboliz ederek laktik asit üretmeleri sonucu pH' da azalmaya neden olurlar. Ortamın asitliğinde düşüş olur, peynirin tat, aroma ve yapısında önemli değişimlere meydana gelmektedir. Bundan dolayı laktik asit bakterilerinin asit oluşturma kapasiteleri fermente süt ürünlerinin tat-aroma tekstürünün oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Çon ve Gökalp, 1994).

2.1.5.2. Antimikrobiyal maddeler

2.1.5.2.1. Hidrojen peroksit

Bazı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri, H_2O_2 üretimlerine dayandırılmaktadır. Ancak bu etkinin organik asitler ve diğer metabolitlerin kombinasyonu ile sağlandığı ifade edilmektedir (Çon ve Gökalp, 1994). H_2O_2 yalnız başına antimikrobiyal aktivite gösterdiği gibi, çiğ sütte doğal olarak oluşan ve aynı zamanda inhibitör bir sistem olan laktoperoksidaz sisteminde de fonksiyon göstermektedir (Davidson ve Hoover, 1993). Bu sistemin oluşmasında, laktoperoksidaz, tiyosiyanat ve H_2O_2 olmak üzere 3 temel bileşen bulunmaktadır. Gram negatif psikrotroflar üzerine oldukça etkili olan bu sistemin, yeterli aktivite gösterebilmesi için 0.5-1.0 ppm laktoperoksidaz, 100 U/mL H_2O_2 ve 0.25mM tiyosiyanat'a ihtiyaç duyulmaktadır. Sütte normal olarak 30 ppm laktoperoksidaz, 1-2 U/mL H_2O_2 ve 0.02-0.25 mM tiyosiyanat bulunmaktadır (Jay, 1992). Bu sistemde rol alan H_2O_2 'nin kaynağı da glukoz oksidaz enzim sistemine sahip olan LAB'dir. Gıda maddelerine H_2O_2 ilavesi, arzu edilmeyen birçok mikroorganizmanın inaktivasyonu için basit ve etkili bir metoddur (Banwart, 1989). Mikroorganizmalar üzerine H_2O_2 'nin inhibitör etkisi, konsantrasyon ve muamele süresi ile mikrobiyal yük, sıcaklık, pH, inorganik iyonlar, UV veya diğer koruyucularla mikroorganizmaların muamele edilmiş olması gibi faktörlerden etkilenmektedir. Reaktif kapasitesinin yüksek oluşu ve hidroksil radikali (OH) gibi sitotoksik oksijen

türleri meydana getirmesinden dolayı, H₂O₂ çok güçlü bir oksidanttır (Juven ve ark., 1992).

2.1.5.2.2. Bakteriosinler

Bakteriosinler, LAB tarafından üretilen yakın akraba türler üzerine etkili olan ve protein/peptid yapısında, hassas hücrelerdeki reseptörlere bağlanan ve üretimi büyük oranda plazmid DNA tarafından kodlanan antimikrobiyal metabolitlerdir (Okereke ve Motville, 1991).

Çizelge 2.2. Bakteriosin üreten bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriosinler ve etki spektrumları

Bakteriosin organizma	üretici	Üretilen bakteriosin	Etki spektrumu
<i>Lb. acidophilus</i>		Lactocin B	<i>Lactobacillus</i> sp.
		Lactocin F	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp.
<i>Lb. helveticus</i>		Helveticin J	<i>Lactobacillus</i> sp.
		Lactocin 27	<i>Lactobacillus</i> sp.
<i>Lb. plantarum</i>		Plantaricin A	Laktik asit bakterileri
		Lactocin B	Laktik asit bakterileri, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> sporları
<i>Lb. sake</i>		Sakacin A	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
		Lactocin S	Laktik asit bakterileri
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>		Nisin	Gram pozitif bakteriler
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>		Nisin	Gram pozitif bakteriler
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>		Diplococcin	<i>Lactococcus</i> sp.
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> Cit+ <i>Lactococci</i>		DLactostrepcins	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp.
<i>Ped. acidilactici</i>		Pediocin PA-1	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>
		Pediocin AcH	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>L. monocytogenes</i>
<i>Ped. pentosaceus</i>		Pediocin AcH	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. botulinum</i>

Bakteriyosinler, üretici suş dışında, bakteriler üzerinde bakteriyosidal ve bakteriyostatik etki göstermektedirler. Laktik asit bakterilerinin tüm cinslerinde bakteriosin üretiminin tespit edildiği, özellikle *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından bu metabolitlerin üretimi yaygın olduğu bildirilmektedir

(Davidson ve Hoover, 1993). Bu bağlamda, bakteriosin üreten bazı LAB türleri, ürettikleri bakteriosinler ve etki spektrumları Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Gıdalarda doğal olarak bulunan veya starter kültür olarak ilave edilen bazı laktik asit bakterilerinin kendileri dışında saprofit ve patojen bakteriler başta olmak üzere mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite göstermektedirler (Çon ve Gökalp, 1994).

2.1.5.2.3. Diğer antimikrobiyal bileşenler

Diasetil: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinsi bakterilerin bazı tür ve suşları tarafından üretilmektedir. Diasetilin, 170 ppm üzerindeki konsantrasyonda inhibitör etki gösterdiği, starter kültür ilave edilerek üretilen fermente gıdalardaki diasetil seviyesinin genellikle bu değerden çok daha düşük olduğu, bu nedenle diasetil bileşiğinin tek başına inhibitör etki göstermediği, sentezlenen diğer metabolitler ile beraber inhibitör etkiye katkı sağlayabileceği ifade edilmektedir (Davidson ve Hoover, 1993).

Etil alkol: Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından karbonhidratların fermentasyonu sonucu diğer metabolitler ile birlikte alkol de sentezlenmektedir. Yaygın olarak kullanılan etil alkol orta düzeyde antimikrobiyal bir ajan olup vejetatif hücrelere karşı yıkıcı etkisi halen tartışmalı olmakla birlikte, genellikle patojen bakterilerin büyük çoğunluğuna karşı bakterisit etki göstermektedir (Çon ve Gökalp, 1994).

Karbondioksit: Heterofermentatif laktik asit bakterileri, karbonhidratların fermentasyonu sonucu laktik asit ve asetik asit/etil alkol gibi ürünlerin yanında CO₂ üretmektedirler (Çon ve Gökalp, 1994).

2.1.5.3. Ekzopolisakkarit üretimi

LAB birkaç farklı polisakkarit üretme yeteneğine sahiptir. Polisakkaritler, sitoplazmada karbon ve enerji kaynakları olarak, bakteri hücre duvarının bileşenleri

olarak veya hücrenin dış uzantıları olarak bulunabilir. Eksopolisakaridleri (EPS), hücrenin harici polisakkaritleridir ya serbest polisakkaritler olarak eklenir ya da atılırlar. LAB'den izole edilen EPS'yi açıklayan isimlendirme belirsizdir. Mukoid slime üreten, ve ropy, olarak tanımlanmışlar ve bileşimleri ve yapıları çok heterojendir. Birkaç benzerlik kompozisyon ve yapı gözlenmiştir, ancak çoğu fermente süt için kalın bir kıvam vermektir. Çeşitli *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* suşları Çevre koşulları tarafından belirlenen EPS, ropy ve mukoid formları en az iki ayrı fenotipik ifade ettiği gösterilmiştir. Ropy EPS üreten LAB suşları villi, langfil veya filmjolk denilen kalın fermente süt üretimi için İskandinav ülkelerinde kullanılmıştır. Günümüzde, EPS üreten LAB suşları, reolojik özellikleri geliştirmek, sinerezi önlemek ve stabilizatörlerin yerini almak için yoğurt, ekşi krema ve çırpılmış soslarda kullanılmaktadır. Tüketici doğal gıda talepleri sonucu, EPS son zamanlarda fırın dolgusu konserve gıdalar, kuru karışımlar, dondurulmuş gıdalar, soslar, gravyler, işlenmiş peynirler ve meyve suyu içecekler. gibi diğer gıda ürünlerinde kimyasal stabilizatörlerden ziyade doğal olarak potansiyelleri için daha yoğun olarak çalışılmaya başlandı (Knoshaug ve ark., 2000).

2.1.5.4. Proteolitik ve lipolitik aktivite

Proteolitik sistem sütte fermente ürünleri gelişim esnasında kazeini parçalayarak esansiyel aminoasitleri hücrelere sağlar ve fermente süt ürünlerinin organoleptik özelliklerinin gelişimi katkısından dolayı sanayide önemlidir. *Lactococcus lactis* kazein proteolizi için Proteoliz, transport, peptidoliz ve bunların regülasyonu için en yaygın olarak çalışılan LAB örneğidir. Hücrelerin besin işlemine ek olarak polipeptitte hücrel proteoliz düzenleyici proteinlerin temel düzeylerini düşük tutmak ve artık ihtiyaç duyulmadıklarında onları kaldırarak kalite kontrol ve birçok düzenleyici devrede kritik rol oynar. Endüstriyel süreçlerin bir parçası olarak LAB tarafından proteolizi içeren metabolik aktiviteleri etkileme olasılığı olan çeşitli stres koşullarına meydan okunur. LAB'nin çevresel stres cevaplarından dolayı son yıllarda bu bakterilere ilgi artmaktadır. LAB'de stresle ilişkili proteoliz hakkındaki mevcut bilgilerimiz hemen hemen sadece *L. lactis* üzerine yapılan çalışmalara dayanmaktadır (Savijoki ve ark., 2006).

2.1.5.5. Tat-aroma bileşiklerinin üretimi

Laktik asit bakterilerinin önemli bir diğer özelliği, fermente süt ürünlerinde çeşitli aroma maddelerini sentezlemeleridir. Bu maddeler, üretim tekniklerine, olgunlaşma ve ürün özelliklerine bağlı olarak çeşitlilik gösterirler. Süt ürünlerinin karakteristik tat-aroması, ağırlıklı olarak mezofilik ve termofilik starter bakteriler tarafından sentezlenen laktik asit, asetik asit, formik asit, bütirik, piruvik, oksalik ve süksinik asit gibi uçucu/uçucu olmayan organik asitler ile asetaldehit, diasetil, aseton gibi karbonil bileşiklerinden kaynaklanmaktadır (Tamime ve Robinson, 2007).

Ayrıca, birçok laktik asit bakterisi amino asitlerden aroma bileşenlerini sentezleme yeteneğine sahiptirler. Örneğin, *Lc. lactis* subsp. *lactic*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lb. casei* bakterileri, metiyoninden metanetiyo, dimetilsülfid ve dimetiltrisülfid oluşturma yeteneğine sahiptirler. Peynir teknolojisi açısından aroma oluşumunu destekleyen en önemli metabolik yol sitrat metabolizmasıdır. Laktik asit bakterilerinin sitrat metabolizması zayıf olmakla birlikte, özellikle bazı mezofilik laktik asit bakterilerinin sitrat metabolizması süt ürünlerinde tat-aroma oluşumunda birincil öneme sahiptir. Sitrat, ağırlıklı olarak *Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. gibi mezofilik bakteriler tarafından metabolize edilmekte ve çeşitli tat-aroma bileşikleri sentezlenmektedir. Bu bağlamda, Cit (+) *Lactococci* ve *Leuconostoc* türlerinin sitratı metabolize etme yetenekleri, sitrat permeaz enzimine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Fitzgerald ve Hill, 1996).

2.2. Literatür Özeti

Bu bölümde, laktik asit bakterilerinin izole edildiği geleneksel süt ürünleri, fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri ile bu bakterilerin fenotipik özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Grana Padano peynirinin üretiminden alınan peyniraltı suyundan üretilen termofilik PAS kültürü florasında dominant olarak *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Lb. fermentum* bakterileri tespit edilmiştir (Lazzi ve ark. 2004). Başka bir çalışmada, Grana Padano ve Parmigiano Reggiano gibi sert peynirlerin üretiminde kullanılan PAS kültür florasının *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. fermentum* ve *Str. thermophilus* içerdiği saptanmıştır (Giraffa ve ark. 1997). Parente ve ark. (1997) ise pasta-filata tipi peynirlerin üretiminde kullanılan doğal termofilik PAS kültürü florasından elde ettikleri 156 adet izolattan, basil şekilli olanlarının çoğunlukla *Lb. helveticus*; kok olanlarının ise *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinsi bakteriler olduğunu saptamışlardır.

Başka bir çalışmada ise, pasta-filata tipi Caciocavallo Pugliese peynirinin üretiminde kullanılan PAS kültür florasının *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *Lb. gasserri*, *Lb. helveticus* ve *Str. thermophilus* suşlarından oluştuğu tespit edilmiştir. İzole edilen bakteriler, sözkonusu peynirin üretiminde kullanılmış ve peynirin bileşim, mikrobiyal, biyokimyasal ve tekstürel özelliklerine etkisi araştırılmıştır (Gobbetti ve ark. 2002). Arjantin’de sert peynirlerin üretiminde kullanılan termofilik PAS kültürlerinin LAB florasının *Lb. helveticus* (%66–97.5), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (%2.5–33) ve *Str. thermophilus* (%0–1) bakterilerinden oluştuğu; asitlik ve proteolitik aktivitelerinin sırasıyla %1.20–1.70 laktik asit (LA) ve 20–230 µg tirozin/mL; %0.30–0.58 LA ve 0.0–17.0 µg tirozin/mL; %0.22–0.28 LA ve 0.0 µg tirozin/mL olarak hesaplandığı bildirilmiştir (Reinheimer ve ark. 1996). Koyun sütünden üretilen Pecorino Sardo peyniri ile söz konusu peynirin üretiminde kullanılan PAS kültürünün (*Scotta innesto*, 42–45 °C’de 18–20 saat) LAB florasından elde edilen 453 adet izolatın *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* ve *Str.*

thermophilus, *Lb. casei* ve *Enterococci* türü bakterilerden oluştuğu tespit edilmiştir (Mannu ve ark. 2002).

Termofilik MSS kültürleri, İtalya (*colture naturali in siero*), İsviçre (*rohmschkulturen*) ve Fransa'da, mezofilik MSS kültürleri ise daha çok İskandinav ülkeleri, Almanya ve İtalya'da çeşitli peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır (Accolas ve Auclair, 1983; Parente ve Cogan, 2004). İsviçre ve İtalyan tipi peynirlerin üretiminde kullanılan termofilik MSS kültürlerinin *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. helveticus* gibi termofilik LAB'den oluştuğu bildirilmiştir. Gouda peynirinin üretiminde kullanılan mezofilik MSS kültür florasının kompleks olduğu ve bileşiminde *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, cit (+) *Lactococci* (*Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) ve *Leuconostoc* türlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Wouters ve ark. 2002).

Ertürkmen ve Öner (2015) yaptıkları bir çalışmada, laboratuvar şartlarında çiğ süttten üretilmiş 7 adet beyaz peynir örneğinden aldıkları toplam 145 LAB izolatlarından 25'nin *Lactococcus* spp., 22' nin *Enterococcus* spp. ve 30'nin ise *Lactobacillus* spp. olarak belirlemişlerdir.

Cogan ve ark. (1997) 35 adet geleneksel süt ürününden (24 adet geleneksel peynir, 6 adet doğal starter ve 2 adet fermente süt) elde ettikleri toplam 4379 adet izolatın identifikasyon ve karakterizasyonunu yaparak endüstriyel fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılabilecek LAB türlerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, izolatların %38'i *Lactococcus*, %17'si *Enterococcus*, %14'ü *Str. thermophilus*, %12'si mezofilik *Lactobacillus*, %10'u *Leuconostoc* ve %9'unun ise termofilik *Lactobacillus* cinsi LAB olduğunu saptamışlar ve test edilen 1582 adet *Lactococcus* ve 482 adet mezofilik *Lactobacillus* izolatının, sırasıyla sadece %8 ve %2'nin 30 °C'de 6 saatte süttün pH'sını <5.3'e düşürebildikleri; *Str. thermophilus*, termofilik *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsi bakterilerin ise sırasıyla, %53, %32 ve %13'ünün aynı şartlarda (30 °C, 6 saat) süttün pH'sını <5.3 değerine düşürdüklerini

belirlemişlerdir. Araştırmacılar, tanımlanan bazı LAB izolatlarının fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılabilecek potansiyelde olduklarını ifade etmişlerdir.

Mozzarella peynirinin üretiminde kullanılan PAS kültürü bileşiminin kompleks ve değişken olduğu, bileşiminde daha çok *Lactococcus* spp. ve termofilik *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. ile çeşitli mayaların bulunduğu bildirilmiştir (Addeo ve Coppola, 1983; Coppola ve ark. 1988; Oberg ve ark. 1991; Morea ve ark. 1998). Diğer bir çalışmada ise, Mozzarella peynirinin üretiminde kullanılan PAS kültürünün LAB florasında birçok termofilik *Streptococci* ve *Lactobacilli* türlerinin varlığı ortaya konmuştur (Coppola ve ark. 1988). Bu bakteriler, üretimi kontrol altına alınan Comte peyniri ile peynir üretiminde kullanılan PAS kültürünün florasında da tespit edilmiştir (Bouton ve ark. 1998).

Süt mikrobiyologları tescil edilen geleneksel peynirler ile bu peynirlerin üretiminde kullanılan doğal kültürlerin, LAB için önemli bir kaynak oldukları gerçeğinin farkına varmışlardır. Son yıllarda sözkonusu geleneksel teknolojilerle çiğ süttten yapılan geleneksel fermente süt ürünleri (Gomez ve ark. 1999; Çelik ve ark. 2005; Madrau ve ark. 2006; Torres-Llanez ve ark. 2006) ile çiğ süttten ve peyniraltı suyundan üretilen doğal kültürlerin (Coppola ve ark. 1988; Reinheimer ve ark. 1996; Cogan ve ark. 1997; Candioti ve ark. 2002; Gobbeti ve ark. 2002; Hynes ve ark. 2003; Perotti ve ark. 2005; Madrau ve ark. 2006) mikroflorasından izole ettikleri yabani LAB'ni karakterize etmiş ve peynir üretim denemelerinde kullanmışlardır. Bu amaçla, Reggiano Argentino peyniri üretiminde doğal PAS kültürü (kontrol) ve bu kültürün florasından elde edilen *Lb. helveticus* bakterisini içeren (deneme peyniri) farklı suş kombinasyonlarının serbest yağ asitleri profiline etkisi araştırılmıştır. Serbest yağ asidi profili açısından deneme peynirleri ile kontrol peynirleri arasında önemli farklılığın olmadığı (Perotti ve ark. 2005), starter kültür olarak *Lb. helveticus* suşlarının, doğal PAS kültürlerinin avantajlarını sağladığı, peynir yapımı ve olgunlaşmasında standardizasyonun sağlanması açısından da bu suşların önemli olduğu bildirilmiştir (Perotti ve ark. 2004). Başka bir çalışmada, sözkonusu peynirin üretiminde termofilik PAS kültürü (kontrol) ile farklı *Lb. helveticus* suşlarının kullanımının peynirin bileşiminde bir değişikliğe neden olmadığı, üretilen tüm

peynirlerin iyi kalitede olduğu; ancak kontrol ve deneme peynirlerinin aroma ve tekstür bakımından farklı olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda *Lb. helveticus* suşlarının, peynirin sekonder proteoliz düzeyini yükselttiği ve duyuşsal özelliklerini değiştirdiği tespit edilmiştir (Candioti ve ark. 2002).

Çiğ süt ile olgunlaşma periyodu boyunca geleneksel Pecorino Sardo peynirinin florasından *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinsi toplam 275 LAB izolatı elde edilmiştir. *Lc. lactis*, *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus* ve *Lb. casei* türlerine ait toplam 175 adet izolat tanımlanmış ve teknolojik özellikleri tespit edilmiştir. Bu bakteriler teknolojik özelliklerine göre bir araya getirilerek termize süttten yapılan sözkonusu peynirin üretiminde starter olarak kullanılmıştır. PAS kullanılarak pastörize süttten üretilen kontrol peynirlerine oranla, deneme peynirlerinde amino asit düzeyinin önemli düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir (Madrau ve ark. 2006). Diğer taraftan, geleneksel Fresco peynirinin dominant laktik florasının *Lc. lactis* ssp *lactis*, *E. faecium* ve *Lb. casei* bakterilerinden oluştuğu ve izole edilen bu bakteri suşlarının pastörize süttün kullanıldığı adı geçen peynirin üretiminde starter olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Torres-Llanez ve ark. 2006).

Çiğ koyun ve keçi süttü veya karışımlarından üretilen geleneksel Manura peynirinde olgunlaşma periyodu boyunca LAB'nin dominant florayı oluşturduğu, bunlardan *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*, *P. pentasaceus* ve *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* bakterilerinin olgun peynirde fazla sayıda bulunduğu ve tanımlanan bakterilerin Manura peynirinin üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Gerasi ve ark. 2003). Geleneksel Pecorino del Poro peyniri florasından alınan 225 adet izolat cins düzeyinde, 18 adet izolat ise tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tanımlanan bakterilerden *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ve *Lb. curvatus* bakterilerinin *E. coli* bakterisine karşı en iyi antagonistik aktivite gösterdiği ve *Lactobacillus* türü bakterilerin sözkonusu geleneksel peynirin hijyenik kalitesinin düzeltilmesi amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Caridi, 2003).

Çiğ keçi süttünden yapılan Tenerife peynirinin olgunlaşma periyodu boyunca mikrobiyal florasındaki değişim, Zarate ve ark. (1997) tarafından incelenmiştir.

Araştırmacılar, periyot boyunca peynir florasında *Lc. lactis* ssp. *lactis* (lactococci izolatlarının %78.9'u), *Lb. plantarum* (lactobacilli izolatlarının %56.9'u) ve *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (lactobacilli izolatlarının %37.2'si) bakterilerinin dominant olduğunu bildirmişlerdir. Peynir florasında, *Lc. lactis* ssp. *lactis* ve *Lb. plantarum* popülasyonunun olgunlaşma periyodu başlangıcında fazla olduğu ve periyot sonunda azaldığı, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* popülasyonunun ise tam tersi bir durum sergilediği ve periyodun 60. gününde dominant tür olduğu saptanmıştır. Ayrıca, *leuconostoc* olarak tanımlanan izolatların %81.8'nin *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* olduğu ve periyot sonunda azaldığı saptanmıştır.

Pisano ve ark. (2006) ise, sert yapıda olan geleneksel Fibre Sardo peynirinin olgunlaşma periyodu boyunca laktik florasının *Lc. lactis*, *E. faecium*, *Lb. plantarum* ve *Lb. casei* bakterilerinden oluştuğunu bildirmiştir.

Karacadağ yöresinde üretilen yarı-sert geleneksel Örgü peynirinin dominant laktik florasının *Lactobacillus* (%40) ve *Enterococcus* (%38.87) cinsi bakterilerden oluştuğu bildirilmiştir. Peynir florasında tür bazında, *Lb. curvatus*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. hirae*, *Lc. lactis* (%9.81) ve *Ped. acetilactici* (%3.40) tespit edilmiştir. Ayrıca, laktik asit üretim kapasitesi ve antagonistik özellikleri saptanan termofilik ve homolaktik *Lactobacillus* cinsi bakterilerin pastörize sütün kullanıldığı peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmalarının söz konusu olabileceği ifade edilmiştir (Çelik ve ark. 2005).

Üretim teknolojisi bakımından geleneksel Örgü ve Dil peynirlerimizle benzerlik gösteren Mozzarella peyniri, ürünün karakteristiklerinin korunması amacıyla yasayla koruma altına alınan bir peynir çeşididir. Bu peynir İtalya'da, yaygın bir şekilde endüstriyel boyutta üretilmektedir. Birçok işletme bu peynirin üretiminde geleneksel teknolojiyi kullanmaktadır. Bu peynirin endüstriyel üretiminde pastörize süt ve starter olarak doğal PAS kültürü veya *Str. thermophilus* ve *Lb. helveticus* karışımından oluşan ticari DSS kültürlerinin kullanılması zorunludur

(Addeo ve Coppola, 1983; Coppola ve ark., 1988; Oberg ve ark., 1991; Morea ve ark., 1998).

Uysal (2008) yapmış olduğu çalışmada çiğ, termize ve pastörize süt kullanarak ürettiği deneme Dil peynirini salamurada $10\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 90 gün süreyle olgunlaştırarak termofilik PAS kültürünün Dil peynirinin üretimine uygunluğunu araştırmıştır. Araştırmacı, termofilik PAS kültürü kullanılarak termize ve pastörize süttten üretilen Dil peynirleri ile çiğ süttten yapılan peynirler arasında bileşim, biyokimyasal ve duyuusal parametreler açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılığın tespit edilmediği, tüketici sağlığı ve gıda güvenliği açısından çiğ süttten üretilen Dil peynirinin olgunlaşma periyodunun 90. gününde dahi risk taşıdığı, buna karşın termize süttten yapılan peynirin periyodunu 60. gününde, pastörize süttten üretilen peynirin ise 30. günde, güvenilir olduğu ve risk taşımadığını bildirmiştir.

Günümüzde laktik asit bakterilerinin tanımlanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE (Collins ve ark., 1991), 16S rRNA sekans analizleri (Zhong ve ark., 1998), pulsed-field elektroforez (Tenover ve ark., 1995) tekniklerinin uygulanmasında iş yükünün çok fazla, çözünürlük güçlerinin ise sınırlı olduğu, yorumlanmasında zorluklarla karşılaşıldığı, bu tekniklerin uygulanmasının uzun zaman aldığı veya türe özel metodların uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Ancak PCR temelli moleküler tekniklerin kullanımının hızlı ve spesifik olması nedeniyle, bakterilerin tanımlanması amacıyla uygulanan PCR protokollerinin değeri giderek artmaya başladığı bilinmektedir. (De Urraza ve ark., 2000). Bu metotlardan RAPD-PCR, laktik asit bakterilerinin tür ve suş düzeyinde tanımlanması (Conconcelli ve ark., 1997; Drake ve ark., 1996; Quiberoni ve ark., 1998) ve sınıflandırılmasında (Tailliez ve ark. 1998) kullanılmaktadır.

RAPD-PCR tekniğinde bakteri suşlarının karakterizasyonu için birden fazla primer kullanılmaktadır. Bu tekniğin kullanımında örneğin düşük bağlanma (annealing) sıcaklığı gibi spesifik olmayan çoğaltma şartları kullanıldığı ve bunun sonucu olarak az miktarda DNA parçacıkların çoğaldığından dolayı başka PCR yöntemlerinin kullanımına eğilim artmıştır. Bunlardan, genomik tekrarlamalı

elementlerin sekansları ile uygunluk arzetmek üzere geliştirilen oligonükleotidleri (primer olarak) kullanan PCR teknikleri geliştirilmiştir. Bu oligonükleotidler, ERIC (enterobakterial repetetive intergenic concensus), REP (repetetive extragenic palindromic), BOX ve GTG₅ olarak bilinmektedir (Versalovic ve ark., 1994). Bu yöntemin, yüksek tanımlayıcı kapasiteye sahip olduğu, düşük maliyetli, birçok bakteri türü için uygun olduğu ve bir çok Gram pozitif bakteri ve Gram negatif bakterilerin sınıflandırma ve tiplendirilmesi için uygun olduğu ve başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (De Bruijn, 1992; Woods ve ark., 1992; Versalovic ve ark., 1994; Georghiou ve ark., 1995; Herman ve ark., 1998; Jersek ve ark., 1999; Olive ve Bean, 1999; De Urraza ve ark., 2000; Gevers ve ark., 2001; Masco ve ark., 2003; Krizova ve ark., 2008; Adıgüzel ve Atasever, 2009; Mohammed ve ark., 2009).

Bu bağlamda, De Urraza ve ark. (2000) *Str. pneumoniae* genomunda bulunan tekrarlamalı elementlerden oluşan bir primer kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu (BOX-PCR) sonucu laktik asit bakterilerinin DNA parmak izlerini üretmişlerdir. Araştırmacılar, bu metot ile yoğurt, endüstriyel starterler ve çiğ süttten izole ettikleri 37 izolatın tanımlamasını başarmış ve *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Str. thermophilus* için tür, alttür ve suş düzeyinden ayrışımı gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak, reaksiyon ortamında sadece BOXA1R primeri bulunması sonucu *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Str. thermophilus* suşlarının ayrışımı ile taksonomik karakterizasyonunun mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı primerlerin (REP1R-I, REP2-I, BOXA1R ve GTG₅) tekrarlamalı bakteriyal DNA elementlerinin parmak izlerinin PCR ile çoğaltıldığı çalışmada, diğer primerlere oranla GTG₅ primeri kullanılarak 26 adet *Lactobacillus* izolatının tür, alttür ve suş düzeyinde ayrışımının etkin bir şekilde yapılabildiği, bu nedenle GTG₅-PCR metodunun fermente gıda endüstrisinde önemli olan *Lactobacillus* ve diğer laktik asit bakterilerinin tiplendirilmesi, hızlı ve doğru sınıflandırılması için gelecek vadede genotipik bir araç olduğu bildirilmiştir (Gevers ve ark., 2001).

Başka bir çalışmada, *Bifidobacterium* türlerinin identifikasyonu amacıyla farklı primerler (BOX, ERIC, GTG₅ ve REP) kullanılarak yapılan rep-PCR yönteminde, BOXA1R primeri kullanılarak yapılan rep-PCR yönteminin 80 adet *Bifidobacterium* izolatu ile referans suşun taksonomik karakterizasyonu için en iyi sonuç verdiği, dolayısıyla BOXA1R primeri kullanılarak yapılan rep-PCR parmak izinin geniş bir aralıkta *Bifidobacterium* izolatlarının tür, alttür ve suş düzeyinde tanımlanması için en uygun yöntem olduğu bildirilmiştir (Masco ve ark., 2003).

Bifidobacterium türlerinin tanımlanmasında RAPD-PCR (7 farklı primer) ve rep-PCR (BOXA1R veya GTG₅) yöntemlerinin başarıyla kullanıldığı ve benzer sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (Krizova ve ark., 2008). *Lb. hilgardii* bakterisinin moleküler tanımlaması ile bu bakterinin *Lb. brevis* ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, RAPD-PCR ve rep-PCR yöntemlerinin sözkonusu bakterilerin tanımlanması ve akrabalık ilişkilerinin ortaya konmasında fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerden daha hızlı, etkin ve verimli sonuç verdikleri bildirilmiştir (Sohier ve ark., 1999).

Adıgüzel ve Atasever (2009) sucuktan izole ettikleri toplam 46 adet laktik asit bakteri izolatını fenotipik ve genotipik olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar, fenotipik karakterizasyon için morfoloji, fizyolojik testler ile API sistemini, genotipik identifikasyon amacıyla BOXA1R primeri kullanarak rep-PCR metodunu kullanmışlardır. Yapılan çalışmada, sucuk florasından elde ettikleri izolatların *Lb. plantarum*, *Ped. pentosaceus*, *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Weissella viridencens*, *W. confusa*, *L. collinoides*, *Leu. mesenteroides* ssp. *menteroides* ve *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* olduğunu bildirmişlerdir.

Mohammed ve ark. (2009) çiğ süt ile geleneksel süt ürünlerinden elde ettikleri toplam 170 adet izolatı Rep-PCR yöntemi kullanılarak tanımlamış ve tanımlanan bu izolatların otolitik, aminopeptidaz ve antagonistik aktiviteleri ile asit oluşturma kapasiteleri ve eksopolisakkarit üretimlerini test etmişlerdir. Elde edilen izolatların, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*, *E. faecium*, *Lb. delbrueckii* subsp.

bulgaricus, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* bakterilerinin baskın tür olduklarını bildirmişlerdir. *Lactococcus* türlerinden %2'si, *Lactobacillus* türlerinden %10'u ve *Enterococcus* türlerinden %1'i hızlı asitlik oluşturma aktivitesi göstermişlerdir. Diğer türlere oranla, *Lactobacillus* türlerinin aminopeptidaz ve otolitik özelliklerinin daha yüksek, bunların içinde *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* bakterisinin aminopeptidaz ve otolitik aktivitesinin en yüksek olduğu, *Lactococcus* (%40), *Lactobacillus* (%70) ve *Enterococcus* (%50) izolatlarında antagonistik aktivite tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, BOXA1R primeri kullanılarak uygulanan rep-PCR yönteminin geleneksel süt ürünlerinden izole edilen yerli laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve taksonomik karakterizasyonu için yeterli olduğunu, fenotipik tanımlamanın doğrulanması için bu yöntemin kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Cogan ve ark. (1997) İspanya piyasasından toplanan toplam 35 peynir örneğinden alınan izolatların %38'nin *Lactococcus*, %17'nin *Enterococcus*, %14'nün *Streptococcus thermophilus*, %12'nin mezofilik *Lactobacillus*, %10'nun *Leuconoctoc* ve %9'nun termofilik *Lactobacillus* olduğunu bildirmişlerdir.

Mannu ve ark. (1999) inek sütünden üretilen ve üretiminde starter kültür kullanılmayan Pecorino Sardo peynirlerinin mikroflorasında sadece *Enterococcus* ve *Lactococcus* türlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Gelsomino ve ark. (2001) enterekokların sütlere direkt hayvan veya insan dışkısı ya da kontamine su kaynakları, ekipmanlar veya depolama tanklarından bulaştığını, bu nedenle Cheddar peynirinin üretimi sırasında anılan kaynaklardan izole ettikleri *Enterococcus* türlerini tanımlamışlardır. Bu bağlamda sığırlardan izole edilen türler içinde *E. faecium* baskın iken; insan dışkısı, süt ve peynirlerde ise *E. casseliflavus* ve daha sonra da *E. faecalis*'in en sık izole edilen tür olduğunu bildirmişlerdir. Süt depolama tankları ve ekipmanlarda ise izole edilen türlerin sadece *E. casseliflavus* ve *E. faecalis* olduğunu belirtmişlerdir.

Erdoğrul ve Dığrak (2001) pastörize süttten üretilen 22 adet Beyaz peynir örneğinin tamamında *E. faecalis* tespit etmişlerdir. El-Din ve ark. (2002) ise *E. faecium* bakterisinin çiğ süt florasında dominant bakteri olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar peynirde bu bakterinin sık rastlanma nedeninin, bu bakterinin yüksek sıcaklık, tuz ve aside tolerans göstermesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Manopoulou ve ark. (2003) Feta peynirlerinden alınan 146 izolatın 29 tanesinin *E. faecium* olduğunu ve bu türlerin peynir üretiminden olgunlaşma sonuna kadar varlığını sürdürdüğünü tespit etmişlerdir. Savadago ve ark. (2004) PCR kullanarak fermente süt ürünlerinden aldıkları toplam 13 adet laktik asit bakteri izolatının çoğunlukla *Lactobacillus* spp. olduğunu belirtmişlerdir.

Saavedra ve ark. (2003) Arjantin’de geleneksel yöntemle üretilmiş Tafi peynirlerinden izole ettikleri *Enterococcus* türlerinin 122 tanesini *E. faecium* olarak tanımlamışlardır.

Öksüztepe ve ark. (2005) Şavak Tulum peynirinin olgunlaşması sırasında laktik asit bakterilerinin dağılımı ve identifikasyonu üzerine yapmış oldukları çalışmada, plastik bidonlarda 4 °C’de 90 gün süre ile olgunlaştırdıkları Tulum peyniri örneklerinde toplam 783 laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise farklı işletmelerde çiğ süttten üretilmiş 13 adet peynir örneğinden alınan izolatlar biyokimyasal, API ve FTIR spektroskopisi kullanılarak tanımlanmış ve tanımlanan LAB suşlarının starter kültür olarak değerlendirilmeleri araştırılmıştır. Bu izolatlardan 22 adet *Lactococcus* sp., 36 adet *Enterococcus* sp. ve 25 adet *Lactobacillus* sp. olmak üzere toplam 83 adet LAB suşunun asit oluşturma kapasitesi, proteolitik aktivite ve dekarboksilaz aktiviteleri araştırılarak, starter kültür bileşimlerinde yer alabilecekleri sonucuna varılmıştır (Turhan ve Öner, 2014).

Zamfir ve ark. (2005) geleneksel olarak fermente edilmiş (ham ve fermente süt, ekşi krema ve peynir) toplam 110 adet örnekten 6 farklı ekim koşulları kullanarak izole ettikleri 599 adet LAB izolata gram reaksiyonu, katalaz aktivitesi ve morfolojik olarak test etmişlerdir. LAB’ nin tanımlanması için (GTG)₅ primeri ile rep-PCR

teknîği ve 16S rRNA gen sekans analizini kullanmışlardır. Sonuçta, süt ürünleri florasından aldıkları laktik asit bakteri izolatlarının biyolojik farklılıklarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, florada en fazla *Lb. lactis*, *Leucanostoc* spp. ve *Enterococcus* spp. ve yeni bir tür olarak *Ent. saccharominimus* tanımlamışlardır.

Karakaş (2005) yapmış olduğu çalışmada çeşitli marketlerden temin ettiği 20 adet sucuk ve 30 adet peynir örneğinden izole ettiği, *Enterococcus* spp izolatlarının gram boyama, katalaz testi, 10 °C ve 45 °C sıcaklıkta gelişim ile glikozdan gaz üretimi gibi özellikleri belirlenerek, biyokimyasal özellikleri API 20 STREP test kiti ile tespit edilip tanımlamalarını yapmıştır. Sucuk ve peynir örneklerinden elde ettikleri izolatları *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium* olarak tanımlamıştır.

Erdoğrul ve Erbilir (2006) piyasadan temin ettikleri yoğurt, peynir ve tarhanadan LAB izolatlarını *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise, geleneksel yöntemle üretilen 40 adet yoğurt örneğinden alınan 55 adet LAB izolatu DNA sekans analizi moleküler yöntemlerle tanımlanmış sonuç olarak 50 adet izolatu *Lb. bulgaricus*, 1 izolatu *Lb. helveticus*, 1 izolatu *E. faecium*, 1 izolatu ise *Ped. acidilactici* olarak tanımlanmıştır (Demir ve ark., 2017).

Erkuş (2007) geleneksel yöntemle yapılmış olan doğal yoğurt örneklerinden starter kültürlerinin izolasyonu, biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlamıştır. Bu amaçla Anadolu’da geleneksel yöntemlerle yapılmış yoğurt örneklerinden moleküler karakterizasyon, ribosomal RNA genlerinin 16S-ITS (Internal Transcribed Spacer) bölümünün amplifikasyonu ve RFLP’lerinin (Restriction Fragment Length Polymorphism) karşılaştırılmasına dayanılarak tanımlama yapmıştır. Moleküler karakterizasyonda türe özgü PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve 16S dizileme analizleri doğrulama yapmıştır. Sonuç olarak toplam 66 kok ve 71 basil izolatu elde etmiştir. Biyokimyasal tanımlama sonuçlarına göre bütün basil izolatları *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* olarak belirlenmiştir. Kok izolatlarının 7 tanesi ise *Str. thermophilus* olarak tanımlanmıştır.

Caridi (2003) yapmış olduğu bir çalışmada Pecorino del poro peynirinden toplam 225 adet laktik asit bakterisini izole etmiş, tanımlamış ve en iyi 18 türün *E. coli*' ye karşı antagonistik aktivitesini araştırmıştır. *E. coli* bakterisinin gelişimine karşı en yoğun antagonistik aktiviteyi *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Lb. curvatus* izolatlarının gösterdiğini belirtmiştir. Araştırmacı, laktik asit bakterilerinin *E. coli* bakterisi üzerine inhibiyon etkisinin bakteriyosin benzeri bileşiklerin üretimine bağlamıştır. Laktobasillerin diğer geleneksel çiğ süttten üretilen peynirlerin hijyenik kalitesini geliştirebileceği kanaatine varmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, geleneksel Karın Kaymağı peynirinden elde edilen 107 adet izolatın API 50 CHL kiti kullanılarak tanımlanması yapılmıştır. Tanımlanan *Lactobacillus* suşlarının (82 adet); %47.56'nın *Lb. plantarum* tip 1 ve tip 2, %21.9'nun *Lb. brevis* tip 1 ve tip 3, %10.97'nin *Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii*, %9.75'nin *Lb. acidophilus* tip 3 ve %2.43'nün ise *Lb. fermentum* olduğu bildirilmiştir. Tanımlanan izolatlardan *Leu. mesenteroides ssp. mesenteroides/dextranicum* tip 2'nin ise (25 adet) floranın %24.4'nü oluşturduğu tespit edilmiştir (Turgut ve ark., 2012).

Ülkemizde ve dünyanın çeşitleri yerlerinde üretilen fermente gıdaların üretimi farklı olabilmekte ve çoğunlukla üretildikleri yöreye göre farklı isimlerle bilinmektedirler. Laktik asit bakterileri ise söz konusu fermente ürünlerin kalitesini ve niteliğini belirlemede önemli faktör olarak rol oynamaktadır (Erginkaya ve Hayaloğlu, 2001).

Fermente süt ürünleri arasında çeşitliliği en fazla olan ürün peynirdir. Bunlardan pasta filata tipi peynirler, Güney Avrupa, Türkiye, Balkanlar, Yunanistan ve İtalya gibi Kuzey Akdeniz ülkelerinde üretilen zengin bir peynir grubudur. Geleneksel olarak bu peynirler, manda, keçi, koyun ve inek sütlerinden üretilmektedir. Bunlardan yumuşak, yarı-yumuşak olanlar (taze Mozzarella, düşük nem içeren Mozzarella ve Scamorza) taze veya kısa süreli bir olgunlaştırma işleminden sonra tüketilmektedirler. Sert ve yarı-sert olanlar (Caciocavallo, Kaşkaval, Kaşar, Provolone Ragosano) ise uzun süreyle olgunlaştırıldıktan sonra

tüketime sunulmaktadırlar. Pasta filata terimi, uzatılmış telemeyi ifade etmekte olup plastikleştirme ve uzatma proseslerini içermektedir ki, bu durum tüm peynirlerin ortak özelliğidir (Kindstedt ve ark., 2004).

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde de geleneksel yöntemlerle Dil, Örgü, Lavaş ve Yaprak peynirleri gibi telemesi haşlanan (pasta-filata tipi) sert ve yarı-sert peynirler üretilmektedir. Bu peynirlerin üretim yöntemleri birbirleriyle örtüşmekte, ancak ürünün son şekli ve görünümü birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu peynirlerin üretiminde daha çok çiğ koyun sütü kullanılmakta ve telemeleri oda sıcaklığında fermente edilmektedir. Fermente teleme, sıcak suda haşlanarak porsiyonlara ayrılmakta ve kendilerine özgü şekil verilmektedir. Bu peynirler, taze veya salamurada olgunlaştırıldıktan sonra tüketilmektedirler (Kamber, 2005; Uysal, 2008; Özdemir ve ark., 1998; Çelik ve ark., 2005; Türkoğlu ve ark., 2003).

Yöresel peynirlerin üretiminde çoğunlukla çiğ süt kullanılmaktadır. Üretim aşamasında telemenin haşlanması amacıyla uygulanan yüksek sıcaklıkta patojen bakterilerin enfeksiyon riskinin tamamen elimine edilmediği; canlı kalabildikleri veya rekontaminasyon sonucu ortamdan haşlanan telemeye bulaşabildiği tespit edilmiştir (Özdemir ve ark. 1998; Türkoğlu ve ark. 2003). Dolayısıyla, tüketim sonrası çeşitli enfeksiyon ve intoksikasyonlar görülebilmektedir. Peynire geçen patojen bakterilerin olgunlaşma periyodunda da canlı kalabildikleri, periyot başlangıcında, fekal koliform ve *E. coli* sayısının oldukça yüksek olduğu (Elmalı ve Uylaşer, 2012; Caridi, 2003; Çelik ve ark., 2008), çiğ süttten üretilen Dil peynirinde depolamanın 90. gününde fekal koliform ve *E. coli* saptandığı bildirilmiştir (Çelik ve ark., 2008). Bu nedenle, pıhtısı ısıl işlem gören peynirlerin üretiminde de süttün pastörize edilmesi tüketici sağlığı açısından önem taşımaktadır. Çiğ süttten üretilen olgun peynirlerde, kompleks mikrobiyal floradan dolayı çeşitli metabolitler oluşarak ürünün karakteristik tat-aromasının oluşumunda etkin rol almaktadırlar. Ancak pastörizasyon sonucu, bu flora inaktive olmaktadır (Ayad ve ark. 2003; Ballesteros ve ark. 2006). Bu nedenle, pastörize süttten yapılan endüstriyel peynir üretimlerinde geleneksel peynirin karakteristik özelliklerinin oluşumunu sağlayacak uygun starter

kültür tipi geliştirilmesi amacıyla daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Starter kültür, fermentasyon sürecini hızlandırıp yönlendirerek istenen özelliklerde fermente gıda üretmek amacıyla hammaddeye katılan mikroorganizma kültürü olarak tanımlanabilir. Fermente gıda üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir (Demirgöl ve Sağdıç, 2018). Akdeniz ülkelerinde çeşitli peynirlerin üretiminde mezofilik ve termofilik karakterde geleneksel kültürler kullanılmaktadır. Bunlardan doğal kültürler, Mozzarella, Tilsit ve Ragusana peynirlerinin üretiminde, MSS kültürleri ise Cottage, Quarg, Cream, Camembert, Brie, Mozzarella, Roquefort, Stilton, Gouda, Edam, Emmentaler ve Sbrinz peynir tiplerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal peyniraltı suyu kültürleri, *siero-fermento* ve *siero-innesto* adlarıyla, doğal süt kültürleri ise *colture naturali in latte*, *latto-innesto* ve *latto-fermento* adlarıyla üretilmektedir (Limsowtin ve ark., 1996; Gobbetti ve ark. 2002; Parente ve Cogan, 2004).

Geleneksel termofilik kültürlerin (PAS ile MSS kültürleri) pasta-filata tipi ticari peynirlerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Bununla beraber, son yıllarda teknolojik ihtiyaçtan dolayı endüstriyel peynir üretimlerinde, PAS kültürlerinden izole edilerek karakterize edilen LAB'nin kombinasyonlarından oluşan DSS kültürlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Starter kültür teknolojisindeki bu gelişmeler paralelinde, işletmede veya laboratuvarında herhangi bir çoğaltma yapılmadan çeşitli peynirlerin endüstriyel üretiminde kullanılmak üzere konsantre dondurulmuş (F-DVS) veya konsantre liyofilize edilmiş (FD-DVS) DSS kültürleri geliştirilmiştir. Bu bağlamda, telemesi fermente edilen ve yüksek sıcaklıkta haşlanan Dil, Örgü, Kaşar, Lavaş ve Yaprak peynirleri gibi pasta-filata tipi peynirlerin endüstriyel üretimlerinde karakteristik özelliklerini sağlayacak uygun LAB kombinasyonları tespit edilmelidir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde 20 farklı süt işletmesinin (süt işletmesi, mandıra ve küçük aile işletmeleri) her birinden 1 L (10 adet koyun sütü veya inek sütü) çiğ süt ile telemesi haşlanan peynir örnekleri (8 adet) alınmıştır. Toplanan çiğ koyun sütünden 30 adet ve inek sütünden de 30 adet olmak üzere, toplam 60 adet geleneksel starter kültür (20 adet termofilik DSK, 20 adet mezofilik MSS ve 20 adet termofilik MSS) üretilmiştir (Cogan ve Accolas, 1996; Fox ve ark., 2004).

3.2.Yöntem

3.2.1. Geleneksel kültürlerin üretimi

3.2.1.1. Doğal kültürlerin üretilmesi

Soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan süt (1 L), iki kısma (A: 100 mL, B: 900 mL) ayrılmıştır. A kısmı, 63 °C’de 10 dak termize edildikten sonra % 0.4-0.5 laktik asit oluşana dek (yaklaşık 5-6 saat) 45 °C’de inkübe edilerek termofilik doğal süt kültürü üretilmiştir. B kısmı ise, mayalama sıcaklığına (32±1 °C) kadar ısıtılıp şirden mayasıyla, 60 dakikada pıhtı kırılacak şekilde, mayalanmıştır. Pıhtı kırıldıktan 10 dakika sonra, peyniraltı suyundan 400 mL alınmış ve 4 adet kapaklı sterilize edilmiş şişelere aktarılmıştır. Şişelerden iki adedi, 28 °C’de (yaklaşık 16-18 saat), diğer ikisi ise 42 °C’de (yaklaşık 4-5 saat) toplam %1.0-1.3 laktik asit oluşana kadar inkübe edilerek, sırasıyla mezofilik ve termofilik peyniraltı suyu (PAS) kültürü elde edilmiştir (Cogan ve Accolas, 1996).

3.2.1.2. MSS kültürlerinin üretilmesi

MSS kültürlerinin üretiminde PAS kültürleri inokulant olarak kullanılmıştır. Mezofilik ve termofilik MSS kültürlerinin üretiminde, inokulant olarak eşdeğer PAS kültürü kullanılmıştır. MSS kültürlerinin üretiminde kullanılan rekonstitüe süt (%10 KM), ağzı kapaklı 100 mL'lik 4 adet şişeye alınarak sterilize (110 °C'de 10 dak) edildikten sonra inkübasyon sıcaklığına soğutulmuştur. Şişelerden 2 adedi 28 °C'ye soğutulduktan sonra %2 oranında mezofilik PAS kültürü ile geriye kalan 2 adet şişe içeriği ise, 42 °C'ye soğutulularak %2 oranında termofilik PAS kültürüyle inoküle edilmiştir. Süt pıhtılaşana (pH 4.6-4.7) kadar inkübe edilerek sırasıyla mezofilik ve termofilik MSS kültürü elde edilmiştir (Cogan ve Accolas, 1996).

3.2.2. Geleneksel kültürlerin mikrobiyal florasının tespit edilmesi

Geleneksel kültürlerin, basil ve kok şekilli laktik asit bakteri yükü ile koliform ve fekal koliform grubu bakterileri, maya-küf, *S. aureus* ve *E. coli* gibi istenmeyen kontaminant ve patojenlerin varlığı ve yükü tespit edilmiştir (Reinheimer ve ark., 1996; Hynes ve ark., 2003; Gerasi ve ark., 2003). Geleneksel kültürlerden uygun dilüsyonlar hazırlanarak, aşağıda belirtilen prosedür doğrultusunda besiyerlerine ekim yapılmıştır.

3.2.2.1. Laktik asit bakterilerinin sayımı

Geleneksel kültürlerin ilk dilüsyonu (10^{-1}) hazırlamak için direk kültürden 10 g/mL örnek alınmış, 90 mL steril peptonlu su karıştırılmıştır. Daha sonra uygun dilüsyonların hazırlanması amacıyla steril peptonlu su (%0.1) kullanılmış ve test edilecek mikroorganizma grupları için spesifik besiyerlerine ekim yapılmıştır. LAB' nin sayımı amacıyla farklı besiyerlerine ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* cinsi bakteriler için, MRS agar besiyerine (37 °C'de 48 saat), kok şekilli LAB için ise M17 agar (37 °C'de 48 saat) besiyerine ekim yapılarak anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. Enterococci cinsi bakteriler için, Slanetz-Bartley agar besiyerine ekim yapılarak 45 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası,

petrilerde direk koloni sayımı yapılmıştır. Ayrıca, toplam mezofilik bakteri sayımı için PCA besiyerine ekim yapılarak 30 °C’de 72 saat inkübasyona terk edilmiştir.

3.2.2.2. İstenmeyen kontaminantların varlığı ve yükü

Koliform ve fekal koliform grubu bakterilerin sayımı amacıyla VRBA besiyerine ekim yapılmıştır. Koliform grubu için 30 °C’de 24 saat, fekal koliform grubu için ise 44 °C’de 24 saat inkübasyon normu uygulanmıştır. Maya-küf sayımları için, tartarik asitle (%10) asitliği pH 3.5’e ayarlanmış PDA besiyerine ekim yapılarak petriler 25 °C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır (Caridi, 2003; Gerasi ve ark., 2003). *E. coli* varlığı ve sayımı için, uygun dilüsyondan Chromocult TBX agar besiyerine dökme plak yöntemiyle ekim yapıldıktan sonra, 44 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir (International Standard Organisation, 1999). Inkübasyon sonrası, petrilerde direk koloni sayımı yapılmıştır. *S. aureus* sayımı için, Baird Parker Agar besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu besiyerinde gelişen 1-3 mm çapında, parlak, siyah renkli (tellurit reaksiyonu) ve etrafı şeffaf bir hale ile çevrili koloniler (yumurta sarısı veya lesitinaz reaksiyonu) *S. aureus* olarak sayılmıştır. Gelişen tipik koloniler, Staphytect Plus test kiti uygulanarak doğrulanmıştır (Sagun ve ark., 2003).

3.2.3. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması

Geleneksel kültürlerinin ilk dilüsyonu, direk kültürden 10 g/mL örnek alınarak, 90 mL steril peptonlu su (%0.1’lik) ile hazırlanmıştır (Caridi, 2003; Gerasi ve ark. 2003). Daha sonra uygun dilüsyonların hazırlanması amacıyla steril peptonlu su kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla, MRS (Man-Rogosa-Sharpe) ve M17 agar besiyerleri kullanılarak yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* cinsi bakteriler için, MRS agar besiyerine (48 saat), kok şekilli LAB için ise M17 agar (48 saat) besiyerine ekim yapılarak anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. Mezofilik MSS kültüründen yapılan ekimler 28 °C’de, termofilik kültürlerden yapılanlar ise 42°C’de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası, MRS ve M17 agar besiyerlerinden rastgele olarak en az 5 adet tipik koloni izolatu

alınmıştır. Alınan her bir izolat, taze hazırlanmış aynı tür katı besiyerine çizim yöntemiyle ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Daha sonra herbir bakteri kolonisinden, gliserol (% 25, w/v) içeren MRS broth (basiller için) ve M17 broth (koklar için) besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir izolat kültürü, aseptik şartlarda 4 adet 2 mL’lik cryotüplere aktarılmış ve –80 °C’de dondurularak stok kültürler oluşturulmuştur.

3.2.4. Laktik asit bakteri suşlarının identifikasyonu

3.2.4.1. Morfolojik, fenotipik ve biyokimyasal yöntemler

Stok kültürler 25 ppm aktif klor içeren su banyosunda çözündürüldükten sonra takip eden analizler için kullanılmıştır. Stok MRS ve M17 broth besiyerlerinden, taze hazırlanmış aynı besiyerine ekim yapılarak izolatların sıvı kültürleri oluşturulmuştur.

3.2.4.1.1. Gram reaksiyonu

Norris ve ark. (1981) tarafından oluşturulan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Uygun koşullarda 18 saat süre ile geliştirilen bakteri süspansiyonları, Gram boyamaya tabi tutulmuş ve menekşe moru olarak gözlenen koloniler Gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.1.2. Morfolojik İnceleme

Gram boyaması yapılan suşlar ışık mikroskopunda morfolojik (kok, basil) olarak sınıflandırılmıştır (Sharp, 1979).

3.2.4.1.3. Katalaz reaksiyonu

Sıvı veya katı besiyerlerinde geliştirilen bakteri kültürüne H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksit ayrışmasını, dolayısıyla katalaz enziminin varlığını göstermektedir. Petri

kutusunda agarlı kültür yüzeyine 1 mL %3'lük H₂O₂ ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı incelenmiştir. Gaz çıkışı gözlenmeyen koloniler katalaz-negatif olarak değerlendirilmiştir (Whittenbury, 1964).

3.2.4.1.4. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilme

Bakteri izolatları 20, 40 ve 65 gr NaCl/L içeren M17 broth (%1.7 bromkrezol purple) besiyerinde inoküle edilmiş ve 28 °C (mezofiller) veya 42 °C'de (termofiller) 4 gün süreyle inkübe edilerek gelişme durumları test edilmiştir. Besiyerinin renginin sarıya dönmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Basil şekilli olanlar için böyle bir test uygulanmamıştır (Bouton ve ark. 2002; Caridi, 2003; Gerasi ve ark. 2003; Veljovic ve ark. 2007).

Çizelge 3.1. LAB izolatlarının fenotipik olarak cins düzeyinde tanımlanması

Şekil	Fermantasyon tipi	Farklı tuz konsantrasyonunda gelişebilme (gr/L)			Farklı sıcaklıkta gelişebilme (°C)		Tanımlama
		20	40	65	10	45	
Kok	-	+	+ / -	-	+	-	<i>Lactococcus</i> sp.
Kok	+	+	+ / -	-	+	-	<i>Leuconostoc</i> sp.
Kok	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i> sp.
Kok	-	+	-	-	-	+	<i>Str. thermophilus</i>
Basil	-						Homolaktik <i>Lactobacillus</i> sp.
Basil	+						Heterolaktik <i>Lactobacillus</i> sp.

3.2.4.1.5. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme

Bir gecede geliştirilen (24 saat) kültürlerden 50 µl alıp 5 mL (%1.7 bromkrezol purple) M17 broth sıvı besiyerine inoküle edilerek inkübasyon (*Lactococcus* spp. ve enterokok grubu bakteriler için (%1.7 bromkrezol purple) 10 ve 45° C'de 48-72 saat) sonunda gelişme durumları test edilmiştir. Besiyerinin renginin sarıya dönmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Basil şekilli olanlar için böyle bir test uygulanmamıştır (Bouton ve ark. 2002; Caridi, 2003; Gerasi ve ark. 2003; Veljovic ve ark. 2007). Tüm bu sonuçlara göre, fenotipik özellikleri tespit edilen Gram pozitif

ve katalaz negatif olan izolatlar Çizelge 3.1'e göre cins/tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır (Cogan ve ark. 1997).

3.2.4.1.6. Fermentasyon testi

Fermentasyon testi için, içinde ters bir şekilde Durham tüpü yerleştirilmiş MRS broth içeren deney tüplerine ekim yapılarak 28 °C (mezofiller) veya 42 °C'de (termofiller) 48 saat inkübasyon sonrası gaz (CO₂) oluşumu test edilmiştir. Fermentasyon tipi (homo-, hetero fermentasyon) bakımından test edilmiştir. Gaz oluşumu gözlenen besiyerlerinde, heterofermentatif bakteri varlığı kabul edilmiştir (Caridi, 2003; Bouton ve ark. 2002; Veljovic ve ark. 2007).

3.2.4.2. Bakteri izolatlarının PCR yöntemi ile tanımlanması

PCR yöntemi ile laktik asit bakteri izolatları, cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bunun için DNA izolasyonu, rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic) ve agaroz jel elektroforezi işlemleri gerçekleştirilmiştir (Kesmen ve ark., 2012; Gevers ve ark., 2001).

3.2.4.2.1. DNA izolasyonu

Referans bakteri suşları ile stok izolatlara ait DNA'ların izolasyonu amacıyla aşağıda yer alan işlemler uygulanmıştır. Öncelikle referans ve stok kültür izolatları, MRS broth (basil) veya M17 broth (kok) besiyerinde iki defa çoğaltılarak çalışma kültürleri elde edilmiştir. Termofilik kültürler 42 °C'de, mezofilik kültürler ise 30 °C'de çoğaltılmıştır. Logaritmik fazda bulunan 1.6 mL hacimdeki taze bakteri kültüründen, Wizard DNA saflaştırma kiti (Promega) kullanılarak bakteri DNA'sı elde edilmiştir. Bunun için öncelikle hazırlanan çalışma kültürleri ependorf tüplerine 1.5 mL olacak şekilde aktarılmış, 6500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.

Kalan pellet kısım TE buffer ile yıkanmış ve üzerine 180 µl lisis buffer (lizozomlu) eklenerek sıcak su (37 °C) banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda üzerine 40 µL proteinaz K ilave edilerek vortex yardımıyla karıştırılmış ve 56 °C’ de 2 saat bekletilmiştir. Sonra, bu karışıma 200 µL lisis buffer eklenmiş ve aynı sıcaklıkta (56 °C) zaman zaman çalkalanarak 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra sıcaklık 70 °C’ ye çıkartılarak 10 dk daha bekletilmiş ve böylece proteinaz K denatüre edilmiştir. Karışım, buzdolabına alınarak soğutulmuş ve üzerine 20 µL RNase A ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 400 µL soğuk etanol (% 100) ilave edilerek karıştırılmış ve 1 dk süreyle bekletilmiştir. Karışım saflaştırma kitinin özel filtreli tüplerine aktarılacak 1 dk 8000 rpm (6000g)’ de santrifüj edilmiştir. Alttaki tüp uzaklaştırılarak üstteki filtreli tüp yeni bir boş tüpe aktarılmış ve 500 µL Wash buffer I (alkol ilaveli) ilave edilerek 1 dk 10 000 rpm (8000 g)’ de santrifüj edilmiştir. Alttaki tüp uzaklaştırılmış, filtreli tüp ise yeni boş tüpe aktarılmıştır.

Daha sonra, 500 µL Wash buffer II (alkol ilaveli) üzerine ilave edilerek 3 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Alttaki tüp yine uzaklaştırılarak üstteki filtreli tüp yeni boş bir (1.5 mL) ependorf tüpüne aktarılmış ve yeniden 1 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpün kapağı açılarak kuruması için bekletilmiş ve üzerine 200 µl Elution buffer ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 10 000 rpm (8000 g)’ de tekrar 1 dk santrifüj edilmiş ve üstte filtreli tüp içerisinde kalan saf DNA, kapaklı ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu şekilde elde edilen DNA örnekleri -80 °C’ de depolanmıştır. Böylece elde edilen örnekler PCR reaksiyonu için hazır hale getirilmiştir. Saflaştırılan DNA’nın kalitesi, DNA’ nın agaroz (%0.8) jelde yürütülmesi ve etidium bromid ile boyanması sonucu bilinen standartlarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2.2. DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik ölçümü

DNA nükleotidlerinin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu özellik nükleik asit miktarının belirlenmesinde bir ölçüdür. Bu nedenle 260 nm’ deki absorpsiyon değerleri (A_{260}) saf olarak izole

edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çift zincirli DNA molekülleri için, optik dansitenin (OD) 50 mg/mL' ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{DNA } (\mu\text{L/mL}) = \text{OD (260 nm' deki absorbans)} \times \text{seyreltme oranı} \times 50$$

DNA konsantrasyonlarının ölçümleri için, her bir örnekten 5 µL DNA alınmış ve üzerine 995 µl saf su eklenerek (seyreltme oranı, 1:200) karışım sağlanmıştır. Daha sonra bu karışımlar spektrofotometre tüplerine alınmış ve 260 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Örneklere ait DNA miktarları farklılık gösterdiğinden, örneklerin konsantrasyonlarının 10 ng/µL olacak şekilde eşitlenmeleri için seyreltme oranları belirlenmiştir. Örneğin ilk sıradaki bakteri DNA' sı için spektrometre okuması 0.165 olarak ölçülmüştür. Bu değer yukarıda verilen formülde yerine konularak ($0.165 \times 200 \times 50 = 1650$ ng) örneğe ait DNA miktarı belirlenmiştir (Church ve ark., 1983).

3.2.4.2.3. Rep-PCR protokolü

PCR örnekleri soğuk buz tankı içerisinde, 5 µL DNA örneği içerisine 20 µL PCR karışımı ilave edilerek hazırlanmıştır.

PCR karışımı

Saf Su	6.8 µL
10 × PCR tamponu	2 µL
dNTP	2 µL
Primer I	1 µL
Primer II	1 µL
Taq polimeraz	0.2 µL
MgCl ₂	2 µL

Çoğaltma işlemi, 25µL reaksiyon hacminde [tipik olarak 10 ng genomik DNA, 0.3µM GTG5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') primeri, 200µM deoksinukleosid trifosfat (dNPA) içeren puReTag Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences,

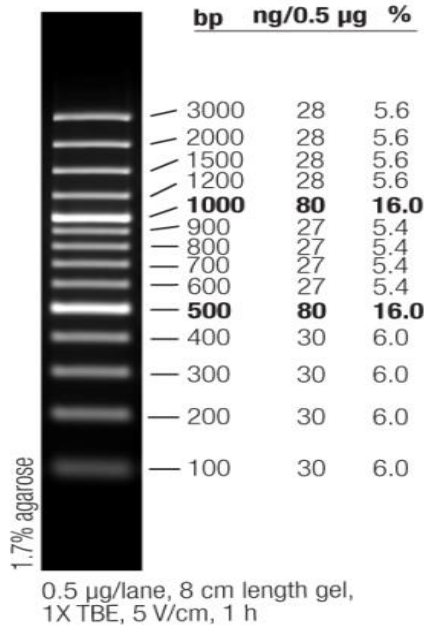
İsveç), 2.5 U puReTag DNA polimeraz, 10 mM tris-HCl (pH9.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂ ve yeterli miktarda steril deiyonize su (toplam hacmi 25µL' ye tamamlamak için)] yapılmıştır. PCR çoğaltma işlemi için Biorad Thermal Cycler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. rep-PCR işlemi sırasında uygulanan sıcaklık ve süre

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus sayısı
Başlangıç	94	4 dakika	1
Denatürasyon	94	1 dakika	35
Bağlanma	50 (GTG ₅)	1 dakika	
Zincir uzaması	72	2 dakika	
Bitiş	72	7 dakika	1

3.2.4.2.4. PCR örneklerinin agaroz jelde yürütülmesi

PCR işlemi ile çoğaltılan DNA örnekleri, agaroz jel (%2, w/v) elektorforezi ile ayırtırmaya tabi tutulmuştur. Bu amaçla, 1.5 g agaroz tartılarak üzerine 2mL 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) çözeltisi ve 98 mL saf su eklenerek karıştırılmıştır. sonra karışım, 100 °C' de 15 dk. kaynatılarak çözdürülmüş ve 60 °C' ye kadar soğuması beklenmiştir. Daha sonra agaroz jel, elektroforez tabakalarına dökülerek 25' lik taraklarla kuyucuk açılması sağlanmıştır. Bu kuyucuklardan 49 tanesi örnekler için 1 tanesi ise marker için kullanılmıştır. Parafilm üzerine PCR reaksiyonu sonucu elde edilen DNA örneğinden 5 µL, ultra saf sudan 5µL ve 6x yükleme (loading) solüsyondan da 5 µL olmak üzere toplam 15 µL karışım kuyucuklara aktarılmıştır. Marker olarak 5 µL 1kb DNA (Gene Ruler Fermentas Life Sciences, Finlandiya) kuyucuğa yüklenmiştir. Örnekler yüklendikten sonra 120 V akımda 180 dk sürede yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

DNA örneklerinin agaroz jelde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra amplifikasyon ürünlerinin boyanması, ethidium bromid (5 mg/L) bulunan kapta 30 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, fazla boyanın uzaklaştırılabilmesi için jeller saf su ile 5- 10 dk yıkandıktan sonra ultraviyole jel görüntüleme sistemi (Gel Logic, Kodak Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, ABD) ile fotoğrafları alınarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Elektroforez işlemi sonucunda ortaya çıkan bantların varlığı ya da yokluğu sırasıyla 1 ve 0 şeklinde kodlanmıştır. Bunun için belirgin olan bantlar dikkate alınmıştır (Somma ve Querci, 1998). Her bir örneğe ait bant desenleri birbiriyle karşılaştırılarak örnekler arasında bir genetik benzerlik indeksi oluşturulmuştur. Bu indeks yardımıyla bakteri suşları arasında genetik yakınlık belirlenmiş ve sonuçlar bir dendrogram şeklinde gösterilmiştir.

3.2.4.3. API yöntemi

Saf bakteri izolatu steril tuzlu su veya distile su karıştırılarak hazırlanan (bakteri süspansiyonu) bakteri süspansiyonu, prosedürde belirtilen yoğunlukta yani McFarland yoğunluğunda olmasına dikkat edilerek hazırlanan süspansiyon stripteki

kuyulara dağıtılmıştır (UMS, 2018). Altı çizili olan kuyuların üzerine 2 damla mineral yağ damlatılmıştır (Örneğin ADH kuyusunun altı çizili olduğunda bunun üzeri mineral yağ ile kaplanmalıdır). Bakteri ile ekimi yapılan strip, etüvde 1 gün inkübe edildikten sonra değerlendirme tablosuna göre değerlendirilmiştir. Değerlendirmede strip üzerindeki renk değişimine (Şekil 2.12 ve 2.13) göre (+) veya (-) şeklinde tablo işaretlenmiştir. Sonuçlar, API WEB sitesine girilerek bakteri tanımlanması yapılmıştır (Anonim, 2018).

3.2.4.4. Bakteri izolatların teknolojik karakterizasyonu

Bu amaçla, her bir bakteri tür/suşuna ait en az iki adet tanımlı bakterinin aşağıda yer alan özellikleri tespit edilmiştir.

3.2.4.4.1. Antagonistik aktivite

Tanımlanmış LAB'nin antagonistik aktiviteleri petri plaklarında test edilmiştir. Tanımlı LAB, uygun sıvı besiyerine (MRS broth veya M17 broth) %1 oranında inoküle edilmiş, daha sonra 30/42 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. LAB' nin petri plaklarında test edilen antagonistik aktivitelerinin tespitinde, 'Spotlama Yöntemi' kullanılmıştır. Bu amaçla, uygun besiyerinde (MRS broth veya M17 broth) geliştirilen 24 saatlik LAB kültürü, uygun besiyerine (MRS agar veya M17 agar) 3 farklı noktaya (5 µL) spotlanmıştır. Petri plakları anaerobik olarak 30/ 42 °C'de 24 saat inkübe edilerek kolonilerin gelişimi sağlanmıştır. Daha sonra, plakların üzeri, $\log_{10} 7 \text{ Cfu mL}^{-1}$ yoğunluğunda 0.1 mL 1 gecelik *E. coli* kültürü içeren 5 mL LB soft agar (% 0.7 oranında agar içeren lactose broth) ile kaplanmıştır. Daha sonra, petriler 18 saat süre ile 37 °C'de inkübe edilmiş ve spot yapılan noktalarda oluşan açık zon çapı kumpas ile ölçülmüştür (Ayad ve ark., 2004; Kıvanç ve ark., 2011).

3.2.4.4.2. Asit oluşturma kapasitesi

Bu amaçla, rekonstitüe süt (100 g/L), sterilize (121 °C'de 5 dak) edildikten sonra, 30 (mezofilik suşlar) veya 42 °C (termofilik suşlar)' ye soğutulmuş, tür

düzeyinde tanımlanan saf bakteri izolatu (%1, v/v) ile inoküle edildikten sonra aynı sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince 0., 2., 4., 6. ve 24. saatte, ortamın pH'sı ölçülmüştür (Cogan ve ark. 1997; Caridi, 2003; Ayad ve ark 2004). Daha sonra rekonstitüe sütün pH'sına göre (2., 4., 6. ve 24. saat) bakteri izolatları, 4.00–4.50 (1. grup), 4.51–5.00 (2. grup), 5.01–5.50 (3. grup), 5.51–6.00 (4. grup) ve 6.01–6.50 (5. grup) aralığında gruplandırılmıştır.

3.2.5. İstatistiksel analizler

Geleneksel starter kültürler ile peynirlere ait mikrobiyolojik veriler logaritmik transformasyona uğratıldıktan sonra tek/iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılık Tukey testi ile test edilmiştir (Yıldız ve Bircan, 1994).

Laktik asit bakteri izolatlarının moleküler tanımlaması amacıyla, agaroz jel elektroforezi sonucu ortaya çıkan bantların varlığı ya da yokluğu sırasıyla 1 ve 0 şeklinde kodlanmıştır. Bu kodlamaya göre, laktik asit bakteri izolatları cins düzeyinde gruplandırılmıştır. Bu bağlamda, her bir örneğe ait bant desenleri birbiriyle karşılaştırılarak örnekler arasında bir genetik benzerlik indeksi oluşturulmuştur. Bu amaçla, NTSys-pc istatistiksel bilgisayar destekli paket program kullanılmıştır. Bu indeks kullanılarak bakteri izolatları arasındaki genetik yakınlık belirlenmiş ve sonuçlar bir dendrogram şeklinde gösterilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Geleneksel Starter Kültürlerin Mikrobiyolojik zellikleri

Çalışma kapsamında, 20 farklı süt işletmesinden toplanan inek (10 adet) ve koyun (10 adet) sütlerinden, 20 adet termofilik DSK, 20 adet mezofilik MSS, 20 adet termofilik MSS kültürü olmak üzere toplamda 60 adet geleneksel starter kültür üretilmiştir. Bu kültürlerin 30 adedi koyun sütünden, 30 adedi ise inek sütünden üretilmiştir. Üretilen geleneksel starter kültürlerin mikrobiyolojik florasında LAB ile istenmeyen kontaminant varlığı ve yükleri araştırılmıştır. Geleneksel starter kültürlerin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları izelge 4.1' de, bu parametrelere ilişkin ortalama değerler ve oluşan gruplar ise izelge 4.2' de verilmiştir.

Geleneksel starter kültür üretiminde kullanılan süt çeşidi bakımından *Enterococcus* sp., FKGB ve *E. coli* sayıları arasındaki farklılık $P<0.05$ düzeyinde önemli, maya-küf sayıları arasındaki farklılık $P<0.01$ düzeyinde çok önemli bulunmuştur. Starter kültür tipi bakımından B-LAB, FKGB ve *S. aureus* bakteri sayıları arasındaki farklılık $P<0.01$ düzeyinde çok önemli, *Enterococcus* sp. ve *E. coli* sayıları arasındaki farklılık $P<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Süt eşidi $\times$ kültür tipi interaksyonu bakımından ise, K-LAB ve *E. coli* sayıları arasındaki farklılık önemli ($P<0.05$) bulunmuştur (izelge 4.1).

Mezofilik MSS kültür florasında B-LAB, K-LAB ve *Enterococcus* sp. bakteri sayıları, termofilik DSK ve termofilik MSS kültür florasındaki yükten daha yüksek bulunmuştur. Mezofilik MSS kültürü florasında FKGB, *E. coli* ve *S. aureus* sayısı termofilik DSK ve termofilik MSS kültür florasında elde edilen değerden önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur (izelge 4.2). Bu durum, istenmeyen kontaminantların daha çok mezofilik özellikte olmalarından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4.1. Geleneksel starter kültürlerin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	Laktik asit bakterileri (log CFU/g)			İstenmeyen kontaminanlar (log CFU/g)				
		B-LAB	K-LAB	<i>Enterococcus</i> sp.	KGB	FKGB	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	Maya-küf
Süt eŐidi	1	0.4804	0.0461	8.932*	1.587	12.519*	8.205*	4.652	15.177**
Starter kültür tipi	2	4.4380**	16.656	7.663*	5.286	15.551**	7.806*	8.594**	3.255
Süt eŐidi x Kültür tipi	2	1.704	2.0991*	1.684	1.864	0.296	6.983*	0.862	4.135
Hata	114	0.6677	0.6884	1.685	1.847	2.261	1.914	1.457	2.171
Toplam	119								

*: P<0.05 düzeyinde; **: P<0.01 düzeyinde önemlidir.
 B-LAB: Basıl őkilli laktik asit bakterileri; K-LAB: Kok őkilli laktik asit bakterileri; SD: Serbestlik derecesi; KGB: Koliform grubu bakteriler; FKGB: Fekal koliform grubu bakteriler

Çizelge 4.2. Geleneksel starter kültürlerin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin ortalama değerler ve oluşan gruplar (log CFU/g)

Kaynak	Laktik asit bakterileri (log cFU/g)			İstenmeyen kontaminantlar (log cFU/g)				
	B-LAB	K-LAB	<i>Enterococcus</i> sp.	KGB	FKGB	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	Maya-küf
Süt çeşidi	İnek sütü	6.62±0.11	6.95±0.11	6.39±0.17 ^b	5.08±0.18	3.26±0.19 ^b	2.67±0.18 ^b	3.41±0.16
	Koyun sütü	6.75±0.11	6.92±0.11	6.93±0.17 ^a	5.31±0.18	3.90±0.19 ^a	3.19±0.18 ^a	3.81±0.16
Starter kltr tpi	Termofilik DSK	6.37±0.13 ^b	6.80±0.13	7.10±0.21 ^a	4.98±0.22	3.31±0.24 ^b	2.51±0.22 ^b	3.91±0.19 ^a
	Mezofilik MSS	7.03±0.13 ^a	7.17±0.13	6.71±0.21 ^{ab}	5.61±0.22	4.30±0.24 ^a	3.40±0.22 ^a	3.85±0.19 ^a
	Termofilik MSS	6.66±0.13 ^{ab}	6.83±0.13	6.20±0.21 ^b	4.99±0.22	3.14±0.24 ^b	2.90±0.22 ^{ab}	3.10±0.19 ^b

* Aynı kaynak ve sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık P<0.05 ve P<0.01 düzeyinde önemlidir.

B-LAB: Basıl şekli laktik asit bakterileri; K-LAB: Kok şekli laktik asit bakterileri; SD: Serbestlik derecesi; KGB: Koliform grubu bakterileri; FKGB: Fekal koliform grubu bakterileri; DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteriler karşını belli olmayan kültür

Diğer taraftan, istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, mezofilik MSS tipi kültür florasında KGB ile maya küf sayıları, diğer iki kültür tipine oranla daha yüksek bulunmuştur.

Süt eşidi bakımından inek sütüne oranla, koyun sütünden üretilen geleneksel starter kültürlerde, *Enterococcus* sp., KGB, FKGB, *E. coli* ve maya-küf yükleri önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, koyun sütünden üretilen geleneksel kültür florasında *S. aureus* yükleri daha yüksek bulunmuştur (izelge 4.2). Bu durum, koyunlarda süt sağımında hijyenik şartları sağlamada yaşanan zorluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. şimşek ve Sağdıç (2006) Isparta yöresinde Dolaz adı verilen peynir çeşidiyle yaptıkları bir çalışmada, benzer sonuçları bildirmiş ve bu durumun koyunlarda süt sağımındaki hijyenik problemlerden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, tulum peynirinin üretiminde kullanılan koyun sütü florasında *Enterococcus* sp. sayısının inek sütlerine oranla, fark edilir düzeyde yüksek olduğu, en yüksek *Staphylococcus* sp. sayısının çiğ koyun sütünden üretilen peynire ait peyniraltı suyunda (3.60 log kob/g), en düşük sayı ise ısıl işlem görmüş inek sütünden üretilen peynirlere ait peyniraltı suyunda (2.05 log kob/g) belirlenmiştir (Sert, 2011).

Bu alışma kapsamında geliştirilen geleneksel starter kültürler (termofilik DSK, mezofilik MSS ve termofilik MSS) laktik asit bakteri yükleri açısından özellikle Diyarbakır rg peyniri, Lavaş, Yaprak ve Urfa peyniri gibi çiğ sütten üretilen çeşitli yöresel peynirlerin endüstriyel üretiminde kullanılabilecek uygunlukta oldukları düşünülebilir. Ancak, istenmeyen kontaminant (KGB, FKGB, *E. coli*, *S. aureus* ve maya-küf) yükleri açısından aynı durum söz konusu değildir. Bu nedenle, süt sağımında hijyen ve sanitasyon kurallarına uyularak mevzuata (Anonim, 2012) uygun kaliteli çiğ süt üretilmesi durumunda, geleneksel starter kültürlerin özellikle ülkemizde yöresel olarak çiğ sütten üretilen peynirlerin endüstriye aktarılmasında önemli bir fırsat olduğu değerlendirilmektedir. Başka bir deyişle yöresel peynirlerimiz endüstriyel boyutta üretimi ile sadece şekilsel bir üretim

gerçekleştirilmektedir. Bunun yerine, yöresel peynirlerimizin endüstriyel üretiminde peynire işlenecek sütün termize veya pastörize edilmesi, üretimde termofilik DSK, termofilik MSS ve mezofilik MSS kültürlerin kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar yapılmalıdır. Bu durum, ülke ekonomisi ve tketic i istekleri açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu baēlamda, termofilik PAS kültürünün, Dil peynirinin üretimine uygunluēunun arařtırıldıēı bir çalışmada, termofilik PAS kültürünün kullanıldıēı termize ve pastörize sütten üretilen Dil peynirleri ile ıē sütten yapılan peynirler arasında bileşim, biyokimyasal ve duyu sal parametreler açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılıēın tespit edilmediēi, ıē sütten üretilen Dil peynirinin olgunlaşma periyodunun 90. gününde dahi tketic i saēlıēı ve gıda güvenli rliēi açısından risk tařıdıēı, buna karşın termize sütten yapılan peynirin periyodun 60. gününde, pastörize sütten üretilen peynirin ise 30. gününde, güvenilir olduēu ve risk tařımadıēı bildirilmiştir (Uysal, 2008).

AB lkelerinde, doēal PAS kültürleri ticari olarak *siero-innesto*, *cizza*, *scotto-fermento*, *sierro-fermento* olarak, 'doēal süt kültürleri' ise *latto-innesto* ve *latto-fermento* adları ile bilinmektedirler. Bu kültürler, Crescenza, Italico, Mozzarella, Asiago ve Montasio gibi İtalyan peynir çeşitlerinin üretiminde starter olarak kullanılmaktadır (Cogan ve Accolas, 1996; Limsowtin ve ark., 1996). İtalya'da Mozzarella peynirinin endüstriyel üretiminde, doēal süt kültürleri veya doēal PAS kültürlerini kullanmaktadır. Söz konusu peynirin üretiminde pastörize süt ve starter olarak ta doēal veya ticari DSS kültürleri (*Str. thermophilus* ve *Lb. helveticus* karışımı) kullanılmaktadır. Ancak, ticari DSS kültürlerinin kullanımı sonucu tat-aroma açısından arzulan kalitede peynir retilenmemektedir (Addeo ve Coppola, 1983; Coppola ve ark., 1988; Parente ve ark., 1997).

Doēal kültürler, LAB' nin tanımlanmamış karışımı olup, faj kontrolü için herhangi bir önlemin alınmadıēı işletme ortamında günlük olarak oēaltılmaktadır. Sık sık oēaltma, kültürde kompozisyon deēiřikliēine neden olmakta, bu da kültürün düzensiz bir performans sergilemesine neden olmaktadır. Bu durum, olgun peynirin

duyusal özelliklerinde değişikliğe neden olmaktadır. Bu problemin zm amacıyla, ticari mezofilik ve termofilik MSS kültürleri geliştirilmişlerdir (Limsowtin ve ark., 1996). Bu amaçla, kaliteli peynir üretiminin yapıldığı doğal kültürler, kontrollü şartlarda laboratuvar da liyofilize ve dondurulmuş MSS kültürlerinin hazırlanmasında inokl olarak kullanılmaktadır. Hazırlanan ticari MSS kültürleri, işletmede aseptik şartlarda ana, ara ve işletme kültürü olarak oğaltılmaktadırlar. Ancak günümüzde, ticari olarak direk işletme kültürünün hazırlanması veya direk peynire işlenecek sütünün inokulasyonu yapacak şekilde konsantre dondurulmuş veya konsantre liyofilize MSS kültürlerini üretilmektedir. Bu yenilik, işletmede kültür çoğaltma işlemlerini ve birçok zorluğu ortadan kaldırmaktadır. Mezofilik MSS kültürleri daha çok İskandinav lkeleri, Almanya ve İtalya'da, termofilik MSS kültürleri ise İtalya (*colture naturali in siero*), İsviçre (*rohmschkulturen*) ve Fransa'da kullanılmaktadır (Accolas ve Auclair, 1983). Günümüzde yoğurt, İsviçre tipi ve İtalya tipi peynirlerin üretiminde kullanılan termofilik MSS kültürleri *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ve *Lb. helveticus* gibi termofilik LAB içerdiği bildirmektedir (Cogan ve Accolas, 1995; Limsowtin ve ark., 1996).

4.2. Telemesi Haşlanan Taze Peynirin Mikrobiyolojik zellikleri

Telemesi haşlanan taze peynirin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu, peynir çeşidi (koyun ve inek peyniri) bakımından KGB sayıları arasındaki farklılık önemli ($P<0.05$), *E. coli* sayıları arasındaki farklılık ise çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur (izelge 4.3).

Koyun sütünden üretilen peynirin florasında, KGB sayısı ile *E. coli* sayısı, inek sütünden elde edilen peynirin florasındaki değerlerden önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. İstatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte benzer şekilde koyun sütünden elde edilen peynir florasında FKGB sayısı ile *S. aureus* sayıları daha yüksek bulunmuştur (izelge 4.4). Bu durum, çiğ koyun sütünün mikrobiyal yükünün yüksek olduğundan kaynaklandığı söylenebilir.

Bununla beraber, çiğ koyun ve inek sütünden üretilen telemesi haşlanan taze örgü, yaprak, lavaş gibi peynirlerin istenmeyen kontaminant yüklerinin yüksek olduğu ve tüketici sağlığı açısından risk oluşturduğu anlaşılmaktadır. Ancak Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği'ne (Tebliğ no: 2015/6) göre, çiğ sütten üretilen ve telemesi haşlanan peynirlerin (madde 5, C bendi) taze olarak piyasaya arz edilebileceği hükmü yer almaktadır. Aynı tebliğde, haşlama işleminin en az 72°C'de yapılması gerektiği ifade edilmektedir. Bu sıcaklıkta, patojen bakterilerin elimize olduğu bilinmektedir. Ancak yöresel peynir üretimlerinde çapraz kontaminasyonun önlenmesi oldukça zor görünmektedir ve bu durum yapılan bu çalışma sonuçları ile de desteklenmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (29.11.2011 tarih ve 28157 (3. Mükerrer) RG) ekinde peynirler için, koagülaz pozitif stafilokoklar için (alınacak 5 örneğin 2'sinde 10^2 - 10^3 kob/g, diğer 3 örnek ise 10^2 kob/g olmalı, *Salmonella* cinsi ve *L. monosytogenes* bakterilerinin 25 g. rnekte bulunamayacağı hükmüne bağlanmıştır. Ancak, bu çalışmada peynir florasında koliform grubu, fekal koliform grubu, *S. aureus*, *E. coli* ve maya-küf varlığı ve yükünün tespitine yönelik parametreler çalışılmıştır. Tebliğde belirtilen mikrobiyolojik kriterler ile bu çalışmada çalışılan parametreler arasında bir ilişki ve korelasyon dan söz edilebilir. Tebliğde belirtilen kriterlerin, koliform grubu bakteriler arasında yer aldığı unutulmamalıdır.

Tulum peynirlerinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duysal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ner ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada 20 adet tulum peyniri örneğinin mikrobiyolojik zelliklerinin TS 3001' e uygun olmadığı belirtilerek; fizikokimyasal, mikrobiyal ve organoleptik özellikler bakımından peynirin standardize edilmesi gerektiği ifade edilmiştir.

Farklı yöresel peynir çeşitlerinin üretiminde geleneksel kültürlerin kullanımının tat-aroma ve tekstür ile ilgili avantajları, yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada Antonsson ve ark. (2003) Danimarka'da üretilen Danbo peynirinin retimde *Lb. paracasei* bakterisinin kültür

kombinasyonlarında yer almasının peynirin duysal özellikleri üzerinde olumlu etkide bulunabileceği ifade edilmistir. Başka bir çalışmada koyun sütünden geleneksel yöntemle üretilen Orinotyri peynir üretiminde geleneksel starter kültür kullanımının faydalı olacağı bildirilmiştir (Prodromou ve ark., 2001).



Çizelge 4.3. Telemesi haşlanan taze peynirin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	Laktik asit bakterileri (log CFU/g)			İstenmeyen kontaminanlar (log CFU/g)				
		B-LAB	K-LAB	<i>Enterococcus</i> sp.	KGB	FKGB	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	Maya-küf
Peynir eşidi	1	0.0838	0.1330	0.021	4.7176*	12.018	5.1382**	0.1576	0.338
Hata	14	0.5364	0.3238	1.94	0.8791	4.512	0.5375	0.7179	1.752
Toplam	15								

*: P<0.05 düzeyinde; **: P<0.01 düzeyinde çok önemlidir.
 B-LAB: Basil şekliili laktik asit bakterileri; K-LAB: Kok şekliili laktik asit bakterileri; SD: Serbestlik derecesi; KGB: Koliform grubu bakteriler; FKGB: Fekal koliform grubu bakteriler

Çizelge 4.4. Telemesi haşlanan taze peynirin mikrobiyolojik parametrelerine ilişkin ortalama değerler ve oluşan gruplar

Kaynak	Laktik asit bakterileri (log CFU/g)			İstenmeyen kontaminantlar (log CFU/g)				
	B-LAB	K-LAB	<i>Enterococcus</i> sp.	KGB	FKGB	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	Maya-küf
Koyun peyniri	6.90±0.26	7.39±0.20	6.93±0.49	6.90±0.33 ^a	4.06±0.75	4.13±0.26 ^a	5.10±0.30	4.63±0.47
İnek peyniri	7.05±0.26	7.20±0.20	6.86±0.49	5.82±0.33 ^b	2.33±0.75	3.00±0.26 ^b	4.89±0.30	4.92±0.47

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık p<0.05 ve p<0.01 düzeyinde önemlidir.

B-LAB: *Bacillus* laktik asit bakterileri; K-LAB: *Kocuria* laktik asit bakterileri; SD: Serbestlik derecesi; KGB: Koliform grubu bakteriler; FKGB: Fekal koliform grubu bakteriler

4.3. Bakteri İzolatlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

4.3.1. Gram boyama, katalaz testi ve morfolojik özellikler

Farklı bölgelerden toplanan koyun ve inek sütleri kullanılarak üretilen termofilik DSK, mezofilik MSS ve termofilik MSS kültür tipleri ile telemesi haşlanan peynir örneklerinden hazırlanan dilusyonlardan bireysel olarak laktik asit bakterilerinin gelişimi için spesifik olan MRS ve M17 agar besiyerlerine ekim yapılmış ve herbir besiyerinden farklı morfolojik özellik gösteren bakteri kolonilerinden olmak şartıyla en az 5 koloniden toplam 358 adet izolat alınmıştır. Elde edilen bu izolatlar, öncelikle Gram reaksiyonu ve katalaz testine tabi tutulmuştur (Çizelge 4.5). Çizelgeden de görüldüğü gibi, izolatların 95 adedi Gr (+) K (+), 46 adedi ise Gr (-) K (-), 15 adedi Gr (-) K (+) ve geriye kalan 202 adedi ise Gr (+) K (-) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynirlerden alınan bakteri izolatlarının Gram reaksiyonu ile Katalaz testi sonuçları

Kültür tipi	İzolat sayısı	G (+) K (-)	G (+) K (+)	G (-) K (-)	G (-) K (+)
Termofilik DSK	100	60	20	16	4
Mezofilik MSS	111	63	27	15	6
Termofilik MSS	101	58	33	9	1
Telemesi haşlanan peynirler	46	21	15	6	4
Toplam	358	202	95	46	15

G: Gram reaksiyonu; K: Katalaz testi

Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir florasından alınan LAB izolatlarının morfolojik özellikleri Çizelge 4.6’ da verilmiştir. Buna göre 202 LAB izolatından 43 adet izolat basil, 18 adet izolat kokobasil ve 141 adet izolatın da kok şekilli olduğu belirlenmiştir.

4.3.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilme

Toplam 159 adet kok/kokobasil şekilli LAB izolatu, 20, 40 ve 65 g NaCl/L içeren M17 broth (%1.7 bromkrezol purple) besiyerine ekim yapılarak 28 °C (mezofiller) veya 42 °C’de (termofiller) 4 gün süreyle inkübe edilerek, izolatların gelişme durumları test edilmiştir. Bu süre sonunda besiyeri renginin sarıya dönmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Basil şekilli olan 43 izolat için böyle bir test uygulanmamıştır. Çizelge 4.7’ de laktik asit bakteri izolatlarının, farklı tuz oranlarını içeren M17 broth besiyerinde gelişme durumları ile ilgili test sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı geleneksel starter kültür ve telemesi haşlanan peynir florasından alınan laktik asit bakteri izolatlarının morfolojik özellikleri

Kültür tipi	Morfolojik Özellikler			Toplam
	Kok	Kokobasil	Basil	
Termofilik DSK	45	5	13	63
Mezofilik MSS	37	7	15	59
Termofilik MSS	42	4	9	55
Telemesi haşlanan peynirler	17	2	6	25
Toplam	141	18	43	202
DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteri karışımı belli olmayan kültür				

Çizelge 4.7. Farklı geleneksel starter kültür ile telemesi haşlanan peynir florasından alınan kok/kokobasil şekilli laktik asit bakteri izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarına tolerans durumları

Kültür tipi	Tuzda gelişme durumu (g NaCl/L)					Toplam
	20 (+)	40 (+)	40 (-)	65 (+)	65 (-)	
Termofilik DSK	50	31	19	6	44	50
Mezofilik MSS	44	30	14	7	37	44
Termofilik MSS	46	30	16	12	34	46
Telemesi haşlanan peynirler	19	15	4	3	16	19
Toplam	159	106	53	28	131	159
DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteri karışımı belli olmayan kültür						

Çizelgeden de anlaşıldığı üzere, 20 g NaCl/L içeren M17 broth besiyerinde tüm LAB izolatları çoğalmıştır. Ancak 40 ve 65 g NaCl/L içeren M17 broth besiyerinde tüm izolatlar gelişme performansı gösterememişlerdir. LAB izolatlarının tuza göstermiş oldukları direnç peynir teknolojisi açısından önem taşımaktadır. Başka bir deyişle, yüksek tuz konsantrasyonunda gelişebilen LAB izolatları peynir üretiminde kullanılan starter kültür bileşimlerinde değerlendirilebilecektir.

4.2.3. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme

Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir florasından alınan toplam 159 adet LAB izolatı, farklı sıcaklıkta (10 veya 45° C) 48-72 saat süre ile inkübe edilmiş ve gelişme durumları Çizelge 4.8’ de verilmiştir. İnkübasyon sonucunda besiyeri renginin sarıya dönmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynirlerden elde edilen kok/kokobasil şekilli laktik asit bakteri izolatların farklı sıcaklıklarda gelişme durumları

Kültür Tipi	Sıcaklık (°C)				Toplam
	10 (-)	10 (+)	45 (-)	45 (+)	
Termofilik DSK	7	43	20	30	50
Mezofilik MSS	10	34	28	16	44
Termofilik MSS	11	35	10	36	46
Telemesi haşlanan peynirler	1	18	15	4	19
Toplam	29	130	73	86	159

DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteri karışımı belli olmayan kültür

Çizelgeden de anlaşılabacağı üzere, termofilik DSK’ dan elde edilen toplam 50 adet laktik asit bakteri izolatından, 7 adeti 10 °C’ de, 20 adedi ise 45 °C’ de gelişmemiştir. Mezofilik MSS kültüründen elde edilen toplam 44 adet laktik asit bakteri izolatından 10 adedi 10 °C’ de, 28 adedi ise 45 °C’ de gelişmemiştir. Termofilik MSS kültüründen elde edilen toplam 46 adet laktik asit bakteri izolatından 11 adedi 10 °C’ de, 10 adedi ise 45 °C’ de gelişmemiştir. Peynir kültüründen elde edilen toplam 19 adet laktik asit bakteri izolatından 1 adedi 10 °C’ de, 15 adedi ise 45 °C’ de gelişmemiştir.

Farklı sıcaklık (10 ve 45 °C) ile farklı tuz konsantrasyonunda (2, 4 ve 6.5 g NaCl/L) gelişmelerine göre kok şekilli izolatların biyokimyasal özellikleri, *Lactococcus* cinsi bakterilerin, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinsi bakteriler ile ayrıştırılmasında kullanılmaktadır (Carr ve ark., 2002; Schleifer ve Balz, 1984). LAB izolatlarından 10 ve 45 °C’de ve 6.5 g NaCl/L’ de gelişebilen izolatlar, *Enterococcus* sp. olarak tanımlanmıştır. Bu durumda 159 adet kok izolatının, 47 adedi *Enterococcus* cinsi bakteri, geriye kalan toplam 112 izolat ise fenotipik özelliklerine göre *Lactococcus* sp. bakteri olarak değerlendirilmiştir.

4.2.4. Fermantasyon testi

Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir florasından alınan toplam 202 adet LAB izolatu, fermantasyon tipi (homo-, hetero fermantasyon) bakımından test edilmiş ve elde edilen sonuçlar izelge 4.9’ da verilmiştir. Bu bağlamda, basil şekli 43 adet LAB izolatına da, fermantasyon testi uygulanmıştır.

Çizelge 4.9. Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir florasından alınan laktik asit bakteri izolatlarının fermentasyon testi sonuçları

Kültür Tipi	Fermantasyon testi		Toplam
	Homofermentatif	Heterofermentatif	
Termofilik DSK	51	12	63
Mezofilik MSS	51	8	59
Termofilik MSS	50	5	55
Telemesi haşlanan peynirler	20	5	25
Toplam	172	30	202

DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteri karışımı belli olmayan kültür

Gaz oluşumu gözlenen MRS/M17 broth besiyerlerinde, izolat heterofermentatif olarak değerlendirilmiştir (Caridi, 2003; Bouton ve ark. 2002; Veljovic ve ark. 2007). Fermentasyon testi sonucu, 172 adet LAB izolatının homofermentatif özellik gösterdiği, 30 adet LAB izolatının ise heterofermentatif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda termofilik DSK florasından alınan 51 adet izolat, mezofilik MSS kültürü florasından alınan 51 adet izolat, termofilik MSS kültürü florasından alınan 50 adet izolat ve telemesi haşlanan peynir florasından alınan 20 adet izolat homofermentatif olarak değerlendirilmiştir.

Uygulanan biyokimyasal testler sonucunda, farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan LAB izolatlarının cins düzeyinde tanımlanması izelge 4. 10 ve izelge 4.11’ de verilmiştir.

Çizelgelerden de grldği gibi, Termofilik DSK kültüründen 14 adet *Enterococcus* sp., 22 adet *Lactococcus* sp., 6 adet *Leuconostoc* sp., 7 adet

Streptococcus sp, 8 adet Homolaktik *Lb.*, 4 adet Heterolaktik *Lb.*; Mezofilik MSS kültüründen 11 adet *Enterococcus* sp, 18 adet *Lactococcus* sp., 5 adet *Leuconostoc* sp., 11 adet *Streptococcus* sp., 12 adet Homolaktik *Lb.*, 4 adet Heterolaktik *Lb.*; Termofilik MSS kültüründen 16 adet *Enterococcus* sp., 20 adet *Lactococcus* sp., 10 adet *Streptococcus* sp., 7 adet Homolaktik *Lb.*, 2 adet Heterolaktik *Lb.*; Telemesi haşlanan peynirler 3 adet *Enterococcus* sp., 14 adet *Lactococcus* sp., 1 adet *Leuconostoc* sp., 1 adet *Streptococcus* sp., 2 adet Homolaktik *Lb.*, 4 adet Heterolaktik *Lb.* elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı gelişimsel süreçler için de telomeri taşıyan peptid floralarından alınan örneklerin farklı izolasyon ve tanımlama sonuçları

Kültür Tipi	Şekil	Fermantasyon tipi	Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme (g/L)			Farklı sıcaklıkta gelişme (°C)		İzolasyon sayısı	Cins
			20	40	65	10	45		
Termofilik DSK	Kök	-	+	+	+	+	+	14	<i>Enterococcus</i> sp.
	Kök	-	+	+	-	+	-	22	<i>Lactococcus</i> sp.
	Kök	+	+	+	-	+	-	6	<i>Leuconostoc</i> sp.
	Kök	-	+	-	-	-	+	7	<i>Streptococcus</i> sp.
Mesofilik MSS	Bazil	-						8	<i>Homolaktik Lactobacillus</i>
	Bazil	+						4	<i>Heterolaktik Lactobacillus</i>
	Kök	-	+	+	+	+	+	11	<i>Enterococcus</i> sp.
	Kök	-	+	+	-	+	-	18	<i>Lactococcus</i> sp.
Termofilik MSS	Kök	+	+	+	-	+	-	5	<i>Leuconostoc</i> sp.
	Kök	-	+	-	-	-	+	11	<i>Streptococcus</i> sp.
	Bazil	-						12	<i>Homolaktik Lactobacillus</i>
	Bazil	+						4	<i>Heterolaktik Lactobacillus</i>
Termofilik MSS	Kök	-	+	+	+	+	+	16	<i>Enterococcus</i> sp.
	Kök	-	+	+	-	+	-	20	<i>Lactococcus</i> sp.
	Kök	-	+	-	-	-	+	10	<i>Streptococcus</i> sp.
	Bazil	-						7	<i>Homolaktik Lactobacillus</i>
Telomeri taşıyan peptid	Bazil	+						2	<i>Heterolaktik Lactobacillus</i>
	Kök	-	+	+	+	+	+	3	<i>Enterococcus</i> sp.
	Kök	-	+	+	-	+	-	14	<i>Lactococcus</i> sp.
	Kök	+	+	+	-	+	-	1	<i>Leuconostoc</i> sp.
DSK, dehidrit kültürü, MSS, bakteriyel kültür, farklı olanlar kültür	Kök	-	+	-	-	-	+	1	<i>Streptococcus</i> sp.
	Bazil	-						2	<i>Homolaktik Lactobacillus</i>
	Bazil	+						4	<i>Heterolaktik Lactobacillus</i>

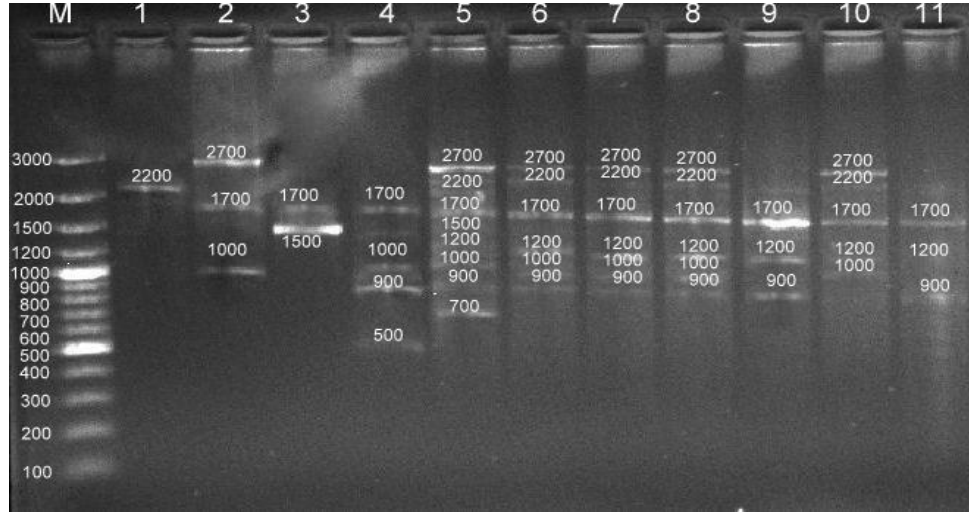
4.4. Bakteri İzolatlarnn Moleküler Karakterizasyonu

Biyokimyasal testler sonucunda cins düzeyinde tanmlanan laktik asit bakteri izolatlarının, cins temelinde moleküler yöntemlerle tanmlamaları ve gruplandırılmaları için DNA izolasyonu, rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic) ve agaroz jel elektroforezi işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemin, düşük maliyetli olduğu, yüksek tanımlayıcı kapasiteye sahip ve bir çok Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin sınıflandırma ve tiplendirilmesi için uygun olduğu ve başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (De Bruijn, 1992; Woods ve ark., 1992; Versalovic ve ark., 1994; Georghiou ve ark., 1995; Herman ve ark., 1998; Jersek ve ark., 1999; Olive ve Bean, 1999; De Urraza ve ark., 2000; Gevers ve ark., 2001; Masco ve ark., 2003; Krizova ve ark., 2008; Adığzel ve Atasever, 2009; Mohammed ve ark., 2009).

DNA izolasyon kiti kullanarak saflaştırılan DNA fragmentleri, izolatların gruplandırılması için rep-PCR kullanılarak oğaltılmış ve agaroz jel elektroforez yardımıyla görüntülenmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarına ait DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezde ayrıştırılmasına ilişkin örnek elektroforogram Şekil 4.1’ de verilmiştir.

Şekil 4.1’ de görüldüğü üzere, elektroforogramın sol üst kısmında M ile işaretlenen kuyucukta, 100-3000 bp içeren marker yer almaktadır. Daha sonra, 1-11 nolu kuyucuklarda farklı LAB izolatlarına ait rep-PCR protokolü ile çoğaltılan DNA fragmentleri yer almaktadır. Bu bağlamda, 1 nolu kuyucukta yürütülen DNA fragmentinin 2200 bp büyüklüğünde bir molekül içerdiği, 5 nolu kuyucukta yürütülen DNA fragmentinin ise 700-900-1000-1200-1500-1700-2200 ve 2700 bp içeren 8 farklı molekül içerdiği görülmektedir.



Şekil 4.1. Farklı geleneksel starter kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri izolatlarının izolatlarına ait DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile ilgili örnek elektroforegram

Rep-PCR sonucu çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi, ortaya çıkan bantların varlığı/yokluğu 1/0 Şeklinde kodlanması sonucuna laktik asit bakteri izolatları cins düzeyinde gruplandırılarak (izelge 4.11) genetik benzerlik indeksi oluşturulmuştur. Bu indeks kullanılarak bakteri izolatları arasındaki genetik yakınlık belirlenmiş ve sonuçlar dendrogram Şeklinde gösterilmiştir (izelge 4.12).

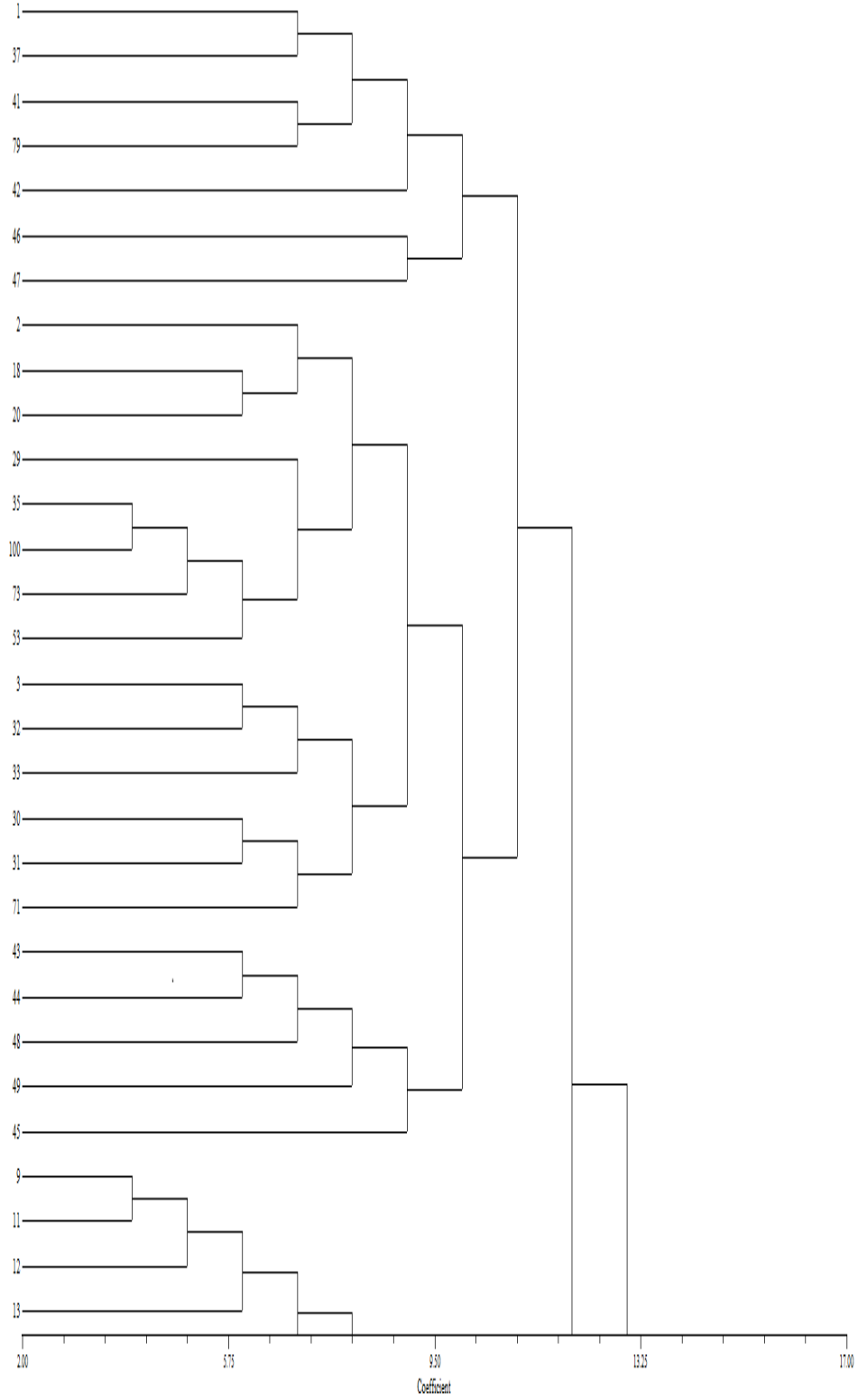
Bakteri suşları arasındaki genetik yakınlığı belirten dendrogram grafiğine bakıldığında markırın oluşturduğu grup genotiplerinden 4 büyük kümeye ayrıldığı görülmektedir. 1. küme kendi arasında iki alt kümeye ayrılmaktadır. Alt kümelerden birincisi, 1-37 ve 41-79 nolu iki grup izolat içerirken, ikinci alt küme sadece 42 nolu izolatı içermektedir. 2. büyük küme de yine iki alt kümeye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi, 46; ikincisi ise 47 nolu izolatlardır. 3. büyük kümenin oluşturduğu 2 alt küme de yine kendi arasında gruplara ayrılmıştır. Bunlardan 1. alt küme, 2-18-20 ve 29-35-100-73-53 olmak üzere iki gruptan oluŐmuŐtur. 2. alt küme ise 3-32-33 ve 30-31-71 olmak üzere iki gruptan oluŐmuŐtur. 4. büyük küme yine 2 alt kümeden meydana gelmiŐtir.

Bunlardan 1. alt küme 43-44-48 ve 49 olmak üzere iki gruba ayrılırken, 2. alt küme sadece 45 nolu izolattan oluŐmuŐtur. Dendrograma göre izolatlar arasında en

büyük benzerlik 35-100 ve 9-11 nolu genotipler arasında görülürken, en büyük farklılık 1 ve 13 nolu genotipler arasında grlmŖtr. Yapılan çalışmalarda, markırın oluşturduğu var yok testine göre dendogram grafiğinde oluşan gruplar benzer Ŗekilde yorumlanmıştır (Ercişli ve ark., 2008; Köse, 2003).

Ertekin (2007) farklı gıdalardan elde ettiği laktik asit bakteri izolatlarının tanımlanmasında morfolojik, metabolik ve fizyolojik karakterlerin, standart tip suşlar (izolatlar) ile birlikte belirlenip nümerik taksonomi esasları dahilinde değerlendirince homojen gruplar halinde sınıflandırma ve teknolojik özelliklerini çalışmıştır. Nümerik taksonomiye göre izolatlar 7 üyeli (benzerlik %89.4), 15 üyeli (benzerlik %89.4) ve 3 üyeli (benzerlik %90.7) olmak üzere 3 adet çok üyeli, 15 adet de tek üyeli kümeye ayrılmıştır. Çok üyeli kümenin birbiri ile benzerligi %80'dir. Bu değerler nümerik taksonomi değerlendirme kriterlerine göre taksonomik yapının iyi sonuçlandığını gösterdiğini belirtmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakteri suşları arasında genetik yakınlığı belirten dendogram grafiği



Çizelge 4.1.1. Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan LAB izolatlarının biyokimyasal testler sonucu cins düzeyinde tanımlanması

Kaynak	Enterococcus sp.	Lactococcus sp.	Leuconostoc sp.	Streptococcus sp.	Homolaktik Lb.	Heterolaktik Lb.	Toplam
Termofilik DSK	17	20	5	7	8	4	61
Mezofilik MSS	11	18	5	11	12	4	61
Termofilik MSS	16	20	0	10	7	2	55
Telemesi haşlanan peynirler	3	14	1	1	2	4	25
Toplam	47	72	11	29	29	14	202

Farklı geleneksel starter kültürler ile peynir florasından alınan LAB izolatları rep-PCR alışması sonucunda, termofilik DSK kültüründen tanımlanan toplam 44 adet izolatın 20 adet *Lactococcus* sp., 1 adet *Pediococcus* sp., 6 adet *Leuconostoc* sp., 9 adet *Enterococcus* sp., 8 adet *Lactobacillus* sp. olarak; mezofilik MSS kültüründen alınan 44 adet izolat, 14 adet *Lactococcus* sp., 2 adet *Pediococcus* sp., 8 adet *Leuconostoc* sp., 8 adet *Enterococcus* sp., 12 adet *Lactobacillus* sp. olarak; termofilik MSS kültüründen alınan 37 adet izolat 18 adet *Lactococcus* sp., 2 adet *Pediococcus* sp., 3 adet *Leuconostoc* sp., 7 adet *Enterococcus* sp., 7 adet *Lactobacillus* sp. olarak; telemesi haşlanan peynir florasından tanımlanan 16 adet izolat 10 adet *Lactococcus* sp., 3 adet *Pediococcus* sp., 1 adet *Enterococcus* sp., 2 adet *Lactobacillus* sp. olarak belirlenmiştir. Özetle, geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir florasından 141 adet LAB izolatı rep-PCR tekniği kullanılarak tanımlanmış ve izolatların cins düzeyinde dağılımı, 62 adet *Lactococcus* sp., 8 adet *Pediococcus* sp., 17 adet *Leuconostoc* sp., 25 adet *Enterococcus* sp. ve 29 adet *Lactobacillus* sp. olarak tespit edilmiştir (izelge 4.11).

Bu çalışmada, laktik asit bakteri izolatlarının moleküler benzerlik sınıflandırılması sonucunda, MRS besiyerinden izole edilen toplam 109 izolattan, 47 adedi *Lactococcus* sp. olarak tanımlanırken, 24 adedi *Lactobacillus* sp., 16 adedi *Enterococcus* sp., 15 adedi *Leuconostoc* sp. ve 7 adedi *Pediococcus* sp. olarak tanımlanmıştır. M17 besiyerinden izole edilen 32 laktik asit bakteri izolatından 15 izolat *Lactococcus* sp. olarak tanımlanırken, 9 izolat *Enterococcus* sp., 5 izolat *Lactobacillus* sp., 2 izolat *Leuconostoc* sp. ve 1 izolat *Pediococcus* sp. olarak tanımlanmıştır.

Lactobacillus cinsi bakterilerin izolasyonu amacıyla kullanılan MRS besiyerinde *Lactobacillus* sp.'den çok *Lactococcus* sp. izole edilmesi, bu besiyerinin farklı türdeki kokların gelişimine de olanak sağlamasının neden olduğu düşünülmektedir. Franciosi ve ark. (2008) MRS besiyerinde fazla sayıda laktik asit bakteri izolatı elde edilmesine karşın, bunlardan yalnızca düşük düzeyde izolatın *Lactobacillus* sp. türüne ait suşlardan olduğunu ve *Enterococcus* sp. bakterilerin ortamda baskın olduğunu belirlemişlerdir. Dolci ve ark. (2008)' da MRS besiyerinde

Lactobacillus sp. yanı sıra *Lactococcus* sp. ve *Streptococcus* sp. suşlarını da izole etmişlerdir. Caridi (2003) ‘‘Pecorino del Pero’’ peynirinde baskın florayı karakterize ettiği çalışmasında MRS besiyerinden izole edilen 90 suştan yalnızca 41’ ni *Lactobacillus* sp. olarak tanımlanmıştır. Bir diğer araştırmada ise, Lopez-Diaz ve ark. (2000) MRS besiyerinde izole edilen suşların %62.7’ ni *Lactococcus* sp., %22’ ni ise *Lactobacillus* sp. olarak tanımlamışlardır.

Kesmen ve ark., (2012) yaptıkları bir çalışmada, sucuk florasından izole ettikleri laktik asit bakterilerini tanımlama için moleküler yöntemler kullanmışlardır. Bu bağlamda izole ettikleri saf DNA fragmentlerini rep- PCR yardımıyla çoğaltarak elektroforez ile görüntülemişlerdir. Sucuk florasında *Lactobacillus* cinsine ait *Lb sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. farciminis* ve *Lb. alimentarius* türlerini tanımlamışlardır.

4.5. Bakteri İzolatlarının API Yöntemi ile Tanımlanması

PCR yöntemiyle cins düzeyinde benzerliklerine göre tanımlanan izolatlar API test kiti kullanılarak tür/suş düzeyinde tanımlanmıştır. API test sonuçları izelge 4. 13’ de verilmiştir.

Çalışma sonucunda API test kiti ile tanımlaması yapılan suşların 62 adedi (%43.97) *Lactococcus* spp, 29 adedi (%20.57) *Lactobacillus* spp., 25 adedi (%17.73) *Enterococcus* spp., 17 adedi (% 12.06) *Leuconostoc* spp. ve 8 adedi ise (%5.67) *Pediococcus* spp. olarak tanımlanmıştır.

PCR kullanılarak cins düzeyinde tanımlanan toplam 62 adet *Lactococcus* spp. izolatın API test kiti ile tanımlanması sonucunda 50 adedi (%80.64) *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, 11 adedi (%17.74) *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ve 1 adedi ise *Lactococcus raffinolactis* (%1.61) olarak tanımlanırken; 25 *Enterococcus* spp. izolatın 12 adedi *Enterococcus faecium* (%48), 7 adedi *E. avium* (%28) ve 6 adedi ise *E. faecalis* (%24) olarak tanımlanmıştır. PCR alışması sonucu *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanan 29 izolatın ise API test kiti ile tanımlanması sonucunda 19

adedinin (%65.52) *Lactobacillus plantarum*, 4 adedinin (%13.79) *Lactobacillus rhamnosus*, 3 adedinin (%10.34) *Lactobacillus brevis*, 2 adedinin (%6.89) *Lactobacillus pentosus* ve 1 adedinin (%3.45) *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* olduğu bulunmuştur. Ayrıca *Pediococcus* sp. olarak tanımlanan 8 izolatın tamamı (%100) *Pediococcus pentosaceus* ve *Leuconostoc* spp. olarak tanımlanan 17 suşun ise sırasıyla 8'nin (%47.05) *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, 5'nin (%29.41) *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* ve 4'nn (%23.53) *Leuconostoc lactis* olduğu tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda, kültürlerden alınan izolatlarda hakim olan florayı *Lactococcus* sp. (1.sırada), *Lactobacillus* sp. (2.sırada) ve *Enterococcus* sp. (3. Sırada) grubu laktik asit bakterilerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

API test sonuçları ile rep-PCR sonuçları cins düzeyinde birbiriyle uyum içinde olduğu ve birebir örtüştüğü anlaşılmaktadır. Ancak, API testleri sonucunda tür düzeyinde tanımlanan LAB'nin suş düzeyinde tanımlanması için sekans analizi çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 4.13. Farklı geleneksel kültür ile telimesi haşlanan peynir floralarından alınan laktik asit bakterileri izolatlarının API test kiti kullanılarak tür/suş düzeyinde tanımlanması

Kültür Tipi	Toplam	<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> 1	<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> 2	<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> 3	<i>Lc. raffino</i> <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> sp. <i>cremoris</i>	<i>Ped. pentosaceus</i> 1	<i>Ped. pentosaceus</i> 2	<i>Lcu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> 1	<i>Lcu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> 2	<i>Lcu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> 3	<i>Lcu. lactis</i>	<i>Ent. faecium</i> 1	<i>Ent. faecium</i> 2	<i>Ent. avium</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. plantarum</i> 1	<i>Lb. plantarum</i> 2	<i>Lb. plantarum</i> 3
Termofilik DSK	44	10	4	3	0	3	0	1	0	2	4	0	3	3	3	0	0	1	0	1	1	4	1
Mezofilik MSS	44	8	2	0	0	4	1	1	1	1	1	3	1	3	2	2	0	1	3	2	5	0	1
Termofilik MSS	37	10	2	3	1	2	1	1	0	2	0	1	1	1	2	3	1	0	0	1	3	1	1
Telimesi haşlanan peynirler	16	6	1	1	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
Toplam	141	34	9	7	1	11	5	3	5	5	5	4	5	7	7	6	1	2	3	4	11	5	3
İhtimal (%)		98	95	97	99	93	89	90	98	97	88	98	99	99	99	98	97	99	97	98	98	97	97

DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteriyel kanamayı belli olmayan kültür

Geleneksel starter kültürler ile peynir florasını oluşturan tanımlı LAB temelinde dağılımı aşağıya çıkarılmıştır. Bu bağlamda, termofilik DSK kültürünün LAB florasından, 44 adet bakteri tanımlanmıştır. Bu bakterilerden 17 adet *Lc. lactis* ssp. *lactis* (tip 1, 2 ve 3), 3 adet *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 1 adet *Ped. pentosaceus*, 2 adet *Leu. mesenteroides*, 4 adet *Leu. dextranicum*, 6 adet *E. faecium* (tip 1, 2), 3 adet *E. avium*, 1 adet *Lb. pentosus*, 1 adet *Lb. rhamnosus* ve 6 adet *Lb. plantarum* (tip 1, 2, 3) tanımlanmıştır. Mezofilik MSS kültürünün LAB florasında, 44 adet bakteri tanımlanmıştır. Bu bakterilerden 10 adet *Lc. lactis* ssp. *lactis* (tip 1, 2), 4 adet *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 2 adet *Ped. pentosaceus* (tip 1, 2), 4 adet *Leu. mesenteroides*, 1 adet *Leu. dextranicum*, 3 adet *Leu. lactis*, 4 adet *E. faecium* (tip 1, 2), 2 adet *E. avium*, 2 adet *E. faecalis*, 1 adet *Lb. pentosus*, 2 adet *Lb. rhamnosus* ve 6 adet *Lb. plantarum* (tip 1, 3) tanımlanmıştır. Termofilik MSS kültürünün LAB florasında, 37 adet bakteri tanımlanmıştır. Bu bakterilerden 15 adet *Lc. lactis* ssp. *lactis* (tip 1, 2, 3), 1 adet *Lc. raffinolactis*, 2 adet *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 2 adet *Ped. pentosaceus* (tip 1, 2), 2 adet *Leu. mesenteroides*, 1 adet *Leu. lactis*, 2 adet *E. faecium* (tip 1, 2), 2 adet *E. avium*, 3 adet *E. faecalis*, 1 adet *Lb. paracasei*, 1 adet *Lb. rhamnosus* ve 5 adet *Lb. plantarum* (tip 1, 2, 3) tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre, geleneksel starter kültürlerin LAB florasında, *Lc. lactis* ssp. *lactis* bakterileri baskın olarak bulunmaktadır.

Telemesi haşlanan peynirlerin LAB florasında ise, 16 adet bakteri tanımlanmıştır. Bu bakterilerden 8 adet *Lc. lactis* ssp. *lactis* (tip 1, 2, 3), 2 adet *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 3 adet *Ped. pentosaceus* (tip 1), 1 adet *E. faecalis* ve 2 adet *Lb. plantarum* (tip 1) tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre telemesi haşlanan peynir florasında *Lc. lactis* ssp. *lactis* bakterileri baskın olarak yer almaktadır.

Elde edilen sonuçlar Avrupa'da, özellikle de Akdeniz havzasındaki ülkelerde hakim flora dağılımı ile benzerlik göstermektedir. Geleneksel olarak çiğ sütten üretilen peynirlerde hem üretim esnasında hem de olgunlaşma aşamasında *Enterococcus* cinsi bakterilerin sayısal yoğunlukları genellikle artış göstermektedir (Akoğlu, 2017; Giraffa, 2003; Andrighetto ve ark., 2001). Yapılan araştırmalarda *Enterococcus* cinsi bakterilerin taze peynirlerde yüksek oranlarda bulunmasına çiğ

süte direkt fekal kaynaklı bulaşmanın veya indirekt olarak sütçülük ekipmanları ve süt depolama tanklarından kaynaklanan bulaşmaların neden olarak gösterilmektedir (Giraffa, 2003). Yapılan bir çalışmada çığ sütten üretilen 13 adet peynir örneğinden izole edilen ve biyokimyasal ve API test kiti ile tanımlanan 83 adet LAB suşunun başlangıç kültür olma özellikleri belirlenmiştir. Bu izolatlardan, 22'nin *Lactococcus* sp., 36'nın *Enterococcus* sp. ve 25'nin ise *Lactobacillus* sp. olarak tanımlandığı bildirilmiştir (Turhan, 2014).

Yüksek tuz ve asitlik dirençlerinden dolayı *Enterococcus* cinsi bakterilerin olgunlaşmanın ileri dönemlerinde peynir florasında yer almakta ve olgunlaşma süresine göre peynirde 6-8 log kob/g düzeylerinde bulunabilmektedir (Clementi ve ark., 1998). *Enterococcus* cinsi bakteriler, Akdeniz kuşağında hem çığ sütten hem de pastörize sütten geleneksel olarak üretilen peynirlerde yaygın olarak bulunmaktadır (Andrighetto ve ark., 2001; Giraffa, 2003; Suzzi ve ark., 2000). *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* peynir florasında en sık rastlanan *Enterococcus* türleridir ve peynirlerin tekstür ve tat aroma gelişimde önemli rol oynamaktadırlar (Akoğlu, 2017; Rodriguez ve ark., 1995; Cogan ve ark., 1997; Giraffa, 2003). Bu özelliklerinden dolayı bazı AB lkelerinde peynir (Feta, Mozzarella ve Cebreiro) retiminde kullanılan starter kültür kombinasyonunda yer almaktadır (Akoğlu, 2017; Sarantinopoulos ve ark., 2002; Villani ve Coppola, 1994; Mendez ve ark., 2001). Güney Avrupa lkelerinde geleneksel olarak çığ koyun sütünden üretilen birçok peynirin florasında *Lactococcus* spp. türü bakteriler baskın olarak bulunmaktadır (Torres-Llanez ve ark., 2006; Estepar ve ark., 1999; Rodriguez ve ark., 1995).

Tanımlanan *Lactobacillus* cinsi bakteriler (*Lactobacillus* spp., *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*) starter olmayan laktik asit bakteri grubu içerisinde değerlendirilmektedir. Bu grup bakteriler çığ süt florasında yer almaktadır ve özellikle uzun süreli olgunlaştırılan peynirlerde aroma gelişimde önemli role sahip oldukları bilinmektedir (Beresford ve ark., 2001; Turgut, 2012). Fox ve ark. (1998) 3 aydan daha uzun süre olgunlaştırılan peynirlerde bu grup bakteri sayısının en üst seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Zlatar peyniri gibi bazı geleneksel peynirlerde olgunlaşmanın başlangıcında düşük seviyelerde bulunan *Lactobacillus* spp. grubu

bakterilerin sayısında olgunlaşma sonuna doğru belirgin bir artış gözlendiği belirlenmiştir (Velijovic ve ark., 2007) .

Çalışmamızda bulduğumuz *Lb. plantarum* tip 1, 2 ve 3 türü bakteriler starter kültür bakterisi olmayıp destek kültür olarak kullanılan bakterilerdir. Bu grup bakteriler *Streptobacterium* grubunda yer alırlar. Yani fakültatif heterofermantatiflerdir. Yine aynı şekilde *Lb. paracasei ssp. paracasei* ve *Lb. pentosus* bakteri türleri de fakültatif heterofermantatif olan *streptobacterium* grubunda yer almaktadırlar. *Lb. brevis* türü bakteriler ise *betabacterium* grubunda yer almaktadır. Bu yöreye ait süt ürünlerinde bu tür bakterilerin görülmesi dikkat çekmiştir. Aroma farklılığının bu bakteriler sayesinde olduğu düşünülmektedir.

4.6. Tanımlanan Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik zellikleri

4.6.1. Antagonistik aktivite

Bakteriyosinler, protein doğasında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Tagg ve ark., 1976). Bu tür bakteriler ürettikleri bakteriyoinlerle hedef bakteriyi inaktive ya da inhibe etmektedirler. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı inhibisyon etkisi gösterirler (Jack ve ark., 1995). Fermente ya da taze gıdalarda bulunan çok sayıda laktik asit bakterisi farklı bakteriyosinler üretebilmektedir (Cleveland ve ark., 2001). Örneğin; *Lc. lactis* bakterisi, nisin, laktisin 481 ve laktokoksin G; *Leu. mesenteroides* bakterisi mesenterisin Y105; *Lb. helveticus* bakterisi helvetisin J; *E. faecium* bakterisi Enterosin P, Enterosin B, Enterosin A gibi farklı türlerde bakteriyosinler üretebilmektedir.

Bu araştırmada tanımlı LAB'nin antagonistik aktiviteleri petri plaklarında test edilmiştir (Çizelge 4.13). Tanımlı LAB, uygun sıvı besiyerine (MRS broth veya M17 broth) %1 oranında inoküle edilmiş ve 28/42 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha

sonra M17 ve MRS agar üzerine inoküle edilen bakterilerin indikatör suş olarak *E. coli* bakterisine karşı oluşturdukları zonlar bakteriyosin aktivitesi olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir florasından tanımlanan laktik asit bakterilerinin asitlik oluşturma kapasiteleri ile *E. coli* bakterisine karşı gsterdikleri antagonistik aktiviteleri

No	Tr	İnkbasyon sresi (saat)				Antagonistik aktivite (Zon apı, mm)
		0.	4.	6.	24.	
1	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	6.35	6.30	6.29	5.08	24
2	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	6.29	6.28	6.25	5.05	24
3	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	6.28	6.21	6.10	5.20	22
4	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	6.30	6.29	6.26	5.18	21
5	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 3	6.32	6.30	6.27	5.04	25
6	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 3	6.31	6.29	6.27	5.06	27
7	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 3	6.27	6.20	6.16	5.06	25
8	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	6.38	6.00	5.77	4.68	25
9	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	6.39	6.36	6.33	4.79	24
10	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> 1	6.36	6.32	6.30	4.95	25
11	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> 2	6.30	6.25	6.21	5.08	28
12	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> 1	6.39	6.34	6.31	5.06	30
13	<i>Leu. lactis</i>	6.40	6.37	6.34	4.25	26
14	<i>Leu. lactis</i>	6.49	5.86	5.25	4.23	26
15	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	6.34	6.26	6.21	4.34	38
16	<i>Lb. plantarum</i> 1	6.10	5.75	5.62	4.03	20
17	<i>Lb. plantarum</i> 1	6.15	5.49	5.14	3.95	18
18	<i>Lb. plantarum</i> 2	6.16	5.69	5.42	4.10	23
19	<i>Lb. plantarum</i> 3	6.38	6.31	6.30	4.38	28
20	<i>Lb. plantarum</i> 3	6.40	6.32	6.28	4.35	26

Farklı geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynir florasından tanımlanan ve *E. coli* bakterisi üzerinde antagonistik etki gösteren LAB suşları ve oluşturdukları zon apı Çizelge 4. 14’ te verilmiştir. Şekil 4.2’ de ise geleneksel starter kültürler ile peynir florasından tanımlanan LAB’nin *E.coli* bakterisini geliőmesini engellediği ifade eden zon görüntüsü yer almaktadır.

Antagonistik aktivite gösteren izolatlardan 2 adedi *Lc. lactis* ssp. *lactis* tip 1, 2 adedi *Lc. lactis* ssp. *lactis* tip 2 ve 3 adedi *Lc. lactis* ssp. *lactis* tip 3 olmak üzere toplam 7 adet *Lactococcus lactis* ssp., 2 adedi *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 1 adedi *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* tip 1, 1 adedi *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* tip 2, 1 adedi *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* tip 1, 2 adedi *Leu. lactis*, 2 adedi *Lb. plantarum* tip 1, 1 adedi *Lb. plantarum* tip 2 ve 2 adedi *Lb. plantarum* tip 3 olmak üzere toplam 5 adedi *Lb. plantarum* ve 1 adedi ise *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* olarak tanımlanmıştır (izelge. 4.13).

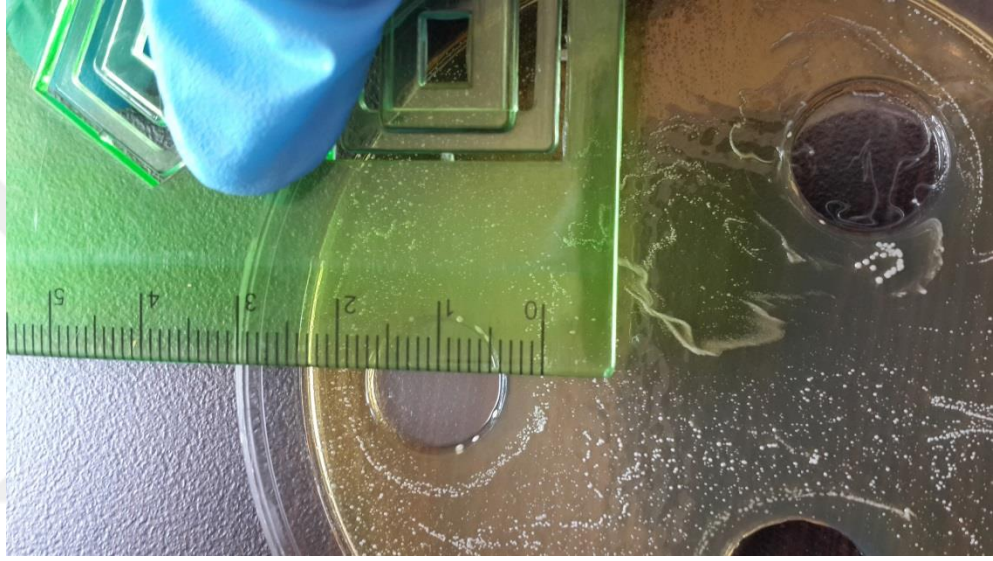
Tanımlanan bakterilerden *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* bakterilerinin *E. coli* bakterisine karşı en iyi antagonistik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar ve *Lactobacillus* türü bakterilerin söz konusu geleneksel peynirin hijyenik kalitesinin düzeltilmesi amacıyla kullanılabileceği başka çalışmalarda da bildirilmiştir (Caridi, 2003).

Gonzales ve ark. (2007) geleneksel İspanyol peyniri olan Genestoso peynirinden izole ettikleri ve tanımladıkları 395 izolattan 24' ünün indikatör suşlara karşı bakteriyosin aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu suşlardan 13' n *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 5' ini *E. faecium*, 2' şer tanesini *Leu. mesenteroides* ve *Lb. paracasei*, 1' er tanesini de *Leu. pseudomesenteroides* ve *Lb. plantarum* olarak tanımlamışlardır. Bir başka araştırmada Casla ve ark. (1996) İspanya' da geleneksel peynirlerden ve çiğ keçi sütlerinden izole ettikleri 203 adet laktik asit bakterisinin antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırıcılar, yalnızca 2 adet *Lc. lactis*, 1 adet *E. faecalis* ve 1 adet *Lb. curvatus* suşunun bakteriyosin benzeri maddeler ürettiğini belirlemişlerdir.

Tanımlı laktik asit bakteri suşlarından toplam 20 adet suş *E. coli* bakterisine karşı büyük zonlar oluşturdukları tespit edilmiştir (izelge 4.13). şekil 4.2' de *E. coli* bakterisine karşı oluşan zonun fotoğrafı verilmiştir.

4.6.2. Asit retimi

Laktik asit bakterileri homofermentatif ya da heterofermentatif olarak karbonhidratı metabolize ederek laktik asit üretmeleri sonucu ortamın asitliğinde yükselmeye neden olurlar. Asitlikte meydana gelen bu artış, peynirin tat- aroma ve tekstür özelliklerinde önemli değişimlere neden olmaktadır. Bundan dolayı laktik asit bakterilerinin asit üretme özellikleri süt endüstrisinde önem teşkil etmektedir.



Şekil 4.2. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir floralarından alınan tanımlı laktik asit bakterinin *E. coli* bakterisine karşı oluşturdukları antagonistik aktivite (zon apı)

Bu amaçla, hem süt hem de Nutrient Broth besiyerinde asit üretme kapasiteleri test edilmiştir. Elde edilen sonuçların birbiriyle paralel oldukları tespit edilmiştir. Süt teknolojisinde, bakterilerin sütte gelişebilmeleri önem taşıdığından dolayı, rekonstitüe süt kullanılarak elde edilen sonuçlar bu çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Bu bağlamda tanımlanan LAB türleri rekonstitüe sütte asitlik oluşturma kapasiteleri açısından, 5 farklı gruba ayrılmıştır (izelge 4.14).

Çizelge 4.14. Farklı geleneksel kültür ile telemesi haşlanan peynir florasından tanımlanan laktik asit bakterilerinin rekonstitüe sütte inkübasyonu sonucu oluşan gruplar

Kültür Tipi	1. Grup		2. Grup		3. Grup		4. Grup		5. Grup	
	6.saat	24.saat	6.saat	24.saat	6.saat	24.saat	6.saat	24.saat	6.saat	24.saat
Termofilik DSK	0	23	1	20	4	1	3	0	36	0
Mezofilik MSS	0	30	0	14	1	0	7	0	35	0
Termofilik MSS	0	22	0	13	1	2	9	0	27	0
Telemesi haşlanan peynirler	0	12	1	4	2	0	6	0	7	0
Toplam	0	87	2	51	8	3	25	0	105	0

DSK: doğal süt kültürü; MSS: bakteri karışımı belli olmayan kültür

Tr/suş düzeyinde tanımlanan LAB saf izolatu (%1, v/v) sterilize rekonstitüe sütte (100 g/lt) inoküle edildikten sonra 30/42 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresince 0., 2., 4., 6. ve 24. saat, sütün gelişen asitliği (pH) olęlmřtir. Daha sonra sütün gelişen asitliğine göre tanımlı bakteri kültürü inkübasyonun 6. ve 24. saatlerinde, 4.00–4.50 (1. grup), 4.51–5.00 (2. grup), 5.01–5.50 (3. grup), 5.51–6.00 (4. grup) ve 6.01–6.50 (5. grup) aralığında gruplandırılmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelgeden de görüldüğü gibi tanımlı LAB inkübasyon periyodunun 6. saatinde, 2 adet tanımlı LAB 2. grupta; 8 adet LAB 3. grupta; 25 adet LAB 4. grupta ve 105 adet LAB ise 5. grupta yer almıştır. Inkübasyon periyodunun 24. saatinde ise, 87 adet tanımlı LAB 1. grup; 51 adet LAB kültürü 2. grup; 3 adet LAB kültürü ise 3. grup içinde sınıflandırılmıştır.

Cogan ve ark. (1997) 1582 adet *Lactococcus* ve 482 adet mezofilik *Lactobacillus* izolatının, sırasıyla sadece %8 ve %2’nin 30 °C’de 6 saatte sütün pH’sını <5.3’e dşrebildikleri; *Str. thermophilus*, termofilik *lactobacillus* ve *enterococcus* izolatlarının ise sırasıyla, %53, %32 ve %13’ünün aynı şartlarda (30 °C, 6 saat) sütün pH’sını <5.3 değerine indirebildiklerini saptamışlardır. Araştırıcılar, bazı izolatların fermente süt ürünlerinin üretimi için potansiyel yeni starter olabileceğini de ifade etmişlerdir. Herreros ve ark. (2003) ise yaptıkları araştırmada, inkübasyon sonunda ≥ 2.5 mg/mL üzerinde laktik asit üretebilen *Lc. lactis* subsp.

lactis suşlarının peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceklerini belirtmiştir.

Geleneksel peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin teknolojik özellikleri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Coppola ve ark. (2003) Caciocavallo peynirlerinden elde ettikleri laktik asit bakteri izolatlarının % 80' inin MRS broth ve süt pH' ını 3.5-4.5 düzeyine kadar düşürdüğünü belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, geleneksel olarak üretilen Mozzarella peynirlerinden izole edilen LAB arasında, *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Str. thermophilus* suşları en yüksek asit üretme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (Morea ve ark., 1999). Bir diğer çalışmada ise Tenerife peynirlerinden izole edilen toplam 130 laktik asit bakterisinden *Lactococcus* sp. bakteriler, özellikle *Lc. lactis* spp. *lactis* bakterisinin en yüksek asidifikasyon özelliğini gösterdiği; *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* bakteri suşlarının ise düşük düzeyde asit ürettikleri tespit edilmiştir (Perez ve ark., 2003).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerindeki farklı süt işletmelerinden çiğ süt ile telemesi haşlanan peynir örnekleri toplanmıştır. İşletmelerden elde edilen çiğ süt örneklerinden geleneksel starter kültürler (termofilik DSK, termofilik MSS ve mezofilik MSS) üretilmiştir. Üretilen bu kültürler ile peynir florasının laktik asit bakteri yükleri ve istenmeyen kontaminant yükü araştırılmıştır. Ayrıca, kültürler ile peynirin florasından alınan LAB izolatları tür düzeyinde tanımlanmış ve bazı teknolojik özellikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, üretilen geleneksel starter kültürler laktik asit bakteri yükleri açısından yöresel peynirlerimizin üretiminde kullanılabilecek uygunlukta oldukları söylenebilir. Ancak, istenmeyen kontaminant yükleri açısından aynı durum söz konusu değildir. Bu nedenle mevzuatta (Anonim, 2012) belirtilen hijyen ve sanitasyon kurallarına uyularak üretilen ve mikrobiyolojik yükü bakımından uygun olan çiğ sütün geleneksel starter kültür üretiminde kullanılması durumunda, bu kültürlerin istenmeyen kontaminant açısından pasta filata tip (Kaşar, Diyarbakır Örgü, Lavaş, Yaprak peynirleri gibi) yöresel peynirlerimizin pastörize süttten yapılan üretimlerinde güvenli bir şekilde kullanılabilecektir. Bu şekilde geleneksel starter kültürler kullanılarak üretilecek yöresel peynirlerimizin tat-aroma ve tekstür açısından tüketici beğenisini kazanacağı, ayrıca tüketici sağlığı açısından riskin minimize olacağı, ayrıca güvenilirlik riskinin minimizasyonu için olgunlaşma periyodunun kısılacağı düşünülmektedir.

Geleneksel starter kültürler ile telemesi haşlanan peynirin LAB florasından alınan izolatların (toplam 141 adet) rep-PCR ve API test kiti ile çalışılması sonucunda, 62 adet *Lactococcus* sp., 29 adet *Lactobacillus* sp., 25 adet *Enterococcus* sp., 17 adet *Leuconostoc* sp. ve 8 adet *Pediococcus* sp. tanımlanmıştır. Tanımlanan *Lactococcus* cinsi bakterilerden 50 adedinin *Lc. lactis* spp. *lactis*, 11 adedinin *Lc. lactis* spp. *cremoris* ve 1 adedinin ise *Lc. raffinolactis*; *Lactobacillus* cinsi bakterilerden 19 adedinin *Lb. plantarum*, 4 adedinin *Lb. rhamnosus*, 3 adedinin *Lb.*

brevis, 2 adedinin *Lb. pentosus* ve 1 adedinin *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*; *Enterococcus* cinsi bakterilerin 12 adedinin *E. faecium*, 7 adedinin *E. avium* ve 6 adedinin *E. faecalis*; *Leuconostoc* cinsi bakterilerden 8 adedinin *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, 5 adedinin *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* ve 4 adedinin *Leu. lactis*; *Pediococcus* cinsi bakterilerin tamamının *Ped. pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, geleneksel starter kültürlerde hakim olan florayı *Lactococcus* sp. (1.sırada), *Lactobacillus* sp. (2.sırada) ve *Enterococcus* sp. (3. sırada) cinsi laktik asit bakterilerinin oluşturduğu; telemesi haşlanan peynirlerde ise hakim flora olarak 1. sırada *Lactococcus* sp., 2. sırada *Pediococcus* sp., 3. sırada *Lactobacillus* sp. cinsi LAB oluşturmuştur. Tanımlanan *Lactococcus* sp. cinsi bakterilerin %80.64'ü *Lc. lactis* spp. *lactis* türü bakterilerden oluşmaktadır. *Lc. lactis* spp. *lactis* türü bakteri, geleneksel peynirlerde *Lc. lactis* spp. *cremoris* ile birlikte doğal flora içerisinde yer aldığı, peynirde aroma gelişimi başta olmak üzere bazı spesifik etkilere sahip oldukları düşünülmektedir.

Araştırmamızda *Lactobacillus* sp. cinsi bakterilerin geleneksel kültürlerden izole edilen laktik asit bakteri florasında yüksek sayıda bulunmasının önemli olduğu düşünülmektedir. *Lactobacillus* sp. cinsi bakteriler içinde *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. brevis*, *Lb.pentosus* ve *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* türlerinin görülmesi dikkat çekmiştir. Bu tür bakteriler süt ürünlerinde de bulunmakla birlikte fermente gıdalar, bitkisel materyaller ve insan ve hayvan gastrointestinal yapılarda yaygın olarak bulunmaktadırlar. *Lactobacillus* sp. cinsi bakterilerin, geleneksel peynirlerde *Lc. lactis* ile birlikte doğal flora içerisinde yer aldığı belirlenirken peynirde aroma gelişimi başta olmak üzere antagonistik etki gibi bazı spesifik etkilere de sahip olduğu düşünülmektedir.

Enterococcus sp. cinsi bakterilerin laktik asit bakteri florasında yüksek düzeyde bulunması, bu bakteri türüne ait birçok suşunun düşük pH ve sıcaklık ile yüksek tuz konsantrasyonuna karşı dirençli olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca çiğ sütün sağım ve işleme aşamalarında yeterli düzeyde hijyenik şartlara dikkat edilmediğinden dolayı bu tür bakterilerin gelişimine imkan sağladığı düşünülmektedir.

Tanımlanan LAB cinsi bakterilerden *Enterococcus* cinsi bakterilerin 10 ve 45 °C’de ve 65 g NaCl/L tuz konsantrasyonunda gelişim gösterdiği; *Lactococcus* sp. cinsi 32 adet bakteri 40 gr/L tuz içeren besiyerinde gelişme performansı göstermişlerdir. Başka bir deyişle, yüksek tuz konsantrasyonları içeren ortamlarda çoğalmışlardır. Bu durum, peynir teknolojisi açısından önem taşımaktadır. Ancak 65 gr/L tuz içeren besiyerinde hiçbir *Lactococcus* sp. grubu bakteri gelişme performansı gösterememiştir.

Tanımlı laktik asit bakterilerinin *E. coli* bakterisine karşı antagonistik aktivite gösteren izolatlardan 7 adedinin *Lc. lactis* ssp. *lactis*, 2 adedinin *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, 1 adedinin *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* tip 1, 1 adedinin *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* tip 2, 1 adedinin *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* tip 1, 2 adedinin *Leu. lactis*, 2 adedinin *Lb. plantarum* tip 1, 1 adedinin *Lb. plantarum* tip 2 ve 2 adedinin *Lb. plantarum* tip 3, olmak üzere toplam 5 adedinin *Lb. plantarum* ve 1 adedinin ise *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* olduğu tespit edilmiştir. Antagonistik aktiviteleri tespit edilen bu bakteri suşlarının DSS tipi starter kültür kombinasyonlarında yer alabileceği düşünülmektedir. DSS tipi starter kültür kombinasyonlarında yer alabilecek *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp. ve *Leuconostoc* sp. bakteri türlerinin öncelikle lipolitik ve proteolitik aktiviteleri ile simbiyotik ilişkileri çalışılmalı, özellikle geleneksel peynir üretim denemelerinde kullanılabilecek DSS tipi starter kombinasyonlarında yer verilmeli ve oluşturulacak kombinasyonlarının peynir üretimi denemelerinde kullanılarak karakteristik tat-aroma ve tekstür bakımından değerlendirilmeli ve yöresel peynirlerin endüstriyel üretimlerine uygunlukları ile ilgili çalışmalara öncelik verilmektedir.

KAYNAKLAR

- ACCOLAS, J. P. and AUCLAÏR, J. 1983. Thermophilic lactic starters. Irish J. Food Sci. Tech., 7: 27-38.
- ADDEO, F. and COPPOLA, S., 1983. Technological and Microbiological Aspects of the Manufacture of Mozzarella and Ricotta Cheese from Water-buffalo Milk. II Latte, 8:706-723.
- ADIGÜZEL, G. C. ve ATASEVER, M., 2009. Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Dry Fermented Sausage. Romanian Biotechnological Letters., 14: 4130-4138.
- AKOĞLU, A., YAMAN, H., COŞKUN, H. ve SARI, K., 2017. Mengen Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 21 (2):453-459.
- ALBAYRAK, Ç. B. 2017. Antifungal Aktivite Üreten Laktik Asit Bakterileri ADÜ Ziraat Derg.,14(1):79-85.
- ANDRIGHETTO, C., KNIJFF, E., LOMBARDI, A., TORRIANI, S., VANCANNEYT, M., KERSTERS, K., SWINGS, J. and DELLAGLIO, F., 2001. Phenotypic and Genetic Diversity of *Enterococci* Isolated from Italian Cheeses. Journal of Dairy Research, 68:303-316.
- ANONİM, 2012. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmi Gazete, Sayı : 28157, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- ANONİM, 2005. <http://www.kentmaras.com/makale/ilk.php>., Erişim Tarihi: 28.06.2017.
- ANONİM, 2018. www.biomerieux.com. BIOMÉRIEUX® sa au capital de 11 879 045 € 673 620 399 RCS LYON 69280 Marcy-l'Etoile / France api® 50 CH 07945F - tr - 2002/11. BIOMÉRIEUX® sa au capital de 11 879 045 € 673 620 399 RCS LYON 69280 Marcy-l'Etoile / France api® 20 Strep 07625F - tr - 2004/08
- ANTONSSON, M., MOLIN, G. and ARDÖ, Y., 2003. Lactobacillus strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. International Journal of Food Microbiology, 85: 159– 169.
- AXELSSON L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. in: Salminen, S.von Wright, A. and Ouwehand A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- AYAD, E. H. E., VERHAUL, A., BRUINENBERG, P., WOUTERS, J. T. M. and SMIT, G., 2003. Starter Culture Development for Improving the Flavour of Proosdij-Type Cheese. Int. Dairy J., 13:159-168.
- AYAD, E. H. E., NASHAT, S., EL- SADEK, N., METWALY, H. and EL-SODA, M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional

- Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food Microbiology, 21: 715-725.
- BALLESTEROS, C., POVEDA, J. M., GONZALES-VINAS, M. A. and CABEZAS, L. 2006. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. Food Control., 17: 249-255.
- BANWART GJ., 1989. Basic Food Microbiology. AVI Book, Published by Von Nosrand Reinhold, New York., p. 773.
- BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L. and COGAN T. M., 2001. Recent Advances in Cheese Microbiology. International Dairy Journal., 11: 259–274.
- BOUTON, Y., GUYOT, P. and GRAPPIN, R., 1998. Preliminary Characterization of Microflora of Comte Cheese. Journal of Applied Microbiology., 85: 123-131.
- BOUTON, Y., GUYOT, P., BEUVIER, E., TAILLIEZ, P. and GRAPPIN, R., 2002. Use of PCR-Based Methods and PFGE for Typing and Monitoring Homofermentative *Lactobacilli* During Comte Cheese Ripening. International Journal Food Microbiology, 76: 27-38.
- CANDIOTI, M. C., HYNES, E., QUIBERONI, A., PALMA, S. B., SABBAG, N., ZALAZAR, C. A., 2002. *Reggianito Argentino Cheese: Influence of Lactobacillus helveticus* Starins Isolated from Natural Whey Cultures on Cheese Making and Ripening Process. Int. Dairy J., 12:923-931.
- CARIDI, A., 2003. Identification and First Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisanal Ovine Cheese Perorino del Poro. Int. J. Dairy Tech., 56:105-110.
- CARR, F. J., CHILL, D. and MAIDA, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, Critical Reviews in Microbiology, 28:281–370.
- CASLA, D., REQUENA, T. and GO'MEZ, R., 1996. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat's Milk and Artisanal Cheeses: Characteristics of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. Journal of Applied Bacteriology, 81: 35-41.
- CHURCH, F. C., SWAISGOOD, H. E., PORTER, D. H., CATIGNANI, G. L., 1983. Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. J. Dairy Sci., 66: 1219-1227.
- CLEMENTI, F., CENCIG. B. T., TRABALZA M. M. and Di ANTONIO E., 1998. Use of Selected Starter Cultures in the Production of Farm Manufactured Goat Cheese From Thermized Milk. Italian Journal Food Science, 10: 41–56.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F. AND CHINKINDAS, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71: 1-20.
- COEURET, V., DUBERNET, S., BERNARDEAU, M., GUEGUEN, M. and VERNOUX, J. P., 2003. Isolation, Characterisation and Identification of *Lactobacilli* Focusing Mainly on Cheeses and Other Dairy Products, Lait, 83:269-306.

- COGAN, T. M., 1995. History and Taxonomy of Starter Cultures. In: Dairy Starter Cultures, Eds. T. Cogan ve J.P. Accolas. VCH Publishers, New York, pp. 1–24.
- COGAN, T.M. and ACCOLAS, J.P. 1996. Food, Science and Technology. In: Dairy Starter Cultures, Eds. T. Cogan ve J.P. Accolas. VCH Publisher, New York, pp. 43.
- COGAN, T. M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P. S., FERNANDES, I., GOMEZ, J., GOMEZ, R., KALANTZOPOULUS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M. C. and RODRIGUEZ, E., 1997. Characterisation of the Lactic Acid Bacteria in Artisanal Dairy Products. J. Dairy Res., 64:409-421.
- COLLINS, M. D., RODRIGUES, C., ASH, C., AGUIRRE, M., FARROW, J. A. E., MARTINEZ-MURCIA, A. J., PHILIPS, B. A., WILLIAMS, A. M. and WALLBANKS, S. , 1991. Phylogenetic Analysis of The Genus *Lactobacillus* and Lactic Acid Bacteria as Determined by Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett., 77: 5-12.
- COPPOLA, S., PARENTE, E., DUMONTET, E. S. and LA PECCERELLA, A., 1988. The Microflora of Natural Whey Cultures Utilized as Starters in the Manufacture of Mozzarella Cheese from Water-Buffered Milk. Le Lait, 68:295-310.
- COPPOLA, R., SUCCI, M., SORRENTINO, E., IORIZZO, M. and GRAZIA, L., 2003. Survey of Lactic Acid Bacteria During the Ripening of Caciocavallo Cheese Produced in Molise. Lait, 83: 211-222.
- CONCONCELLI, P. S., PARISI, M. G., SENINI, L. and BOTTAZZI, V., 1997. Use of RAPD and 16S rDNA Sequencing for The Study of *Lactobacillus* Population Dynamics in Natural Whey Culture. Letters in Applied Microbiology., 25: 8-12.
- ÇELİK, Ş., ERDOĞAN, A. ve GÜRSES, M., 2005. Geleneksel Taze Örgü Peynirinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması. GAP IV. Tarım Kongresi. 21-23 Eylül 2005, Şanlıurfa, s. 5-7.
- ÇELİK, Ş., DURMAZ, H., UYSAL, Ş. ve ŞENOCAK, G., 2008. Dil Peyniri Üretiminde Doğal Termofilik Peyniraltı Suyu Kültürünün Kullanım Olanağının Araştırılması, TUBİTAK TOVAG 107O274 nolu proje raporu
- ÇELİK, Ş., ve UYSAL, Ş., 2009. Beyaz Peynirin Bileşim, Kalite, Mikroflora ve Olgunlaşması. Atatürk Üniv.Ziraat Fak. Derg., 40 (1):141-151.
- ÇETİN, A. E., 2002. Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria From Raw Milk. A Dissertation Submitted to The Graduate School in Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree of Master of Science. Biotechnology and Bioengineering Department. Izmir Institute of Technology.
- ÇON A. H. ve GÖKALP H. Y., 1994. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. Turk Mikrobiyol Cem Derg., 30: 180-190.

- DAVIDSON PM, HOOVER DG., 1993. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. "Salminen, S. and von Wright, a. (ed): Lactic Acid Bacteria". Marcel Dekker Inc. New York, p. 127.
- DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., TOSTI, N., ROSSI, J., CORBO, M. R. and GOBBETTI, M., 2001. Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria From Italian Ewe Cheeses Based On Phenotypic, Genotypic and Cell Wall Protein Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2011-2020.
- DE BRUIJN, F. J. 1992. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) Sequences and The Polymerase Chain Reaction to Fingerprint The Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2180-2187.
- DEMİR, E., KAYGUSUZ, E., KILIÇ, G., YÜCE, S. ve SOYUÇOK, A., 2017. Yoğurt Örneklerinden İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit Üretimlerinin Belirlenmesi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8 (Ek Sayı 1): 262-267.
- DEMİRGÜL, F. ve SAĞDIÇ, O., 2018. Laktik Starter Kültür Üretim Teknolojisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(11): 27-37.
- DE URRIZA, P. J., ZAVAGLIA, A. G., LOZANO, M. E., ROMANOWSKI, V. and DE ANTONI, G. L., 2000. DNA Fingerprinting of Thermophilic Lactic Acid Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Research*, 67: 381-392.
- DIAZ, T.M. L., ALONSO, C., ROMAN, C., LOPEZ, M. L. G. and MORENO, B. 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, 17 (1): 23-32.
- DILSİZ, N., 2009. DNA' nın Görüntülenmesi ve İzolasyonunda Kullanılan Agaroz Jel Elektroforezi. *Moleküler Biyoloji*. Palme Yayıncılık, Ankara, 58s.
- DOLCI, P., ALESSANDRIA, V., ZEPPA, G., RANTSIOU, K. and COCOLIN, L., 2008. Microbiological Characterization of Artisanal Raschera PDO Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 25: 392-399.
- DRAKE, M., SMALL, C. L., SPENCE, K. D. and SWANSON, B. G., 1996. Rapid Detection and Identification of *Lactobacillus* spp. in Dairy Products by Using The Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food Protection*, 59: 1031-1036.
- DUAN, Y., TAN, Z., WANG, Y., LI, Z., QOIN, G, HUO, Y., CAI, Y., 2007. Identification And Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Tibetan Qula Cheese. *J. Gen. Microbiol.*, 54:51-60.
- DÜZ, M., FİDAN, A. F., 2016. Biyojen Aminler ve Etkileri. *Kocatepe Vet. J.*, 9 (2): 114-121.

- EL-DIN, B., B., EL-SODA, M. and EZZAT, N., 2002. Proteolytic, Lipolytic and Autolytic Activities of Enterococci Strains Isolated from Egyptian Dairy Products. *Lait*, 82: 289-304.
- ELMALI, G. ve UYLAŞER, V., 2012. Geleneksel Gıdalardan Çeçil Peynirinin Üretimi ve Özellikleri. *U.U. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26(1): 83-92.
- ERCİŞLİ, S., ORHAN, E., YILDIRIM, N. ve AĞAR, G., 2008. Comparison of Sea Buckthorn Genotypes (*Hippophae rhamnoides* L.) Based on RAPD and FAME Data. *Türk J Agric For TUBITAK*, 32: 363-368.
- ERDOĞRUL, Ö. ve ERBİLİR, F., 2006. Çeşitli Gıdalardan İzole Edilen *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus casei* 'nin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Türk J. Biol.*, 30: 39-44.
- ERGİNKAYA, Z. ve HAYALOĞLU, A. A., 2001. 'Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri' Gıda Teknolojisi Derneği Adana, 23s
- ERKUŞ, O., 2007. Yoğurt Kültürlerinin İzolasyonu, Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. İzmir Teknoloji Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, 78s.
- ERTEKİN, Ö., 2007. Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Nümerik Taksonomisi. Pamukkale Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 176s.
- ERTÜRKMEN, P., ve ÖNER, Z., 2015. Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi., 19 (3): 9-16.
- ESTEPAR, J., SANCHEZ, M. M., ALONSO, L. and MAYO, B., 1999. Biochemical and Microbiological Characterization of Artisanal "Peñamellera" Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 9: 737-746.
- FENDERYA, S., AKALIN, A.S., 2003. Probiyotik Yoğurtların Bazı Kimyasal Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg., 40(1): 87-94.
- FITZGERALD, G. F. ve HILL, C., 1996. Genetics of Starter Cultures. In: *Dairy Starter Cultures*, Eds. T. Cogan ve J.P. Accolas. VCH Publishers, New York, Pp. 25-26.
- FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. ve LYNCH, C. M., 1998. Significance of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Cheddar Cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53: 83-88.
- FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. 2004. Cheese: An Overview. In: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* (Ed. Fox ve McSweeney), Elsevier Academic Press London, UK., 1-16.
- FOULQUIE MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L., 2006. The Role and Application of Enterococci In Food and Health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106 : 1-24.

- FRANCIOSI, E., SETTANNI, L., CAVAZZA, A. and POZNANSKI, E., 2008. Biodiversity and Technological Potential of Wild Lactic Acid Bacteria from Raw Cow's Milk. *International Dairy Journal*, 19: 3-11.
- FRANZ, C. M. A. P., STILES, M. E., SCHLEIFER, K. H. and HOLZAPFEL, W. H. 2003. Enterococci In Foods a Conundrum for Food Safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:105–122.
- GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CODON, S.; SWINGS, J. and COGAN, T., M.; 2001. Enterococcal Diversity in the Environment of an Irish Cheddar-type Cheesemaking Factory. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 177-188.
- GERASI, E., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. and TZENATAKIS, N., 2003. Microbiological Study of Manura, a Hard Cheese Made from Raw Ovine Milk in the Greek Island Sifnos. *Int. J. Dairy Tech.*, 52:117-122.
- GEORGHIOU, P. R., HAMILL, R. J., WRIGHT, C. E., VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., WATSON, D. A. and LUPSKI, J. R. 1995. Molecular Epidemiology of Infections Due to *Enterobacter aerogenes*: Identification of Hospital Outbreak-Associated Strains by Molecular Techniques. *Clinical and Infectious Disease.*, 20: 84-94.
- GEVERS, D., HUYS, G. and SWINGS, J., 2001. Applicability of rep-PCR Fingerprinting for Identification of *Lactobacillus* Species. *FEMS Microbiology Letters.*, 205: 31-36.
- GIRAFFA, G., MUCCHETTI, G., ADDEO, F. and NEVIANI, E., 1997. Evaluation of Lactic Acid Microflora During Grana Cheese Making and Ripening. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 15:115-122.
- GIRAFFA, G., ROSSETTI, L. and NEVIANI, E., 2000. An Evaluation of Chelex-Based DNA Purification Protocols for the Typing of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 175–184.
- GIRAFFA, G. 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 215– 222.
- GIRAFFA, G. and ROSSETTI, L., 2004. Monitoring of the Bacterial Composition of Dairy Starter Cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 133–138.
- GOBBETTI, M., MOREA, M., BARUZZI, F. CORBO, M.R., MATARANTE, A., CONSIDINE, T., DI CAGNO, R., GUINEE, T. and FOX, P. F., 2002. Microbiological, Compositional, Biochemical and Textural Characterisation of Caciocavallo Pugliese Cheese During Ripening. *Int. Dairy J.*, 12:511-523.
- GOMEZ, M. J., RODRIQUEZ, E., GAYA, P., NUNEZ, M. and MEDINA, M., 1999. Characteristics of Manchego Cheese Manufactured from Raw and Pasteurised Ovine Milk and With Defined Strain or Commercial Mixed Strain Starter Cultures. *J. Dairy Sci.*, 82:2300-2307.
- GONZALES, L., SANDOVAL, H., SACRISTAN, N., CASTRO, J. M., FRESNO, J.M. and TORNADGJO, M.E., 2007. Identification of Lactic Acid Bacteria

- Isolated from Genestoso Cheese Throughout Ripening and Study of Their Antimicrobial Activity. Food Control, 18: 716-722.
- GÖLGE, Ö. 2009. Kelle Peynirlerinin Özellikleri Üzerine Starter Kültür Kullanımının Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Adana, 97s.
- GÖNCÜ, B., AKIN, M.S. ve AKIN, M.B., 2017. Peynirde Biyojen Amin Varlığı ve Tespit Edilme Yöntemleri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21(1): 126-132.
- HEBERT, E. M., RAYA, R. R., TAILLIEZ, P. and DE GIORI, G. S., 2000. Characterization of Natural Isolates of *Lactobacillus* Strains to be Used as Starter Cultures in Dairy Fermentation. International Journal Food Microbiology, 59:19-27.
- HERMAN, L., HEYNDRICKX, M. and WAES, G. 1998. Typing of Bacillus sporothermodurans and Other Bacillus Species Isolated from Milk by Repetitive Element Sequence Based PCR. Letters in Applied Microbiology., 26: 183-188.
- HERREROS, M.A., FRESNO, J.M., PRITETO, J.M. and TORNADIJO, M.E., 2003. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria (Spanish Goat's Milk Cheese). International Dairy Journal, 13: 469-479.
- HYNES, E., BERGAMINI, C. V., SUAREZ, V. B. and ZALAZAR, C. A., 2003. Proteolysis in Reggianito Argentino Cheeses Manufactured with Natural Whey Cultures and Selected Strains of *Lactobacillus helveticus*. J. Dairy Sci., 86: 3831-3840.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANISATION, 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of presumptive Escherichia coli; Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid (ISO 16649-2).
- JAY JM., 1992. Modern Food Microbiology. Fourth Edition, Chapman & Hall One Peen Plaza New York, NY 10119, USA, p. 701.
- JERSEK, B., GILOT, P., GUBINA, M., KLUN, N., MEHLE, J., TCHERNEVA, E., RIJPENS, N. and HERMAN, L., 1999. Typing of Listeria monocytogenes Strains by Repetitive Element Sequence-Based PCR. Journal of Clinic Microbiology, 37: 103-109.
- JUVEN B.J., SCHVED F. and LINDNER P., 1992. Antagonistic compounds produced by a chicken Interstinal strain of Lactobacillus acidophilus. J Food Protect., 55: 157.
- KAMBER, U. 2005. Geleneksel Anadolu Peynirleri. Miki Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti, Ankara, 223s.
- KARACA, O., B., GÜVEN., M., 2004. Hatay Sünme Peynirinin Yapılışı. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül 2004, Van, s. 236-241.
- KARAKAŞ, A., 2005. Beyaz Peynir ve Fermente Sucuklardan *Enterococcus Faecium*'un İzolasyonu ve Tanımlanması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Adana, 39s.

- KAYAGİL, F., 2006. Geleneksel Starter Kültürlerin Peynir Kalitesine Etkisi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 14s.
- KAYNAR, P. 2011. Ülkemiz Peynirleri Üzerine Mikrobiyolojik Araştırmalar. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 41 (1): 1-8.
- KESMEN, Z., YETİMAN, A.E., GÜLLÜCE, A., KAÇMAZ, N., SAGDIÇ, O., ÇETİN, B., ADIGÜZEL, A., SAHİN, F. ve YETİM, H. 2012. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. International Journal of Food Microbiology, 153: 428–435.
- KILIÇ, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. İzmir, S. 37-41.
- KINDSTEDT, P., CARIC, M. and MILANOVIC, S. 2004. Pasta-Filata Cheeses. In: Cheese Chemistry, Physics and Microbiology (Ed. Fox ve McSweeney), Elsevier Academic Press. London, UK, 251-272.
- KIVANÇ, M., YILMAZ, M. ve ÇAKIR, E., 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. TÜBİTAK doi:10.3906/biy-0906-67. Turk J Biol., 35: 313-324.
- KNOSHAUG, E. P. , AHLGREN, J. A., and TREMPY J. E., 2000. Growth Associated Exopolysaccharide Expression in *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* Ropy352. J. Dairy Sci., 83:633-640.
- KÖSE, M. T., 2003. Türkiye Acurlarının (*Cucumis Melo* Var. *Flexuosus*) Genetik Ve Morfolojik Karakterizasyonu. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Adana, 41s.
- KÖSE, Ş. ve OCAK, E., 2014. Yoğurtta Lezzet Bileşenlerinin Oluşumu ve Bu Oluşum Üzerine Etki Eden Faktörler. Akademik Gıda., 12(2): 101-107.
- KRÍZOVA, J., SPANOVA, A. and RÍTTICH, B., 2008. RAPD and rep-PCR Fingerprinting for Characterization of Bifidobacterium Species. Folia Microbiol., 53(2): 99-104.
- KUSHIRO, A., CHERVAUX, C., COOL-PORTIER, S., PERONY, A., LEGRAIN-RASPAUD, S., OBIS, D., ONOUNE, M. and MOER, A. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria by Broth Microdilution Method and Etest. International Journal of Microbiology, pp.1.
- LARSON, Z., SUBRAMANYAM, B., ZUREK, L., HERRMAN, T., 2008. Diversity and antibiotic resistance of enterococci associated with stored-product insects collected from feed mills. Journal of Products Research, 44: 198-203.
- LAZZI, C., ROSSETTI, L., ZAGO, M., NEVIANI, E. and GIRAFFA, G., 2004. Evaluation of Bacterial Communities Belonging to Natural Whey Starters for Grana Padano Cheese by Length Heterogeneity-PCR. J. App. Microbiol., 96:481-490.

- LIMSOWTIN, G. K. Y., POWELL, I. B. and PORENTE, E. 1996. Type of Starters. In: T. Cogan and J. Accolas, Editors, Dairy Starters Cultures, VCH Publishers, Inc., USA, 1402-1403.
- LIMSOWTIN, G. K., BROOME, M. C. and POWELL, I. B. 2002. Lactic Acid Bacteria: Taxonomy. In: Encyclopedia of Dairy Science, Ed. H. Roginski. Elsevier Science, Cambridge, 1470–1478.
- LOMBARDI, A., GATTI, M., RIZOTTI, L., TORRIANI, S., ANDRIGHETTO, C. and GIRAFFA, G., 2004. Characterization Of Streptococcus Macedonicus Strains Isolated from Artisanal Italian Rawmilk Cheeses. International Dairy Journal of Food Microbiology, 14: 967-976.
- MADRAU, M. A., MANGÌA, N. P., MURGÌA, M. A., SANA, M. G., GRAU, G., LECCÌS, L., CAREDDA, M. and DEÌANA, P. 2006. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. Int. Dairy J., 16: 876-885.
- MAMA, V., HATZIKAMARI, M., LOMBARDI, A., TZANETAKIS, N and LITOPOULOU-TZANETAKI, E., 2002. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Heterogeneity: the Diversity Among Strains Isolated from Traditional Greek Cheeses. Italian Journal of Food Science, 14: 351–362.
- MANNU, L.; PABA, A.; PES, M.; FLORIS, R.; SCINTU, M., F. and MORELLIL; 1999. Strain Typing Among Enterococci Isolated from Home-Made Pecorino Sardo Cheese. FEMS Microbiology Letters, 170: 25-30.
- MANNU, L., RIU, G., COMUNIAN, R., FOZZI, M.C. and SCINTU, M.F., 2002. A Preliminary Study of Lactic Acid Bacteria in Whey Starter Culture and Industrial Pecorino Sardo Ewes' Milk Cheese: PCR-identification and Evolution During Ripening. International Dairy Journal, 12(1):17-26.
- MASCO, L., HUYS, G., GEVERS, D., VERBRUGGHEN, L. and SWINGS, J., 2003. Identification of Bifidobacterium Species Using rep-PCR Fingerprinting. System. Appl. Microbiol., 26: 557-563.
- MATHUR, S. and SINGH, R., 2005. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria-A Review. International Journal of Food Microbiology, 105: 281-295.
- MOHAMMED, M., EL-AZÌZ, H. A., OMRAN, N., ANWAR, S., AWAD, S. and EL-SODA, M., 2009. Rep-PCR Characterization and Biochemical Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from The Delta Area of Egypt. Int. J. of Food Microbiol., 128: 417-423.
- MOREA, M., BARUZZI, F., CAPPA, F. and COCCONCELLI, P. S., 1998. Molecular Characterization of the *Lactobacillus* Community in Traditional Processing of Mozzarella Cheese. Int. J. Food Microbiol., 43:53-60.
- NEVE, H., 1995. Bacteriophage. In: Dairy Starter Cultures, Eds. T. Cogan ve J.P. Accolas. VCH Publishers, New York, Pp.157-158
- NORRIS, J. R., BERKELEY, RCW., LOGAN, N.A. and O'DONNELL, A. G., 1981. The Genara *Bacillus* and *Sporolactobacillus* In: Starr, MP Stolp, H,

- Trüper, HG, Ballows, A and Schlegel, H.G. In The Procaryotes vol II. Springer Verlag, Berlin, 1711-1742.
- OBERG, C. J., WANG, A., MOYES, L.V., BROWN, R. J. and RICHARDSON, G. H., 1991. Effects of Proteolytic Activity of Thermolactic Cultures on Physical Properties of Mozzarella Cheese. J. Dairy Sci., 74:389-397.
- OGIER, J.C. and SERRA, P. 2008. The Enterococcus Genus. Int.J.Food Microbiol., 23-25.
- OKEREKE A. and MOTVILLE T. J., 1991. Bacteriocin Inhibition of Clostridium botulinum spores by lactic acid bacteria. J. Food Protect., 54:349.
- OLIVE, D. M. and BEAN, P., 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. Journal of Clinical Microbiology., 37: 1661-1669.
- ÖKSÜZTEPE, G., PATIR, B. ve ÇALICIOĞLU, M., 2005. Şavak Tulum Peynirinin Olgunlaşması Sırasında Laktik Asit Bakterilerinin Dağılımı ve İdentifikasyonu. Türk J. Vet. Animal Science, 29: 873-87.
- ÖNER, Z., SİMSEK, B. ve SAGDIÇ, O., 2003. Determination of some properties of Turkish Tulum Cheese. Milchwissenschaft, 3 (4): 152-154.
- ÖZDEMİR, S., ÇELİK, Ş., ÖZDEMİR C. ve SERT S., 1998. Diyarbakır'ın Karacadağ Yöresinde Mahalli Olarak Yapılan Örgü Peynirinin Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikleri. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. 21-22 Mayıs, 1998. Tekirdağ, 453s.
- PARENTE, E., ROTA, M. A., RICCİARDI, A. and CLEMENTI, F., 1997. Characterisation of natural starter cultures used in the manufacture of pasta-filata cheese in Basilicata (Southern Italy). Int. Dairy J., 7: 775-783.
- PARENTE, E. and COGAN, T. M., 2004. Starter Cultures: General Aspects. In: Cheese Chemistry, Physics and Microbiology (Ed. Fox ve McSweeney), Elsevier Academic Press, London, UK, 123-142.
- PEROTTI, M. C., BERNAL, S. M., Meinardi, C. A., Candiotti, M. C. and Zalazar, C. A., 2004. Substitution of Natural Whey Starter by Mixed Strains of *Lactobacillus helveticus* in the Production of Reggianito Argentino Cheese. Int. J. Dairy Tech., 57:45-51.
- PEROTTI, M. C., BERNAL, S. M., MEINARDI, C. A., CANDIOTTI, M. C. and ZALAZAR, C. A., 2005. Free Fatty Acid Profiles of Reggianito Argentino Cheese Produced with Different Starters. Int. Dairy J., 15:1150-1155.
- PEREZ, G., CARDELL, E., and ZARATE, V., 2003. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria From Tenerife Cheese. International Journal of Food Science and Technology, 38: 537-546.
- PISANO, B. M., FADDA, E. M., DEPLANO, M., CORDA, A. and COSENTINO, S. 2006. Microbiological and Chemical Characterization of Fiore Sardo, a Traditional Sardinian Cheese Made from Ewe's Milk. International Journal of Dairy Technology, 59: 171-179.

- QUIBERONI, U. S. A., TAILLIEZ, A., QUENEE, P., SUAREZ, V. and REINHEIMER, J., 1998. Genetic RAPD-PCR and Technological Diversities Among Wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 591-596.
- REINHEIMER, J. A., QUIBERONI, A., TAILLIEZ, P., BINETTI, A. G. and SUÁREZ, V. B., 1996. The Lactic Acid Microflora of Natural Whey Starters Used in Argentina for Hard Cheese Production. *Int. Dairy J.*, 6:869-879.
- RODRIGUEZ, J.M., CINTAS, L.M., CASAUS, P., HORN, N., DODD, H.M., HERNANDEZ, P.E. and GASSON, M.J., 1995. Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains from Dry Fermented Sausages, *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 109–115.
- SAAVEDRA, L., TARANTO, M. P., SESMA, F. and DE VALDEZ, G. F., 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 88 : 241– 245.
- SAĞUN, E., ALİŞARLI, M. ve DURMAZ, H. 2003. Farklı sıcaklıklarda muhafazanın çiğ küftede *S. aureus*' un gelişimi ve enterotoksin üretimi üzerine etkisi. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 839-845.
- SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N. and HAVRANEK, J.L., 2001. Taxonomy, Physiology and Growth of *Lactococcus lactis*: A Review. *Mljekarstvo*, 51: 35–48.
- SARANINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M.D., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALANTZOPOULOS, G. and TSAKALIDOU, E. 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *Int. Dairy J.*, 11: 621–647.
- SAVADAGO, A., OUTTARA,C.,A.,T., SAVADOGO,P., W., BARRO,N., OUTTARA,S., A. and TRAORE,S.,A., 2004. Identification of Exopolysaccharides-Producing Lactic Acid Bacteria from Burkina Faso Fermented Milk Samples. *African J.Biotechnology*, 3 (3) :189-194.
- SAVIJOKI, K., INGMER, H. and VARMANEN, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 71: 394–406.
- SCHILLINGER, U. and LÜCKE, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 4: 199-208.
- SCHLEIFER, K. H. and BALZ, K. R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* com. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 31-34.
- SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BALZ, R., COLLINS, M.D. and FISCHER, W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related *Streptococci* to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6: 183–195.
- SERT, D., 2011. Geleneksel Yöntemle Üretilen Tulum Peynirlerinde Kullanılan Sütün Orijinine Bağlı Olarak Olgunlaşma Esnasında Meydana Gelen Bazı

- Değişmelerin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 123 s.
- SHARP, M.E., 1979. Identification of the Lactic Acid Bacteria. In: F.A. Skinner and D.W. Lovelock, Editors. Identification Methods for Microbiologists, Academic Press, London, pp. 244–259.
- SOFU, A., 2017. Analyses of Dynamics in Dairy Products and Identification of Lactic Acid Bacteria Population by Molecular Methods. Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology, 5 (1): 6-13.
- SOHIER, D., COULON, J., FUNEL, A. L., 1999. Molecular Identification of *Lactobacillus hilgardii* and Genetic Relatedness with *Lactobacillus brevis*. Int. J. of Systematic Bacterio., 49: 1075-1081.
- SOMMA, M., QUERCİ, M., 1998. Agaroza Jel Elektroföresi. Gıda Örneklerinde Genetiğı Değıştirilmiş Organizma Analizleri. Bölüm 5. World Health Organization Regional Office for Europe. Institute for Health and Consumer Protection.
- STILES, M. E. and HOLZAPFEL, W. H., 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36: 1–29.
- SUZZI, G., LOMBARDI, A., LANORTE, M.T., CARUSO, M., ANDRIGHETTO, C. and GARDINI, F., 2000. Phenotypic and Genotypic Diversity of Yeasts Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. Journal of Applied Microbiology, 88: 117–123.
- ŞİMŞEK, B., SAĞDIÇ, O., 2006. Isparta ve Yöresinde Üretilen Dolaz (Tort) Peynirinin Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(3): 346-351.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S. and WANNAMAKER, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriology Reviews, 40: 722-756.
- TAİLLİEZ, P., TREMPLEY, J., EHRIJCH, S. D. and CHOPIN, A., 1998. Molecular Diversity and Relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). System. Appl. Microbiol., 21: 530-538.
- TAMIME, A.Y. and ROBINSON, R. K., 2007. Historical Background. In: Yoghurt Science and Technology. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 1–12.
- TAN, E., 2004. Türkiye Geleneksel Gıda Ürünleri Projesi. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül 2004, Van, s. 128- 132.
- TENOVER, F. C., ARBEİT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSİNG, D. H., SWAMINATHAN, B., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol., 33: 2233-2239.
- TORRES-LLANEZ, M. J., VALLEJO-CORDOBA, B., DIAZ-CINCO, M. E., MAZORRA-MANZANO, M. A. and GONZALEZ-CORDOVA A. F., 2006. Characterization of the Natural Microflora of Artisanal Mexican Fresco Cheese. Food Control, 17: 683-690.

- TURGUT, T., ERDOĞAN, A., ATASEVER, M. 2012. Karın Kaymağı Peynirinden İzole Edilen Laktobasillerin Tanımlanması. Kafkas Univ Vet Fak Derg., 18 (2): 209-213.
- TURHAN, I., and ÖNER, Z. 2014. Determination Of Starter Culture Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Cheese. GIDA, 39 (1): 9-15.
- TÜRKOĞLU, H., CEYLAN, Z. G., DAYISOYLU, K. S., 2003. The Microbiological and Chemical Quality of Örgü Cheese Produced in Turkey. Pakistan Journal of Nutrition, 2 (2): 92–94.
- UMS (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları), 2018. McFarland Baryum Sülfat Bulanıklık Standardı. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Standart no: AMD-TP-02.
- UYSAL, Ş., 2008. Dil peyniri üretiminde doğal termofilik peyniraltı suyu (PAS) kültürünün kullanım olanağının araştırılması. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ş. Urfa, 83 s.
- ÜÇÜNCÜ, M., 2005. Süt ve Mamülleri Teknolojisi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi. META Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova İzmir, s. 40-41.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R., 1994. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence- Based Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5: 25-40.
- VELJOVIĆ, K., TERZİĆ-VIDOJEVIĆ, A., VUKASINOVIĆ M., STRAHINIĆ, I., BEGOVIĆ, J., LOZO, J., OSTOJIC, M., TOPISIROVIĆ, L., 2007. Preliminary characterisation of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. J. Appl. Microbiol., 103: 2142-2152.
- YILDIRIM, Z., 2001. Antimikrobiyal Madde Üreten Bir Lactobacilli'nin İzole ve Teşhis Edilmesi. Gıda Dergisi, 26(4):303-306.
- WHITTENBURY, R., 1964. Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. Journal of General Microbiology, 35: 13-26.
- WOODS, C. R., VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPISKI, J. R., 1992. Analysis of Relationships Among Isolates of Citrobacter diversus by Using DNA Fingerprints Generated by Repetitive Sequence-Based Primers in The Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinic Microbiology., 30: 2921-2929.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G., 2002. Microbes from Raw Milk for Fermented Dairy Products. Int. Dairy J., 12: 91-109.
- ZAMFIR, M., VANCANNEYT, M., MAKRAS, L., VANİNGELGEM, F., LEFEBRE, K., POT, B., SWINGS, J. V. L., 2005. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Romanian Dairy Products.
- ZARATE, V., BELDA, F., PEREZ, C., CARDELL, E., 1997. Changes in the Microbial Flora of Tenerife Goats' Milk Cheese During Ripening. Int. Dairy Journal, 7 : 635-641.

ZHONG, W., MILLSAP, K., BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H., REID, G.,
1998. Differentiation of *Lactobacillus* Species by Molecular Typing. *Appl.*
Environ. Microbiol., 64:2418-2423.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Gülten ŞENOC AK SORAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Şanlıurfa-05.09.1980

Telefon: +90 543 4699964

e-mail: gsenocak63@hotmail.com

Adres: Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
Osmanbey Yerleşkesi, Şanlıurfa

Eğitim Durumu

Doktora	Harran Üniversitesi	Gıda Mühendisliği	2006-Halen
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi	Biyoloji	2005
Lisans	Harran Üniversitesi	Biyoloji	2003

Uzmanlık Alanı

Süt Mikrobiyolojisi

Yüksek Lisans Tez Konusu

Nigella Sativa L. Ekstresi İle Quinacrine' in Farelerde *Toxocara Canis W.* Larva Migransı Üzerindeki Etkileri

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI, SCI-Expanded, SSCI, AHCI Taranan)

Musa, D., **Senocak, G.**, Borazan, G., Altas, M., Ozgonul, A., Sogut, Ö., Güldür M. E., 2011. Effects of *Nigella Sativa* and Albendazole Alone and In Combination in *Toxocara Canis* Infected Mice. J Pak Med Assoc., Vol. 61, No. 9.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Soran, G. Ş., Çelik, Ş., 2018. Telemesi Haşlanan Geleneksel Peynirlerimizin Üretimine Uygun Doğal Starter Kültür Geliştirilmesi. Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi.

Çelik, Ş., Durmaz, H., Şat, İ. G., **Şenocak, G.**, 2009. Andız Pekmezi İçeren Set Tipi Meyveli Yogurtların Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. GIDA, 34 (4): 213-218.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Soran, G. Ş., Göncü, B., Çelik, Ş., Çelikel, A., Büyükkılıç, B., 2016. Microbiological And Parasitological Risks Of “Cıgkofte” Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi. 10-13 Kasım. Kıbrıs: Near East University, P6 S. 42.

Büyükkılıç, K. B., Akın, M. B., **Soran, G. Ş.,** Göncü, B., Çelikel, A., 2016. Usage of Probiotic Bacteria for Ice Cream Production. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi. 10-13 Kasım. Kıbrıs: Near East University, P4 S. 36.

Göncü, B., Akın, M. S., Çelikel, A., Büyükkılıç, B., **Soran, G. Ş.,** 2016. Varieties Regional Cheese Produced From Ewe’s Milk In Turkey. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi. 10-13 Kasım. Kıbrıs: Near East University, P5 S. 38.

Çelikel, A., Akın, M. S., Göncü, B., **Soran, G. Ş.,** Büyükkılıç, B., 2016. Pathogenic Microorganisms From Milk And Milk Products. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi. 10-13 Kasım. Kıbrıs: Near East University, P12 S. 56.

Akın, M. S., Çelikel, A., Ünver, N., **Soran, G. Ş.,** 2016. Some Properties of Urfa Cheeses Sold in Şanlıurfa Province. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi. 10-13 Kasım. Kıbrıs: Near East University. P13 S. 60.

Soran, G. Ş., Çelik, Ş., 2010. A Traditional Dessert, Palıza The 1 st International symposium on traditional foods from Adriatic to Caucasus : 15-17 April Tekirdağ: Namık Kemal Üniversitesi. S. 791.

Soran, G. Ş., Akın, M. B., Özer, E. A., Akın, M. S., 2015. A Kind of Traditional Snack: Kavurga. The 3rd International Symposium on ‘Traditional Foods from Adriatic to Caucasus’. 01-04 Ocak. Sarajevo/ Bosnia and Herzegovina. S. 628.

Soran, G. Ş., 2017. Medical Benefits Of Black Cumin (Nigella Sativa) Plant. I. International Congress On Medicinal And Aromatic Plants: “Natural And Healthy Life” Book. Tabkon’ 17. Submission ID: 1004.

Soran, G. Ş., Karahan, L. E., Akın, M. B., 2015. Contamination Sources of Traditional Küncümot Manufacturing Method. The 3rd International Symposium on ‘Traditional Foods from Adriatic to Caucasus’. 01-04 Ocak. Sarajevo/ Bosnia and Herzegovina. S. 639.

Karahan, L. E., Akın, M. S., Akın, M. B., **Soran, G. Ş.,** Karahan, A. M., 2015. Investigation of Chemical, Textural and Microbiological Quality of Yogurts Marketed in Batman Province. The 3rd International Symposium on ‘Traditional Foods from Adriatic to Caucasus’. 01-04 Ocak. Sarajevo/ Bosnia and Herzegovina. S. 237.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Musa, D., **Şenocak, G.,** Borazan, G., Altaş, M. G., 2006. Farelerde Nigella Sativa Ekstresi İle Quinacrine; İn Toxocara Canis Larva Migransı Üzerindeki Etkileri. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran, Kuşadası/ Aydın. Ps. 258.

Çelik, Ş., Durmaz, H., Şat, İ. G., **Şenocak, G.,** 2008. Andız Pekmezi İçeren Set Tipi Meyveli Yogurtların Bazı Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum. S. 357-358.

Çelik, Ş., **Soran, G. Ş.**, 2009. Termofilik Peyniraltı Suyu Kùltürleri ve Yöresel Yarı Sert Peynirlerimizin Üretimine Uygunlukları. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu. 27-28-29 Mayıs, Van. S. 872.

Çelik, Ş., Uysal, Ş., Durmaz, H., **Soran, G. Ş.**, 2009. Termofilik peyniraltı suyu kùltürünün teknolojik ve mikrobiyolojik özellikleri. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. 21-23 Mayıs, Denizli.

