



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI



**MALDI-TOF MS ve 16S rDNA DİZİ ANALİZİ İLE GELENEKSEL
OLARAK ÜRETİLEN MİHALIÇ PEYNİRİNİN MİKROBİYOTASININ
ARAŞTIRILMASI**

Ergün AYANOĞLU

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2021





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI



**MALDI-TOF MS ve 16S rDNA DİZİ ANALİZİ İLE GELENEKSEL
OLARAK ÜRETİLEN MİHALIÇ PEYNİRİNİN MİKROBİYOTASININ
ARAŞTIRILMASI**

**Ergün AYANOĞLU
(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Recep ÇIBIK**

**TAGEM/HSGYAD/A/18/A3/P7/24-Tarım ve Orman Bakanlığı
Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü**

BURSA-2021

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“MALDI TOF MS ve 16S rDNA Dizi Analizi ile Geleneksel Olarak Üretilen Mihaliç Peynirinin Mikrobiyotasının Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Ergün AYANOĞLU

.../.../ 2021

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

.../.../2021

Adı Soyadı: Ergün AYANOĞLU

Anabilim Dalı: Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Tez Konusu: MALDI TOF MS ve 16S rDNA Dizi Analizi ile Geleneksel Olarak Üretilen Mihaliç Peynirinin Mikrobiyotasının Araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☐	☐	
Dış Kapak Sayfası	☐	☐	
İç Kapak Sayfası	☐	☐	
Kabul Onay Sayfası	☐	☐	
Sayfa Düzeni	☐	☐	
İçindekiler Sayfası	☐	☐	
Yazı Karakteri	☐	☐	
Satır Aralıkları	☐	☐	
Başlıklar	☐	☐	
Sayfa Numaraları	☐	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☐	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☐	☐	
Kaynaklar	☐	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Recep ÇIBIK

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK

İÇ KAPAK

ETİK BEYANI II

KABUL ONAY.....III

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU IV

İÇİNDEKİLER V

TÜRKÇE ÖZET VIII

İNGİLİZCE ÖZET IX

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER..... 7

2.1. Dünyada ve Türkiye’de Peynir Üretimi 7

2.2. Geleneksel Mihaliç Peyniri ve Yapım Tekniği 14

2.3. Mihaliç Peynirinin Kimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar 17

2.4. Mihaliç Peyniri Üzerine Yapılan Mikrobiyolojik Çalışmalar 20

2.5. Mihaliç Peyniri Üzerine Yapılan Duyusal Analiz Çalışmaları 23

2.6. Mihaliç Peyniri Üzerine Yapılan Kültür Çalışmaları 25

2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri 26

2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması..... 28

2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel Önemi 33

2.10. Peynirde Laktik Mikrobiyota 35

2.11. Peynir Teknolojisinde Starter Kültür Kullanımı ve Peynir Starterleri..... 37

2.12. Mikrobiyal Genetik Kaynakların Korunması ve Kültür Koleksiyonları.....41

2.13. Uluslararası Kültür Koleksiyonu Organizasyonları 41

2.14. Ülkemizde Mikrobiyal Kültür Koleksiyonları 43

3. GEREÇ ve YÖNTEM..... 47

3.1. Gereç 47

3.1.1. Örneklerin Toplanması..... 47

3.1.2. Referans Suşlar..... 51

3.1.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.51

3.1.4. Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar 52

3.2. Yöntem..... 53

3.2.1 Örneklerden Numune Alınması ve Sulandırılmaların Yapılması 53

3.2.2. Bakteri İzolasyonu	53
3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Seçimi ve Saflaştırma İşlemleri	54
3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojilerinin İncelenmesi ve Saflık Kontrolü...	54
3.2.5. Stok Kültürlerin Hazırlanması ve Muhafazası	55
3.2.6. Gram Boyama	55
3.2.7. Katalaz Testi	56
3.2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Sayılarının Belirlenmesi	56
3.2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması	57
3.2.9.1. MALDI-TOF-MS Yöntemi ile Tanımlama	57
3.2.9.2. MALDI-TOF-MS Yönteminin Çalışma Prensibi	58
3.2.9.3. MALDI-TOF-MS Yöntemi ile İzolatların Tanımlanması	59
3.2.9.4. API 50-CHL ve API 20-STREP ile İzolatların Tanımlanması	60
3.2.9.5 16S DNA Gen Sanger Dizi Yöntemi ile Tanımlamanın Yapılması	61
3.2.9.6. Genomik DNA İzolasyonu.....	61
3.2.9.7. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Reaksiyonu	61
3.2.9.8. PZR Ürünlerinin Elektroforez ile Ayrımı	62
3.2.9.9. 16S Geninin PCR Ürünlerinin Dizi Analizi.....	62
3.2.9.10. Dizi Analizlerinin Yapılması	63
3.2.10. Mihaliç Peynirlerinin Duyusal Niteliklerinin Belirlenmesi	63
3.2.11. Seçilen Mihaliç Peynir Örneklerine Uygulanan Kimyasal Analizler.....	64
3.2.11.1. Toplam Kuru Madde İçeriği Tayini	64
3.2.11.2. Tuz Oranı Tayini	64
3.2.11.3. Protein Miktarının Belirlenmesi	65
3.2.11.4. Yağ Muhtevası Tayini ve Kuru Maddede Yağ Oranı	65
3.2.11.5. Tirtasyon Asitliği Tayini % LA ve pH	65
3.2.12. İstatistiksel Analizler	65
4. BULGULAR	66
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	66
4.2. Stok Kültürlerin Hazırlanması ve Muhafazası	66
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı	67
4.4. İzolatların MALDI-TOF MS ile Tanımlanması	68
4.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlanan Laktik Asit Bakterilerinin Türlerine Ait Elde Edilen Spektrumları ve Dendrogram Analizleri	71
4.6. API (50 CHL-20 STREP), MALDI-TOF-MS ve 16S rDNA Dizi Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması	79
4.7. Laktobasillerin ve Streptokokların 16S rDNA Dizi Analizi ile Tanımlanması ..	82

4.8. Organoleptik Olarak Yüksek Puan Alan Peynirlerin Florasının Değerlendirilmesi.....	84
4.8.1. Mihaliç Peynirlerinin Kimyasal ve Duyusal Analizleri.....	84
4.8.2. Az Tuzlu ve Tuzlu Mihaliç Peynirlerinin Mikrobiyolojik Analizleri.....	86
4.8.2.1. Az Tuzlu/Tuzlu Peynirlerin Kabuk ve İç Kısımlarında Laktik Floranın Değerlendirilmesi	87
4.9. Elde Edilen Suşların Kültür Koleksiyonuna Dahil Edilmesi	89
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	94
5.1. Genel Değerlendirme ve Sonuçlar	105
6. KAYNAKLAR	107
7. SİMGELER ve KISALTMALAR	127
8. EKLER.....	129
9. TEŞEKKÜR	131
10. ÖZGEÇMİŞ.....	132

TÜRKÇE ÖZET

Tez çalışmasında Mihaliç peynirinin laktik florası MALDI-TOF MS ve 16S rDNA dizi analizi yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak tanımlandı. Araştırmada toplam 53 adet Mihaliç peyniri üretiminin en fazla yapıldığı Marmara Bölgesi'nden toplandı.

Çalışmanın ilk bölümünde spesifik besiyerleri kullanılarak tüm laktik flora ortaya çıkartıldı ve seçilen 467 adet izolat MALDI-TOF-MS analizine tabi tutuldu. Besiyerlerinde üreyen mikroorganizmalar sayısal olarak değerlendirildiğinde M17 agarda gelişen streptokokların florada baskın olduğu belirlendi. Mikroorganizmaların tür tanısı için kullanılan MALDI-TOF-MS ve 16S rDNA dizi analiz sonuçlarına göre *Lactobacillus fermentum* (% 37,9), *Lb. paracasei* (% 32,5) ve *Lb. rhamnosus* (% 14,2) baskın laktobasil türleri olarak belirlendi. Benzer şekilde, *Streptococcus thermophilus* (% 34), *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* (% 31,9), *Str. lutetiensis*/*Str. infantarius* ssp. *infantarius* (% 14,8) ve *Lactococcus lactis* (% 12,7) M17'de üreyen stertekok ve laktokoklar olarak tanımlandı. Enterokoklar arasında ise KAA besiyerinden *Enterococcus faecium* (% 41,6) ve *Ent. faecalis* (% 38,5) en baskın türler olarak izole edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde tuzlu ve az tuzlu Mihaliç peynirleri ile bu peynirlerin kabuk (dış) ve iç (merkez) kısım mikrofloraları karşılaştırıldı. Sonuçta *Lb. paracasei* tuzlu peynirlere kıyasla az tuzlu peynirlerden daha sıklıkla izole edildi. Peynirlerin kabuk ve iç kısım karşılaştırmasında *Lb. fermentum* merkez kısımda daha yaygın olduğu, *Ent. faecium*'un ise kabuk kısmında daha baskın olduğu belirlendi.

Elde edilen isolatlar “Süt Ürünleri Gen Bankası” starter kültür koleksiyonunda TSGB3001 başlangıç kodu ile kayıt ve muhafaza altına alındı. Bu suşların, peynir üretiminde potansiyel rollerinin anlaşılması için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Mihaliç Peyniri, MALDI-TOF, 16S rDNA Dizi Analizi, Kültür Koleksiyonu.

İNGİLİZCE ÖZET

Composition and diversity of lactic flora of Mihalic cheese was evaluated by using comparative analysis of MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing of isolates. A total of 53 cheese samples were collected from Gönen, Savaştepe, Havran, Manyas, Karacabey provinces of Marmara Region where Mihalıç is produced largely in Turkey. In the first part of the study, the whole lactic flora was analyzed by planting the bacteria on specific media. In general, streptococci growing on M17 plates were predominant. A total of 467 isolates selected for their general status were then subjected to MALDI-TOF MS analysis. Combined analysis of MALDI-TOF MS and 16S rDNA sequencing evidenced *Lactobacillus fermentum*, *Lb. paracasei* and *Lb. rhamnosus* as the dominant lactobacilles with a percentage of 37,9 %, 32,5 % and 14,2 % respectively. Percentage distribution for streptococci was 34 % for *Streptococcus thermophilus*, 31,9 for *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus*, 14,8 % for *Str. lutetiensis/Str. infantarius* ssp. *infantarius* and 12,7 % for *Lactococcus lactis*. Among enterococci, *Enterococcus faecium* (41,6 %) and *Ent. faecalis* (38,5 %) were the most dominant species.

In the second part of the study microflora of salty/lesser salty and central/crust part of Mihalic was compared. *Lb. paracasei* was the mostly isolated lactobacilli species in lesser salty cheese compared to salty ones. Comparison of central and crust part of cheeses revealed that *Lb. fermentum* count was higher in central part whereas *Ent. faecium* was dominant in crust part.

Collected isolates were stored in “Dairy Product Gene Bank” starter culture collection under TSGB3001 code and further studies are necessary to better understand their potential role in cheese manufacturing.

Keywords: Mihalic Cheese, MALDI-TOF, 16S rDNA Sequence Analysis, Culture Collection.

1. GİRİŞ

Süt, içerdiği zengin besin bileşenleri ile insanlar için önemli bir gıda kaynağı olduğu kadar mikroorganizmalar için de iyi bir besin kaynağıdır. Bu sebeple sütün muhafazası ve nakliyesinde zorlanan insanlar sütü daha dayanıklı ürünlere işleyip muhafaza etmişlerdir. Bu muhafaza şekillerinden birisi de peynirdir (Kamber, 2015).

Nesiller boyunca toplumların neredeyse tümü tarafından beğeniyle tüketilen bir gıda maddesi olan peynirin, ilk kez kimler tarafından, nerede ve nasıl üretildiği konusuna dair kesin bir veri bulunmamaktadır. Konu ile ilgili birçok rivayet mevcut olsa da R.W. Menges, ilk peynirin bir gezginin sütü taşımak için koyun midelerinden yapılmış tulum içine koyduğu ve taşıdığı sütün rastlantı sonucu pıhtılaşarak peynir elde edildiğini öne sürmüştür (Tekinşen, 2000). Herodot, Hipokrat ve Strabon'a göre ise ilk peynir İskit Türk'leri (M.Ö. 600-200, Güney Rusya) tarafından kısırak sütünü ekşiterek elde edilmiştir. Kosikowski göre ise Türk ve Moğol halkları atalarının Asya'dan Avrupa'ya göçleri esnasında keçi sütünden fermente gıda olarak ilk peyniri üretmişlerdir (Kamber, 2008). Geçim kaynakları tarım ve hayvancılığa dayalı olan Orta Asya'daki göçebe Türk boylarının ana besin kaynaklarının süt ürünleri olduğu bilinmektedir. Avrupa peynir tarihine bakıldığında ise farklı türde peynir çeşitlerinin üretim süreci Roma İmparatorluğu döneminde başladığı görülmektedir. Orta Asya peynir tarihi Avrupa'dan çok daha eski olsa da, iklim ve coğrafi özelliklerden dolayı Avrupa ülkelerinde peynirin yayılımı çok daha hızlı olmuştur (Hayaloğlu, & Özer, 2011).

2020 yılı itibariyle dünya çapında en fazla peynir üretimi yaklaşık 12 milyon tonla Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde yapılmaktadır. Bunu 6,5 milyon ton civarı üretimiyle Amerika Birleşik Devletleri (ABD) izlemektedir. Ülkemizin de dahil olduğu Arjantin, Polonya ve Brezilya gibi diğer önemli peynir üreticisi olan ülkelerde ise 2020 yılı peynir üretimi 750-900 bin ton aralığında gerçekleşmiştir (OECD-FAO, 2020). Ülkemizde ise 2020 yılı toplam peynir üretimi 764 bin ton, peynir ihracatı ise 53 bin ton olarak hesaplanmıştır (TÜİK, 2020a).

Avrupa Birliği istatistik sonuçlarının yayınlandığı 2020 yılı Eurostat Statistics Explained (EUROSTAT, 2020) resmi verilerine göre AB ülkelerinde üretilen toplam sütün % 69,6' sını peynir ve tereyağı üretiminde kullanılmaktadır (EUROSTAT, 2020). 2020 yılı için küresel olarak ihraç edilen peynirin 33 milyar dolar civarında olduğu

tahmin edilmektedir. AB ülkeleri 27 milyar dolar ihracat hacmi ile dünya peynir ihracatının % 84'ünü gerçekleştirerek bir kez daha dünyanın en büyük ihracatçısı olmuştur (World to Exports, 2020). Avrupa'nın en güçlü ekonomisine sahip olan Almanya aynı zamanda dünyanın da en büyük peynir ihracatçısı konumundadır. Uluslararası Ticaret Merkezi (International Trade Centre) verilerine göre Almanya 2019 yılında 4,5 milyar dolar peynir ihracatı gerçekleştirerek dünya ihracat hacmimin %14,2 'sini gerçekleştirmiştir (ITC, 2020). Ülkemizde ise süt ürünleri ihracatı ağırlıklı olarak Irak, Suudi Arabistan, Ürdün ve Libya gibi Orta Doğu ülkelerine yapılmakta olup, en önemli ihracat ürünümüz % 49 'luk ürün payıyla peynirdir. 2020 yılı 12 aylık toplam peynir ihracat değerimiz bir önceki yıla oranla % 6 oranında artarak 185 milyon dolar olarak gerçekleşmiştir (USK,2020). Sütün dünya genelinde ticarete konu olan formu işlenmiş süt ürüne dönüşmüş halidir. Çin kişi başına düşen süt ve süt ürünü tüketim miktarı düşük bir ülke olsa da, yağlı süt tozu başta olmak üzere süt ve süt ürünlerinde dünyanın fazla ithalatını yapan ülke konumundadır. Japonya, Meksika, Rusya Federasyonu ve Orta Doğu ülkeleri Çin'den sonra diğer önemli ithalatçı ülkeler arasındadır. Ülkemizde de süt ve süt ürünleri ithalatı en fazla Avrupa Birliği ülkelerinden yapılırken, bu ülkelere daha çok tereyağı ve peynir ithal edilmektedir. 2020 yılı peynir ithalatımız tüm süt ürünleri ithalatımızın yaklaşık % 40' oluşturarak 9 bin ton civarına ulaşmıştır (USK, 2020).

Peynirin dünya genelinde 2000'den fazla çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde Avrupa ülkelerine bakıldığında Fransa'da 350, İtalya'da 200, İspanya'da 50, İsviçre'de 20, Hollanda'da 15 ve Türkiye'de 130'dan fazla peynir çeşidi olduğu belirtilmiştir (Kamber, 2015). Ülkemizde en fazla üretilen peynir çeşitleri Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirleri başta olmak üzere Mihaliç, Dil, Otlı, Çerkez, Hellim, Çayır, Lor ve Civil peynirleridir (Yalman, Tepeli, & Zorba, 2016). Türkiye'de üretilen peynirin, tüketimdeki payının büyük bir bölümünü, % 60 oranla Beyaz peynir oluşturmaktadır. Bu payı % 17 payla Kaşar peyniri, % 12 payla Tulum ve Mihaliç peyniri, % 11 payla da diğer yerel peynirler takip etmektedir (Kamber, 2015).

Ülkemiz tarihi boyunca pek çok uygarlığa ev sahipliği yapmış birbirinden farklı medeniyetlerin beşiği olmuştur. Ev sahipliği yaptığı uygarlıklar bu coğrafyaya kültürlerinden izler bırakmışlardır. Bu çok kültürlülük Türk mutfağının fermente süt ürünleri konusunda zenginleştirdiği gibi peynir çeşitliliği açısından da hatırı sayılır bir

konuma getirmiştir. Ülkemizin farklı bölgelerinde değişik yöresel peynir çeşitleri üretilmektedir. Bu üretimin çoğu küçük yerel mandıralar ve evlerde gerçekleştirilmektedir. Türkiye’de Beyaz peynir, Kaşar ve Tulum peynirinden sonra geleneksel yöntemlerle en fazla üretimi yapılan peynir Mihaliç peyniridir. Mihaliç peyniri ilk olarak Bursa ili Karacabey ilçesinde üretilen ve tarihi yaklaşık olarak günümüzden 250 yıl öncesine kadar uzanan geleneksel bir peynir çeşididir (Bulut, 2006; Özcan, 2000). Günümüzde daha çok Bursa, Balıkesir ve Çanakkale’nin yanı sıra Karacabey, Mustafakemalpaşa, Gönen, Manyas, Erdek ve Bandırma ilçelerinde üretimi yapılmaktadır (Kamber, 2008). Özellikle kıvırcık ırkı koyun sütünün veya tercihen keçi ve inek sütünün pastörize edilmeden mayalanması ile üretilen yüksek seviyede tuz ve kuru madde içeren, yarıksız, çatlaksız, oldukça tuzlu sert bir peynirdir (MEGEP, 2011). Mihaliç peyniri, dışta 3 - 4 mm kalınlığında beyaz renkte sert bir kabuğu, kabuğun alt kısmında sarımtırak - beyaz renkteki kabuğa kıyasla daha yumuşak orta (merkez) kısmı ve kabuğa doğru giderek azalan 3-4 mm çaplı gözenek oluşumu ile karakterizedir (Bulut, 2006). Mihaliç peyniri % 20-22 randımanda geleneksel olarak tahta variller içerisinde 15-25°C’de dört aylık süre boyunca % 18-20’lik salamurada olgunlaştırılır (Aday, & Karagül-Yüceer, 2014; Kamber, 2008). Yumuşak ve az tuzlu Mihaliç peynirinde ise % 18-20’lik salamurada bir iki gün bekletildikten sonra % 16’lık salamurada olgunlaşma süreci devam etmektedir (Evrensel, & Yıldız 1997; Özcan, 2000; Şen, 1991). Mihaliç peyniri düşük ısı işleminden (56 °C’de 2 dakika) sonra starter kültür kullanılmadan mayalandığından dolayı kendine özgü aroma ve kıvamı, çiğ süt içinde bulunan ve çevreden bulaşan mikroflora tarafından oluşturulur. Pastörizasyon uygulanması çiğ süt mikroflorasının ve enzim çeşitliliğinin azalmasına neden olmaktadır (Jany, & Barbier, 2008; Psoni, Tzanetakis, & Litopoulou-Tzanetaki, 2006). Buna bağlı olarak pastörize süt ile yapılan Mihaliç peynirinin kendine özgü tat, aroma ve yapısında kusurlar oluşmakta karakteristik Mihaliç peyniri oluşmamaktadır. Ancak çiğ sütün halk sağlığı için tehlikeleri düşünüldüğünde süte uygulanan pastörizasyon işlemi endüstriyel bir zorunluluktur. Ayrıca geleneksel yöntemlerle starter kültür kullanılmadan çoğu zaman çiğ süttten üretilen peynirlerin dayanma süreleri çok kısa olmaktadır. Aynı lezzet, tat, aroma ve tekstürün yakalanamamasından dolayı da standart seri bir üretim mümkün

olmamaktadır. Bu sebeplere sosyoekonomik nedenlerin de dahil olmasıyla birlikte birçok peynir çeşidimiz unutulmaya yüz tutmuştur.

Starter kültürler fermantasyonun başarısını sağlayarak, son ürününün sabit ve yüksek ölçekte kalitesini garanti altına almaya amaçlayan mikroorganizmalardır. Avrupa ülkelerinde üretilen peynirlerin büyük bir kısmı endüstriyel ticari starter kültür kullanılarak üretilmektedir (Kırmacı, Hayaloğlu, Özer, Akçelik, & Akkoç, 2011). Geleneksel peynirlerin standardizasyonunu sağlamak için bu peynirlerimizin doğal florasında bulunmayan laktik asit bakterilerini içeren, yurt dışı menşeli starter kültürler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem alışlagelmiş damak tadımıza çok uygun olmamakla beraber aynı zamanda geleneksel peynir mikrobiyotasının da kaybolmasına neden olmaktadır. Ayrıca endüstride kullanılan starter kültürler ülkemizde üretilmemekte ve ithal edilerek çok yüksek miktarda döviz kaybına neden olmaktadır. 2019 verilerine göre ülkemiz ithalat kalemleri içinde starter kültür (maya) ithalatı 26 milyon TL tutarındadır (TÜİK, 2020b). Bu ithalatın % 50' sinden fazlasını Fransa ve Danimarka 'dan yapılmakta olduğu bilinmektedir. Ülkemizde büyük çaplı süt ürünleri üreten firmaların yüklü miktarda yıllık starter ithalatı olduğu tahmin edilmektedir. İthal kültürler ülkemiz insanının alışkın olduğu damak tadına uygun olmayıp, kısa sürede aktivitelerini kaybetmekte ve tekrar üretimleri mümkün olamamaktadır. Bu nedenle de firmalarımızın üretimleri dışa bağlı hale gelerek uluslararası rekabet gücü azalmaktadır. Ülkemizde geleneksel peynirlerin üretiminde, sürekli aynı kalitede standart ürün elde etmek, tekstür ve kıvamın kalitesini artırmak, dayanıklılığı sağlayarak dünya piyasasında rekabet edebilmek için starter kültür kullanımı endüstriyel bir zorunluluktur. Ancak ithal kültürle geleneksel peynir üretimi, alışlagelmiş lezzet ve tekstür kaybına yol açmakta ve fermantasyonda rol alan doğal bakterilerimizi yok etmektedir (Kırmacı ve ark., 2011). Dahası geleneksel peynirlerimiz kendine has organoleptik özellikleri kaybolmakta, yurt dışına büyük miktar döviz çıkışına neden olmaktadır. Bu nedenle kültürel zenginliğimiz olan mahalli ürünlerimizi karakteristik özelliklerini korumak, dışa bağımlılığımızı azaltarak tersine starter kültür ihracatı yapabilmek için kendi kültürümüzü üretebilmemiz zorunlu hale gelmiştir. Bu bağlamda öncelikle ithal starter kültür ilave edilmemiş çiğ süttten geleneksel yöntemlerle üretilmiş peynirlerimizin geniş çaplı doğal mikrobiyotasını ortaya çıkarmak oldukça önem arz etmektedir. Yapılan

çalışmalarda “Wild- Strain” (Artisanal) olarak adlandırılan bu bakterilerin, ticari olarak satılanlarına göre yüksek tuz konsantrasyonlarına ve ısıtma sıcaklıklarına daha dayanıklı oldukları, lezzet ve aroma oluşumu açısından daha kabiliyetli oldukları belirtilmiştir. Birleşimleri ve performansları birbirlerinden farklı olsa da, doğal starter kültürlerin peynirin tat ve aroması üzerinde olumlu etkileri mevcuttur. Faj saldırılarına karşı duyarsız olmaları ve bakteriyosin benzeri maddeler üretmeleri de farklı özelliklerindendir (Ayad, Verheul, Wouters, & Smit, 2000; Fortina ve ark., 2003; Mannu, Paba, Pes, & Scintu, 2000). Ayrıca geleneksel süt ürünlerinin doğal mikrobiyotayı ortaya çıkarma çalışmaları bu mikroorganizmaların kaybını önlemekte beraber peynir  eşitililiğinde yok olmasına engel olmaktadır. Benzer  alışmalar, geleneksel peynir üretiminin daha büyük ölçekte yapılabilmesi için klasik başlangıç kültürleri ile beraber kullanılacak olan yeni spesifik suşların seçimi için kaynak oluşurmaktadır. Süt fermentasyonunda kullanılan starter kültürlerin  eşitililiğinin az olması sebebiyle endüstriyel süt ürünleri üreticileri yeni suşlar, starter laktik asit bakterileri (LAB) ve non-starter laktik asit bakterilerinin (NSLAB) kullanılması için artan bir talepleri vardır. Geleneksel peynirlerin tipik organoleptik özelliklerini gelecek nesillere aktarmak ve süt endüstrisinin talebi olan yeni suşların seçimi için kaynak oluşurtmak amacıyla doğal fermente ürünlerin bakteri popülasyonları ortaya çıkarıp bunları muhafaza altına almak önem arz etmektedir (Ayad, Verheul, De Jong, Wouters, & Smit, 1999; Kırmacı ve ark., 2011; Klijn, Weerkamp, & De Vos, 1995).

Ülkemiz geleneksel peynirlerinde laktik asit bakterilerini belirlemeye yönelik çalışmalar kapsamında; Kanak, & Yılmaz (2018) Sakarya yöresinde geleneksel olarak üretilen Çerkez, Lavaş ve Tulum peynirleri ile, Arslan (2017) Erzurum ve ilçeleri başta olmak üzere Kars, Karaman, Konya ve Van ilerinden topladığı beyaz peynir  rnekleriyle, Kırmacı,  zer, Akçelik, & Akçelik (2016)  iğ sütten kültür kullanmadan üretilen şanlıurfa yöresine ait Urfa peynirleriyle, Akoğlu, Yaman, Coşkun, & Sarı (2016) Bolu yöresine ait geleneksel bir peynir olan Mengen peynirleriyle, Ertürkmen, &  ner (2015) Isparta yöresinden temin ettikleri çiğ inek sütleriyle kültür kullanmadan ürettiği 7 adet beyaz peynir ile, Turhan, &  ner (2014)  iğ sütten üretilmiş 12 adet Kaşar peyniri ve 1 adet Beyaz peynir örneğiyle, Turgut, Erdoğan, & Atasever (2012a) Kars yöresinin geleneksel ürünlerinden olan Gravyer peynirleriyle, Korucu (2012) Elazığ yöresinin mahalli peynirlerinden olan Tomas peynirleriyle, Turgut, Erdoğan, &

Atasever (2012b) Doğu Anadolu bölgesinde geleneksel yöntemlerle üretilen Karın Kaymağı peyniriyle, İşleyici, & Akyüz (2009) 25 adet Van Otlı peynir örneğiyle, Patır, & Ateş (2003) Tulum peyniri örnekleriyle araştırmalar yapmışlardır.

Yöresel peynirlerle yapılan bu araştırmalar, laktik mikrobiyotada farklılıklar olduğunu göstermektedir. Bu farklılık, peynirlerin yapım teknikleri, kullanılan sütün (inek, koyun, keçi) cinsi, depolama süre ve teknikleri, coğrafi konum ve iklim şartları gibi birçok parametre ile ilişkilendirilebilir (Akoğlu ve ark., 2016; Callon, Millet, & Montel, 2004; Kırmacı, 2010).

Mihaliç peyniri ile bugüne kadar yapılmış çalışmalar, kimyasal özelliklerini belirleme ve patojen bakteri arama çalışmaları ile sınırlı kalmış, doğal laktik mikrobiyotayı araştıran kapsamlı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada ana amacımız geleneksel yöntemlerle çiğ süttten üretilmiş, kendine has özellikleri ile ayrı bir yerde olan Mihaliç peynirinin geniş çaplı mikrobiyotasını ortaya çıkartmak olmuştur. Yapılan duyusal, kimyasal analizler ile Mihaliç peynirlerin dış (kabuk), iç (merkez) kısımları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu özel peynirin doğal fermentasyonunda rol alan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu farklı teknikler (API 50 CHL, MALDI TOF MS, 16S rDNA dizi analizi) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen suşlar ile Mihaliç peynirine özgü kültür koleksiyonunu oluşturularak, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Süt Ürünleri Gen Bankası'nda kayıt ve muhafaza altına alınmıştır.

Araştırmamız, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM/HSGYAD/A/18/A3/P7/24 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dünyada ve Türkiye’de Peynir Üretimi

Dünyada farklı kurum ve kuruluşlar tarafından süt sektöründe meydana gelen üretim, tüketim ve ticaret konularıyla ilgili istatistiki çalışmalar yürütülmektedir. Çalışma verileri temelde örtüşse de sonuçlarda bazı farklılıklar meydana gelmektedir. Bu kurumlardan biri olan Uluslararası Sütçülük Federasyonu (International Dairy Federation-IDF, 2019) verilerinde 2018 yılı dünya toplam süt üretiminin bir önceki yıla göre % 2,4 oranında artış göstererek 864 milyon tona ulaştığını bildirmiştir. Bir diğer kuruluş olan Uluslararası Çiftlik Karşılaştırma Ağı (International Farm Comparison Network, IFCN) ise istatistiki hesaplamalarını, farklı bölgelerde farklı kalitedeki sütleri % 4 yağ ve % 3.3 protein oranına göre standardize ederek geliştirdikleri (Energy Corrected Milk, ECM) formüle göre düzenlemektedir (IFCN, 2020). Bir başka deyişle ülkelerde üretilen süt, IFCN tarafından baz alınan değer olan % 4 yağ ve % 3,3 proteinin altında ise IFCN tarafından açıklanan toplam süt üretim miktarı yerel istatistiklerde açıklanan miktardan düşük, IFCN baz değerinin üzerinde ise yüksek olarak hesaplanmaktadır. 2019 yılı IFCN verilerine göre 2018 yılı için dünyada bütün türlerden (inek, koyun, keçi, manda, deve) elde edilen toplam süt üretiminin 867 milyon ton ECM (Energy Corrected Milk) olduğu belirtilmektedir. Yine aynı kuruluş tarafından bahsi geçen miktarın % 96’sının inek ve manda sütü olduğu bildirilmiştir.

Süt ve süt mamullerinin üretimi, tüketimi ve ticareti, dünyada meydana gelen ekonomik gelişim ve değişimlerden etkilenmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin kişi başına düşen milli gelirlerindeki artış, insan beslenmesinde önemli bir yeri olan süt ve süt ürünlerinin tüketimini arttırmıştır. Süt mamullerine olan bu talep artışı, ürünlerin üretiminin ve ticaretinin artmasını sağlamıştır (Terin, 2014).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 2020 yılı tahmini verilerine göre ise toplam süt üretimi 860 milyon ton civarı olduğu bildirilmiştir. Belirtilen bu miktar bir önceki yıla göre % 1,4 artış olduğunu göstermektedir (Tablo 1). Bu artışta en büyük pay sahibi Asya kıtası olurken, en fazla üretimin gerçekleştiği ülkeler Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), ve Avrupa Birliği (AB) ülkeleri olmuştur. Türkiye entegre süt üretim tesislerinde yaptığı iyileştirmeler sonucu bir önceki yıla göre üretimini yaklaşık % 1,8

oranında artırarak 2020 yılı için 22 milyon ton civarında gerçekleştirmiştir (FAO, 2020).

Tablo 1. Dünya ve Türkiye süt üretim miktarı (FAO, 2020)

Dünya / Türkiye	2019	2020	2019-2020 (+ % değişim)
Dünya Toplam Süt Üretimi (Milyon Ton)	847,992	860,125	1,4
Türkiye Toplam Süt Üretimi (Milyon Ton)	21,530	21,933	1,8

Süt ve süt mamülleri insanların beslenme ihtiyaçlarını karşılanmasında temel protein kaynağı olmasının yanı sıra gıda sanayisinin de önemli bir hammaddesidir. Günümüzde üretilen toplam süt miktarının büyük bir bölümü gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ulusal Süt Konseyi (USK, 2019) verilerine göre dünyada sanayiye aktarılan inek sütü miktarı bir önceki yıla göre % 1,3 oranında artarak 445 milyon ton civarında olduğu bildirilmiştir. Bu miktarının yaklaşık % 35'i Avrupa Birliği Ülkeleri tarafından karşılanmaktadır. (Tablo, 2).

Tablo 2. Sanayiye aktarılan inek sütü miktarları (USK, 2019)

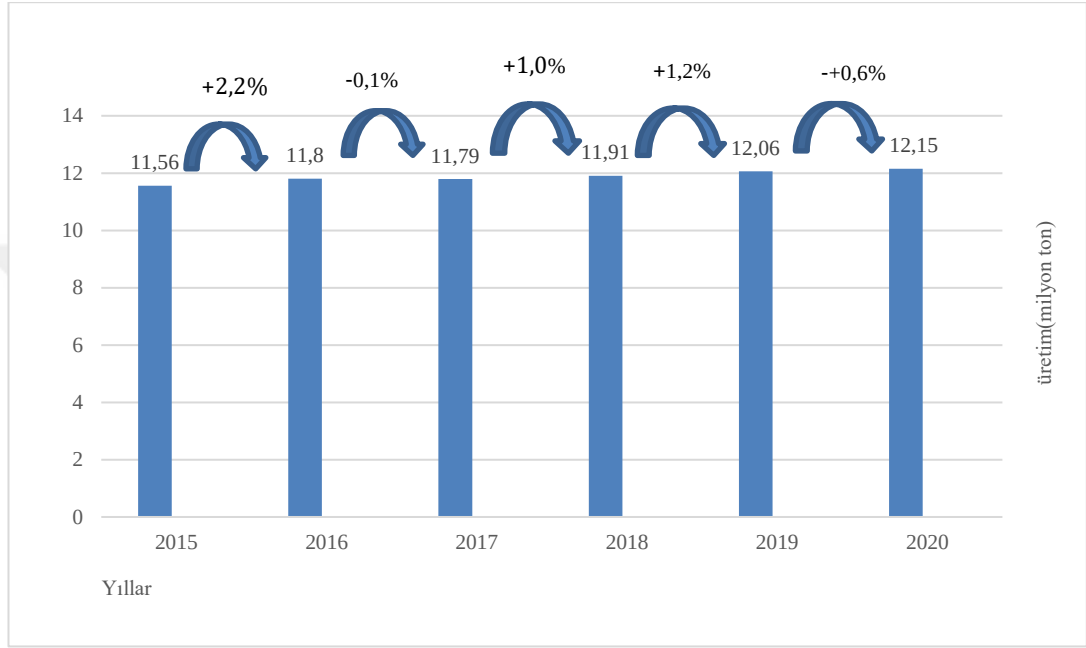
Sıra No	Ülke	Sanayiye Aktarılan İnek Sütü (Milyon Ton)(ECM)
1	Dünya	445
2	Avrupa Birliği Ülkeleri-28	155

Sanayiye aktarılan inek sütü miktarındaki artış ve azalışlara paralel olarak peynir, tereyağ ve konsantre süt ürünlerinin üretiminde de artış ve azalışlar meydana gelmektedir. Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü Gıda Tarım Organizasyonu (OECD-FAO) 2020 yılı verilerinde dünya peynir üretimi bir önceki yıla göre % 1,3 oranında artarak 24 milyon tona, tereyağ üretimi ise % 1,2 oranında artarak 12 milyon tona yaklaştığı bildirmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Dünya peynir ve tereyağı üretim verileri (OECD-FAO, 2020)

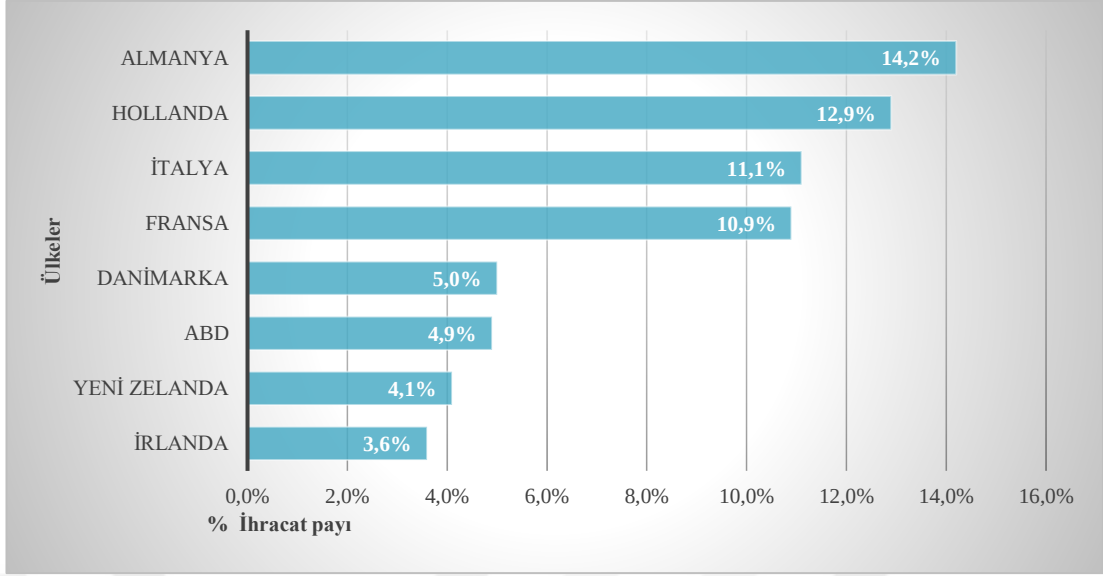
Tereyağı/Peynir	2019	2020	2019-2020 (% + değişim)
Tereyağı (Milyon Ton)	11.577	11.721	1,2
Peynir (Milyon Ton)	23.820	24.138	1,3

Peynir, dünya çapında talebi artış gösteren süt ürünüdür. Peynir üretiminde dünyada en fazla söz sahibi olan ve dünya toplam peynir üretiminin % 50,4'ünü karşılayan AB ülkelerinde 2020 yılı peynir üretim miktarı bir önceki yıla oranla % 0,6 gibi bir düzeyde artarak 12.15 milyon tona ulaştığı belirtilmiştir (OECD-FAO, 2020). (Şekil 1).



Şekil 1. Avrupa Birliği Ülkeleri peynir üretimi (OECD-FAO, 2020)

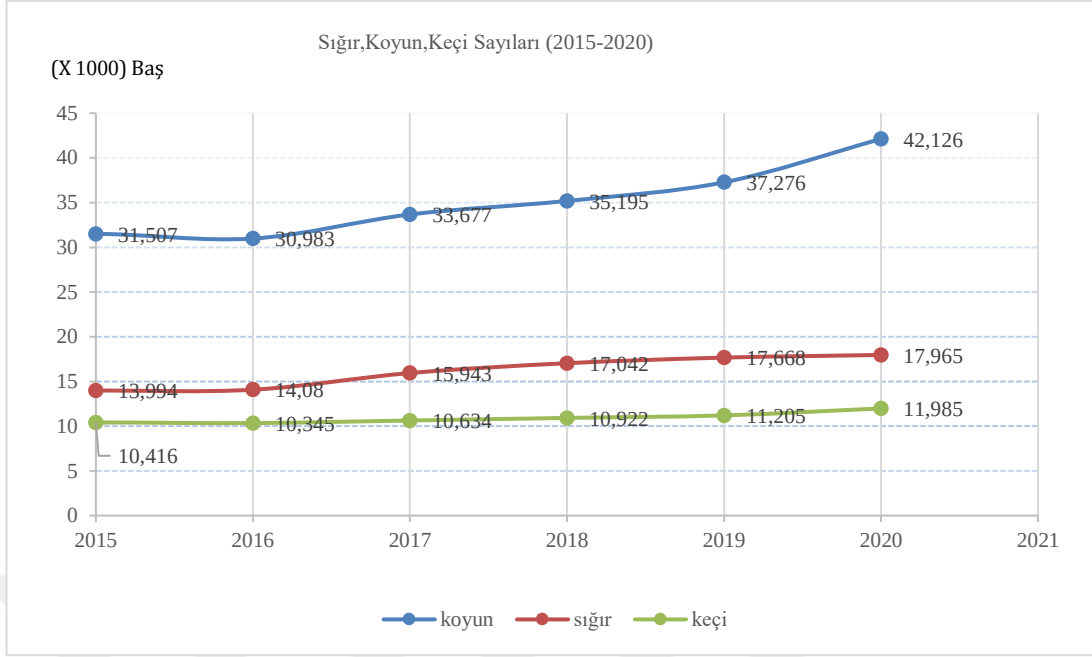
Dünya genelinde en çok üretim fazlası süte sahip olan AB-28 ülkelerinden sonra en büyük ihracatçı konumunda yer alan Amerika Birleşik Devletleri ve Okyanusya ülkeleridir. Dünya süt ürünleri ithalatının yaklaşık % 50'si ise tek başına Çin tarafından gerçekleştirilmektedir. Okyanusya'daki yüksek ihracat oranında, Yeni Zelanda'danın büyük bir payı vardır. Dünyanın en büyük peynir üreticisi olan Avrupa Birliği Ülkeleri 27 milyar dolar ticaret hacmi ile peynir ihracat pazar payının önemli bir kısmını elinde tutmayı başarmıştır. 2019 yılı temel peynir ihracatçısı ülkelerin % pazar payları Şekil 2'de sunulmuş olup, AB ülkelerinden Almanya dünya peynir ihracat hacminin %14,2 'sini gerçekleştirerek dünyanın en büyük peynir ihracatçısı konumuna gelmiştir (ITC, 2020).



Şekil 2. Peynir ihracatçı ülkelerin pazar payları (ihracat dolar eşdeğeri olarak) (World to Exports, 2020)

Günümüzde, dünyada beslenme konusunda oluşan bilinç ile hayvansal protein kaynaklarının önemi daha iyi anlaşılır hale gelmiştir. Ülkemizde de bu bilinç ile birlikte kırsal kalkınmayı destekleme programları kapsamında hayvancılığa yapılan desteklerle gelişen hayvancılık sektörü, ülke ekonomisine önemli katkı sağlamaktadır.

Ülkemiz hayvan varlığında yıllar bazında düzenli artış olduğu görülmektedir. TÜİK (2020c) verilerine göre 2015-2020 yılları arası sığır varlığı % 28,3 artarak 17 milyon başın üzerine, koyun varlığı % 33,7 artarak 42 milyon başa, keçi varlığı ise % 15 oranında artarak 11,9 milyon başa ulaşmıştır (Şekil 3). Üreticilerin süt hayvancılığı konusunda bilinçlenmesi bakım besleme koşullarının iyileştirilmesi sonucunda hayvan başına süt verimi de yükselmiştir. Sağılan inek başına verim son beş yıllık periyotta % 3,2 oranında artarak, 2019 yılı için 3.158 kg/baş olarak hesaplanmıştır (HAYGEM, 2020).



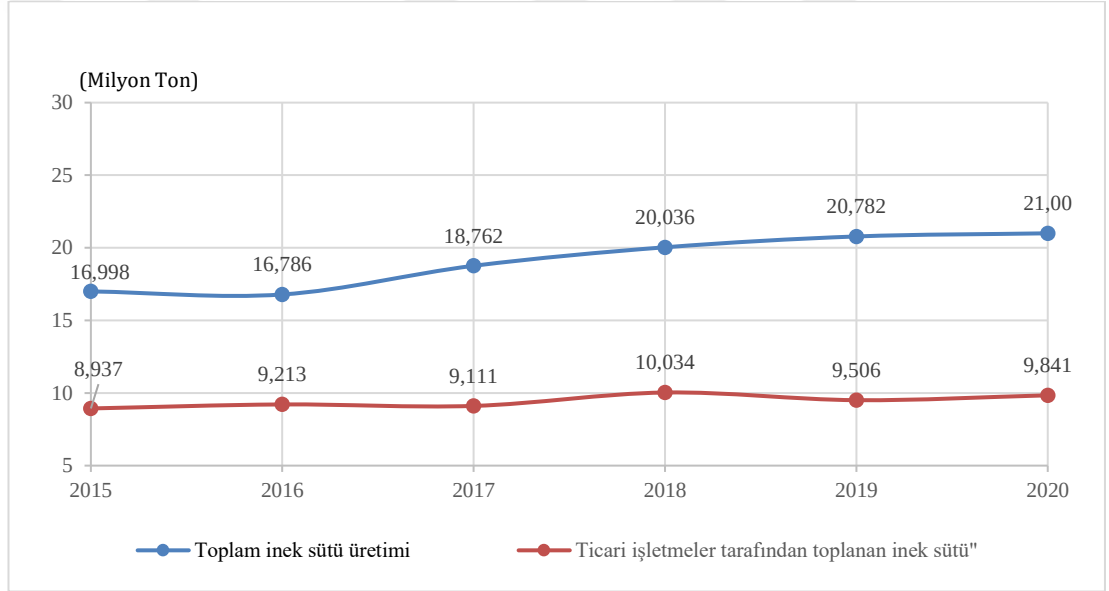
Şekil 3. Ülkemizde 2015-2020 yılları arası sığır-koyun-keçi sayıları (TÜİK, 2020c)

Ülkemizde 2019 yılı için, tüm türlerden elde edilen toplam süt miktarı bir önceki yıla göre % 3,4 oranında artarak 22.960.379 ton olarak hesaplanmıştır (Tablo 4). Aynı yıl toplam üretimin yaklaşık 20 milyon tonunun (% 90,5) inek sütü olduğu bildirilmiştir. Geriye kalan 1,5 milyon tonun koyun sütü (% 6,6), 577 bin ton keçi sütü (% 2,5), 79 bin tonunun da manda sütü (% 0,3) olduğu belirtilmiştir (TÜİK, 2020d).

Tablo 4. 2013-2019 yılları arası hayvan türlerine göre çiğ süt üretimi (TÜİK, 2020d)

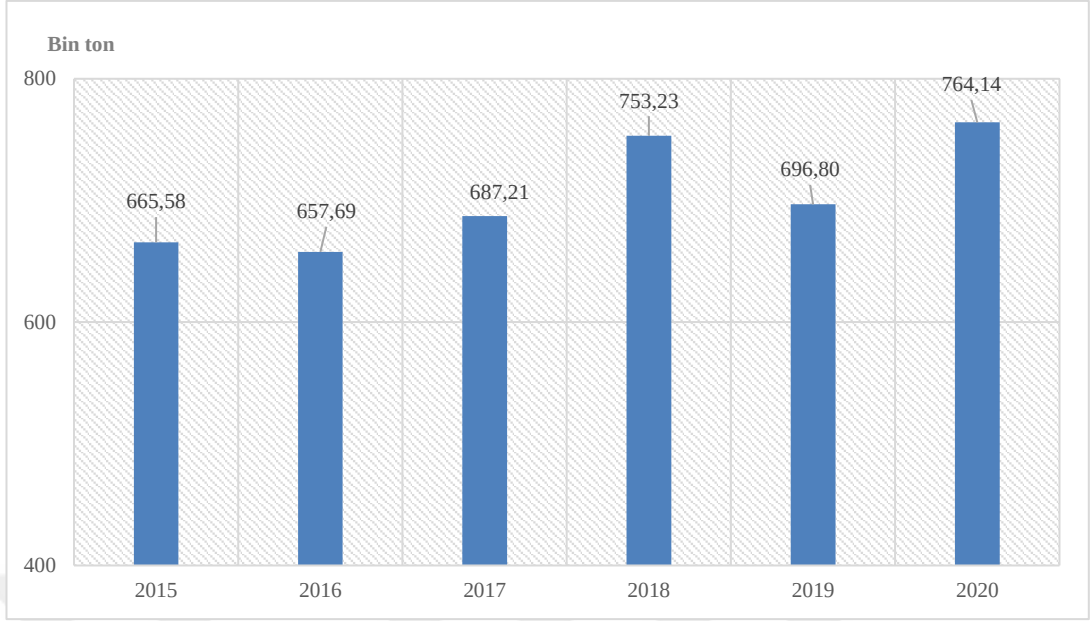
YIL	SIĞIR		MANDA		KOYUN		KEÇİ		TOPLAM
	Ton	% Pay	Ton	% Pay	Ton	% Pay	Ton	% Pay	
2013	16.655.009	91,4	51.947	0,3	1.101.013	6,0	415.743	2,3	18.223.712
2014	16.998.850	91,2	54.803	0,3	1.113.937	6,0	463.270	2,5	18.630.859
2015	16.933.520	90,8	62.761	0,3	1.177.228	6,3	481.174	2,6	18.654.682
2016	16.786.263	90,8	63.085	0,3	1.160.413	6,3	479.401	2,6	18.498.161
2017	18.762.319	90,6	69.401	0,3	1.344.779	6,5	523.395	2,5	20.699.894
2018	20.036.716	90,6	75.742	0,3	1.446.271	6,5	561.826	2,5	22.120.716
2019	20.782.374	90,5	79.341	0,3	1.521.455	6,6	577.209	2,5	22.960.379

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından yıllık olarak ülkemizde tüm hayvan türlerinden elde edilen toplam süt miktarı yanında, ay bazında ticari süt işletmeleri tarafından toplanan süt miktarına ilişkin veriler de yayınlamaktadır. 2020 yılı için ticari süt işletmeleri tarafından toplanan inek sütü miktarı bir önceki yıla göre % 3,5 artış göstererek 9.841.523 ton olarak hesaplanmıştır. 2020 yılında toplam üretilen inek sütünün miktarının tahmini 21 milyon ton civarında olduğu düşünüldüğünde kayıt dışı süt üretimi süt sektöründe önemli bir sorun oluşturmaktadır (Şekil 4). Ülkemizde hayvancılık işletmelerinin coğrafyaya dağılmış olması, genellikle küçük çapta veya aile işletmelerinde üretim yapılması fiili üretim miktarı tespitini güçleştirmektedir (Kamber, 2015).



Şekil 4. Toplam inek sütü üretimi ve ticari süt işletmeleri tarafından toplanan inek sütü miktarı (TÜİK, 2020d)

TÜİK 2020 verilerine göre elde edilen tüm süt türlerinden üretilen peynir 2015 yılında 660 bin ton civarında iken, 2020 yılında % 14 artış göstererek 764 bin ton olarak hesaplanmıştır (Şekil 5). Bu üretimin büyük bir kısmı (% 95,2) inek sütünden elde edilen peynirlerden olmakla birlikte 2020 yılında üretilen miktar, bir önceki yıla göre % 9,7 oranında artış göstermiştir (TÜİK, 2020a).



Şekil 5. 2015-2020 yılları toplam peynir üretim miktarı (TÜİK, 2020a)

Üretilen peynirleri süt kategorisine göre değerlendiren TÜİK, 2020 yılı verilerinde inek sütü peynir üretimini 739.770 ton, karışık süttten elde edilen peynirleri de 27.370 ton olarak açıklamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Süt kategorisine göre 2020 yılı peynir üretim miktarı (TÜİK, 2020a)

Süt kategorisine göre peynirler	2020 yılı Üretim (Miktar ,Ton)
İnek	739.770
Koyun keçi manda veya karışık sütlerden elde edilen peynirler	27.370

2019 yılında üretilen peynirlerin sertlik derecesine göre üretim miktarları Tablo 6'da verilmiştir. Buna göre; yumuşak peynirler 112.243 ton, orta yumuşak peynirler 208.171 ton, sert peynirler 137.880 ton, orta sert peynirler 227.722 ton, ekstra sert peynirler 8.285 ton olarak üretildiği açıklanmıştır (TÜİK, 2020a).

Tablo 6. Peynir sertlik derecelerine göre 2019 yılı üretim miktarı (TÜİK, 2020a)

Peynir Sertlik Derecesi	2019 Yılı Üretim (Miktarı, Ton)
Yumuşak peynirler	112.243
Orta yumuşaklıkta peynirler	208.171
Sert peynirler	137.880
Orta sertlikte peynirler	227.722
Ekstra sert peynirler	8.285
Kesilmiş süttten elde edilen peynirler	2.503
2019 yılı toplam peynir üretim miktarı	696.804

Dünyada yaklaşık olarak 2000’den fazla peynir çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemiz peynir çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir; Tekinşen’e göre (1997) 25 adet, Kamber’e göre (2005) 130’dan fazla, Ünsal’a göre (1997) ise yaklaşık 230 çeşit peynir olduğu bildirmiştir. Ülkemizde üretilen peynirlerin % 60’ı Beyaz peynir, % 17’si Kaşar peyniri % 12’si Mihaliç ve Tulum peyniri, geri kalan % 11’i ise yerel olarak üretilen peynirlerden oluşmaktadır (Kamber, 2015).

Yapılan bu tez çalışmasında fermente süt ürünlerimizden peynirin önemli bir çeşidi olan Mihaliç peyniri incelenmiştir. Mihaliç peyniri, ülkemizde üretilen peynir çeşitleri içinde, ilk beş sırada yer almaktadır (Kamber, 2008). Kendine has organoleptik ve duyuşsal özellikleri olan bu peynirin üretimi yerel de olsa tüketimi daha geniş çaplı yapılmaktadır. Genellikle kahvaltılarda tüketilmesinin yanısıra yemek, salata, tost vb. yerlerde sıklıkla tüketilen, piyasada daima aranan fermente bir peynirdir.

2.2. Geleneksel Mihaliç Peyniri ve Yapım Tekniğı

Mihaliç peyniri ile ilgili gerek Türk Standartlarında gerekse Türk Gıda Kodeksi’nde herhangi bir özellik belirtilmemiştir. Mihaliç peynirini oluşturan dış (kabuk) ve iç (merkez) kısmı bu peynire has fiziksel yapısının oluşmasında önemli rol oynar. Peynirin dış kısmı 3-4 cm kadar nispeten beyaz renkte, sert, parlak ve kuru bir kabuk ile kaplıdır. İç kısmı açık sarıdan krem beyazına kadar değişen renkte ve hafif parlak görünümdedir. İç kısımda peynire karakteristik özellik veren, 3-4 mm çapında, yuvarlak gözenek oluşumu mevcuttur. Bu gözenekler peynir kütlesinde düzgün dağılım gösterir ve peynirin kenarlarına doğru azalır. Bu gözenekli yapıların içlerinin sıvı ile dolması makbul olarak değerlendirilirken, seyrek ve büyük olması istenmeyen

özellikler olarak kabul edilir. Mihaliç peyniri karakteristik olarak hafif tuzlu keskin koku ve lezzettedir (Aday, 2010; Bulut, 2006; Özcan, 2000; Şen, 1991).

Marmara bölgesi geleneksel peynirlerinin en önemlilerinden biri olan Mihaliç peyniri Balıkesir ve Bursa illerinde üretilmektedir. Üretildiği yerlerde “Kelle” peyniri olarak da bilinen sert, tuzlu, salamurada olgunlaştırılan, kaliteli, piyasada talep gören bir peynirdir (Aday, & Karagül-Yüceer, 2014).

Mihaliç peyniri; tarihiyle Osmanlı dönemine dayanan, ilk olarak Bursa ili Karacabey ilçesinin eski adı olan Mihaliç yöresinde, hayvancılık yapan göçmen Arnavut’ların girişimleriyle üretilen, 250 yıllık geçmişi olan bir peynirdir (MEGEP, 2011).

Geleneksel olarak çiğ, tam yağlı, “kıvırcık” ırkı koyun sütünden üretilmesine karşın günümüzde % 60-70 oranında koyun sütünden üretilmekle birlikte inek-keçi sütlerinin karışımından, bazen de sadece inek sütünden üretilmektedir (Özer, 2015).

Geleneksel üretimin yapıldığı bölgelerde sütler genellikle sağımdan kısa bir süre sonra mayalandıkları için herhangi bir ısıtma işlemi ya da pastörizasyon uygulanmamaktadır. Olanaklar ölçüsünde işlenecek çiğ süt, temizlenmesi için 2-3 kat ince bezden süzülür. Sonrasında Balıkesir yöresinde “Polim” adıyla bilinen 100 - 150 litre kapasiteli, meşe ağacından yapılmış üstü geniş, altı dar yarım fıçıya veya Bursa yöresinde “Taarı” adıyla bilinen 250- 300 litre kapasiteli çinko esaslı silindir kaplara aktarılır (Anonim, 1987; Tekinşen, 1997). Mayalama işlemi mevsim sıcaklıklarına göre 26-35 °C arasında değişiklik göstermektedir. Süt sıcak olan yaz aylarında 26 - 28 °C de, soğuk aylarda ise 33-35 °C’de mayalanmaktadır (Anonim, 1987; Eralp, 1974). Kullanılacak 100 kg süt miktarı için 10 ml, 1:10000 gücündeki peynir mayasından katılmakta ve 1 veya 1,5 saat süreyle pıhtılaşmaya bırakılmaktadır (Şen, 1991). Geleneksek şekliyle, pıhtılaşma sonrası teleme üzerinde haç şeklinde çiviler bulunan tahta sopalarla pirinç tanesi büyüklüğüne gelene kadar (10 -15 dk) kırılır. Parçalanmış pıhtı bir taraftan karıştırılırken diğer taraftan karıştırma esnasında huni şeklinde aşağı doğru çukurlaşan kısma yavaş bir şekilde sıcak su dökülerek, pıhtı sıcak su karışımının 5-10 dk içinde 42 - 45 °C’ye gelmesi sağlanır. Böylelikle pıhtı haşlanmış veya pişirilmiş olur. Ancak oluşan pıhtı sıcaklığı, üretim teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Pıhtı bu aşamada yeterli sıcaklığa ulaşamaz ise parçalar birbirleriyle kaynaşmaz, yumuşak kalır ve bunu izleyen depolama süresinde peynir kalıpları şişer.

Isıtma işlemi gereğinden fazla olursa sonraki aşamada Mihaliç peynirine özgü gözenek oluşumu gerçekleşmez (Aday, 2010; Demirci, Şimşek, & Taşan, 1994; Özcan, 2000; Özer, 2015; Şen, 1991). Pişirme aşamasından sonra pıhtı 30 dk kadar bekletilerek peynir kütlesinin tamamının dibe çökmesi sağlanır ve böylelikle süzme bezi (cendere bezi) ile alınması kolaylaşır. Pişirilmiş pıhtı süzme bezi ile alındıktan sonra iki ucu birleştirilerek asılır. Yarık ve çatlakların oluşmasını önlemek ve peynir suyunun çıkmasını sağlamak için pıhtıya süzme bezinin şeklini alana kadar elle baskı uygulanır. Hava sıcaklığına bağlı olarak süzülme işlemi 1-6 saatte gerçekleşir. Ancak bu işlemi kolaylaştırmak ve pıhtının kısa sürede soğumasını sağlamak amacıyla ucu sivri şişlerle, alttan yukarıya doğru pıhtıya şiş geçirilir (Özcan, 2000). Süzme işlemi tamamlandıktan sonra askıdan indirilen Mihaliç peyniri 2,5 - 5 kg parçalar halinde kesilir. “ Kelle ” olarak da adlandırılan bu parçalar, vakit kaybetmeden hazırlanan salamuralara daldırılarak, tuz geçişi sağlanmaktadır (Demirci ve diğerleri, 1994). Bazı yerlerde iki, bazı yerlerde üç tip salamura hazırlanmaktadır. İki tip salamura kullanılan yerlerde peynirler önce % 15 tuz içeren hafif salamurada 2 gün bekletilir. Süre sonunda şişen kelleler % 20-22 tuz içeren kuvvetli salamurada 2-10 gün bekletildikten sonra depolama amacıyla fiçılara alınır. Üç tip salamura kullanılan yerlerde ise kelleler önce % 15 tuz içeren hafif salamurada, üst tarafa gelen düz yüzeylerine iri tuz serpilerek, 2 gün bekletilmektedir. Bu aşamada ilk 12 saat içerisinde kellelerin rengi sararmakta ve salamurayı hızla içine çekerek büyümektedirler. Üçüncü gün peynirler % 16 -17 tuz içeren (orta kuvvet) salamuraya alınmakta ve 2-3 gün burada bekletilmektedir. Daha sonra peynirler % 18-20 tuz içeren (sert) salamurada 4-15 gün bekletilmektedir (Aday, 2010; Bulut, 2006; Özcan, 2000; Özer, 2015). Bu şekilde salamurada bekletilen peynirler aralarına tuz serpilerek fiçilerde depolanır. Bu sırada kalıpların dış yüzeylerinde kabuk oluşur ve sertleşir. Mihaliç peynirinin olgunlaşması soğuk depolarda 3-4 ay zaman almaktadır. Fermantasyon işlemleri nedeniyle peynirde gözenekler oluşmakta, bu gözeneklere zamanla tuz çözeltisi dolmaktadır. Gaz alış veriş bittiğinde ise kalıpların yüzeyi kremi bir tabaka ile kaplanmaktadır. Bu aşama peynirin tüketilebilecek duruma geldiğini gösterir. Tüketim aşamasından önce peynirler suda biraz bekletilerek tuzun azalması sağlanır, peynirler 12 ay boyunca bozulmadan saklanabilirler (Aday, 2010).

Koyun ve inek sütü karışımlarından üretilen Mihaliç peynirlerinde randıman % 20 iken, sadece inek sütünden yapılan peynirlerde randıman % 12 olmaktadır (Özcan, 2000; Özer, 2015). Ham peynir randımanı daha düşük olsa da tuzlama ve olgunlaşma sırasında peynir bir miktar salamura çektiğinden randıman artışı meydana gelir (Aday, 2010; Bulut, 2006).

2.3. Mihaliç Peynirinin Kimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Mihaliç peyniri ile ilgili yapılan çalışmaların birçoğu peynirinin kimyasal özelliklerini belirleme yönünde olmuştur. Mihaliç peyniri üretim şekli ve kimyasal nitelikleri bakımından Kaşar peynirine, salamurada olgunlaştırılması bakımından ise Beyaz peynire benzemektedir (Aday, 2010).

Kamber (2008) yaptığı çalışmada Mihaliç peynirinin bazı kimyasal özelliklerini incelemiştir. Çalışma sonucu belirtilen kimyasal özellikler Tablo 7 'de verilmiştir. Buna göre peynirlerin nem içeriği % 32,64 - 40,66, protein miktarı % 24,78 - 26,47, tuz miktarı % 7,49 - 9,34, yağ miktarı % 28,73 - 30,65 arasında olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada 100 gr Mihaliç peynirinin 131 mg potasyum, 988 mg kalsiyum, 43,8 mg magnezyum, 518 mg fosfor, 1465 mg sodyum içerdiği belirtilmiştir. Enerji değeri ise 383 kkal olarak hesaplanmıştır.

Tablo 7. Mihaliç peynirinin bazı kimyasal özellikleri (Kamber, 2008)

Nem (%)	Yağ (%)	Protein (%)	Tuz (%)	Asitlik (%)	Sütün Cinsi
32,64	28,73	24,78	8,89	98,98*	-
33,45	30,65	26,47	7,97	84,00*	-
40,66	23,75	24,88	9,34	54,08*	İnek Sütü
37,8	26,5	26,2	7,88	68,36*	Keçi Sütü
35,21	29	25,07	7,49	98,91*	Koyun Sütü
32,86	27,48	-	9,1	1,68**	-
36,9	25	26,1	9,08	1,43**	-

*Soxhlet Henkel (SH) ** Laktik asit (%)

Eralp (1974) Mihaliç peynirleri ile yaptığı çalışmada; toplam kuru madde % 56,7 – 71,9, yağ % 25,5 – 34,9, protein % 20,2 – 32,4, tuz % 5,1 – 10,9 ve asitliğin 46,2 - 53 SH° değerleri arasında olduğunu belirtmiştir.

Yaygın, Gahun, & Karagülle (1984) çiğ inek, koyun ve keçi sütlerinden yapılan Mihaliç peynirleri ile yaptıkları çalışmada, peynirlerin 3 aylık olgunlaşma dönemi boyunca kimyasal bileşimlerdeki değişimleri incelemişlerdir. Tüm örneklerde

ortalama kuru madde oranının % 51,41 - 64,79, pH değeri 4,97 - 5,68, tuz % 11,55 - 17,18, asitlik değeri 36,50 - 98,91 SH°, yağ miktar oranı % 23,25 - 29,00, kurumaddede yağ miktarı % 43,71 - 50,99, toplam protein % 23,58 - 26,20 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Demirci (1989) olgunlaşmış Mihaliç peyniri ile yaptığı çalışmada, peynirlerin % 65,37 kuru madde, % 31,14 süt yağı, % 25,33 protein, % 8,51 kül birleşimine sahip olduğunu bildirmiştir.

Tekinşen (1997) Mihaliç peyniri örnekleriyle yaptığı çalışmada ortalama kuru madde, yağ, protein sırasıyla % 66,5, % 26,5, % 30,6 olarak tuz oranının ise % 8,0 olduğunu belirtmiştir.

Altun, & Akyüz (1998) yaptıkları çalışmada Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesinden tesadüfi olarak 15 adet Kelle peyniri toplamışlar ve bu peynirlerin fizikokimyasal analizlerini yapmışlardır. Buna göre Kelle peyniri örneklerinde, % laktik asit cinsinden titrasyon asitliğini % 0,35 - 1,20, yağ oranını % 21-50 - 36,50, protein oranını % 16,75 - 27,03, kuru madde oranını % 63,01 - 75,80, kül oranını % 9,00 - 13,00 arasında, tuz oranının ise % 5,61 - 9,59, arasında değişen değerlere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Dayıcı (2000) İnek, koyun ve keçi sütlerinin karışımıyla pastörize edilmeden üretilen 4 çeşit Mihaliç Peyniri ile yaptığı çalışmada, peynirleri % 20 tuzlu salamura içeren ağzı vakum kapaklı plastik kaplarda 15 °C' de 3 ay süre ile olgunlaştırmıştır. Olgunlaşma döneminin 7., 30., 60. ve 90. günlerinde kimyasal analizleri yapılan peynirlerin analiz sonucuna göre ortalama kuru madde değerlerinin % 49,93 - 52,54, yağ değerlerinin % 21,50 - 27,75, kuru maddede yağ değerlerinin % 43,05 - 52,79, rutubet değerlerinin % 47,46 - 50,07, tuz değerlerinin % 9,43 - 10,26, kuru maddede tuz değerlerinin % 18,07 - 20,64, asitlik değerlerinin de % 0,64 - 0,72 arasında değiştiğini belirtmiştir.

Özcan (2000) 70 adet Mihaliç peyniri örneği üzerinde yaptığı çalışmada peynirlerinin ortalama kuru madde oranlarının % 52,20 - 64,12, protein oranının % 19,89 - 23,14, yağ oranlarının % 21,86 - 24,57, pH değerlerinin 5,53 - 5,86, titrasyon asitliğinin % 0,31 - 0,57, tuz oranının % 3,82 - 8,07 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Öner, & Şanlıdere (2003) yaptıkları çalışmada keçi sütünden üretilip 3 ay olgunlaşma dönemi geçirmiş Mihaliç peynirlerinin kimyasal özelliklerini

incelemişlerdir. Analiz sonuçlarına göre peynirlerde, toplam kuru madde içeriği % 53,70 - 64,59, yağ içeriği % 21,5 - 24,0, toplam azot % 3,06 - 4,31, suda çözünen azot % 0,14 - 0,23 arasında, pH 5,15 - 5,76, titrasyon asitliği % 0,94 - 1,66, tuz % 3,51 - 10,06 arasındaki değerlerde hesaplandığını belirtmişlerdir.

Şen, Temelli, & Evrensel (2003) çalışmalarında çiğ süttten üretilen ve 30 gün olgunlaştırılan Mihaliç peynirinde 21 gün boyunca yaptıkları kimyasal analizlerde sonucu pH ve tuz değişimini incelemişlerdir. Peynir örneklerinin pH değerinin 4,35 - 6,55 arasında değiştiğini, tuz değerlerinin ise en yüksek % 8,17'e ulaştığını bildirmişlerdir.

Özdemir, Özdemir, Demirci, Çelik, & Sönmez (2004) Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde üretilmiş olan 20 adet Mihaliç peynir örnekleriyle yaptıkları çalışmada ortalama olarak kuru maddeyi % 62,69, yağı % 26,1, kuru maddede yağı % 41,67, tuzu % 7,84, kuru maddede tuzu % 12,30, proteini % 26,03, titrasyon asitliğini 46,84 SH° ve pH'ı ise 5,78 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Öner, & Aloğlu (2004) Mihaliç peynirinin olgunlaşma periyodunun 1. ve 90. gününde peynirlerin kimyasal özelliklerini incelemiştir. 1. günde, yağı % 22,3, kuru maddede yağı % 38,6, proteini % 22,7, nemi % 42,3, pH'ı 5,2, titrasyon asitliğini % 1,5, tuzu ise % 4,5 olarak belirtmiştir. Olgunlaşmanın 90. gününde ise, yağı % 22,3, kuru maddede yağı % 37,4, proteini % 23, nemi % 39,8, pH'ı 5,4 titrasyon asitliğini % 1,1, tuzu ise % 9,9 olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

Dönmez, Kemal Seçkin, Sağdıç, & Şimşek, (2005) yaptıkları çalışmada 8 adet farklı geleneksel peynirin kimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucu Mihaliç peynirinin titrasyon asitliğini % 1,80, toplam kuru madde içeriğini % 72,57, tuz içeriğini % 4,13, protein içeriğini % 24,75, yağ içeriğini % 27,05, suda çözünen azot miktarını % 0,83, kolesterol miktarını ise 120,20 mg/100g olarak belirtmişlerdir.

Bulut (2006) yaptığı çalışmada pastörize ve çiğ süttten Mihaliç peyniri üreterek, 3 aylık olgunlaşma süreleri boyunca üretilen peynirlerin kimyasal özelliklerini belirlemeye çalışmıştır. Pastörize süttten üretilen örneklerde ortalama değerlere bakıldığında yağsız kuru madde içeriği % 24,66, su içeriği % 44,81, yağ içeriği % 30,50, protein içeriği % 20,81, tuz içeriği % 7,39, pH değeri ise 4,78 olarak bildirilmiştir. Çiğ süttten üretilen peynirlerde ise ortalama yağsız kuru madde içeriği % 28,96, su içeriği % 42,84, yağ içeriği % 28,53, protein içeriği % 22,50, tuz içeriği %

7,26, pH değerini ise 4,84 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda olgunlaşma süresince örneklerin yağsız kuru madde, su oranı, kuru madde de yağ, tuz, kuru madde de tuz, protein, titrasyon asitliği ve pH değerlerinde meydana gelen değişim istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

Gölge, & Şahan (2008) yaptıkları çalışmada farklı lokasyonlarda inek sütünden 8 adet, koyun sütünden 8 adet olmak üzere toplamda 16 adet Mihaliç peyniri üreterek bazı kalite özelliklerini incelemişlerdir. İnek sütünden üretilen peynirde kuru maddeyi % 32,01 - 63,36, yağı % 7,50 - 31,00, proteini % 11,38 - 21,92, pH değerini 4,81- 6,11, titrasyon asitliğini % laktik asit cinsinden 0,12 - 1,16, tuz oranını ise % 6,89 - 10,60 değerleri arasında hesaplamıştır. Koyun sütünden üretilen Mihaliç peynirlerinde kurumadde % 53,32 – 67,06; yağ % 23,00 - 31,00, protein % 16,28 – 26,97, pH değerini 5,28 - 6,11, titrasyon asitliğini % laktik asit cinsinden 0,16 - 0,34, tuz oranını ise % 6,57 – 10,52 arasındaki değerlerde olduğunu belirtmişlerdir.

Aday (2010) Marmara bölgesinin farklı illerinde üretimi yapılmış olan 15 adet Mihaliç peyniri ile yapmış olduğu çalışmada peynirinin bazı kimyasal özelliklerini araştırmıştır. Yapılan kimyasal analizlerde, peynirlerin kurumadde oranları % 56,75 - 64,13 değerleri arasında, yağ oranları % 25,25 - 33,00, protein miktarlarını % 18,64 - 24,63, pH değerlerini 5,09 - 5,92 arasında, titrasyon asitliğini % 0,37 - 1,04, tuz oranları ise % 3,27 - 8,18 değerleri arasında değişmekte olduğunu belirtmiştir.

2.4. Mihaliç Peyniri Üzerine Yapılan Mikrobiyolojik Çalışmalar

Mihaliç peyniri ile ilgili yapılan mikrobiyolojik çalışmalar çoğunlukla patojen bakteri arama veya toplam bakteri ve koliform gurubu bakterileri sayılarını belirleme araştırmaları ile sınırlı kalmıştır.

Çiğ süttten, 56 °C’de 2 dakika ısıtılan süttten ve pastörize süttten olmak üzere 3 ayrı Mihaliç peyniri üreten ve bu peynirleri mikrobiyolojik olarak inceleyen Şen (1991), pastörize süttten üretilen 3 ay boyunca olgunlaştırılmış peynirin toplam aerob bakteri sayısını 1.6×10^4 - 1.1×10^5 kob/g, laktik streptokok sayısını 7.8×10^1 - 3.9×10^1 kob/g, fekal streptokok sayısını 6.4×10^2 - 1.2×10^4 kob/g, laktobasiller 1.2×10^2 - 5.2×10^2 kob/g, propiyonik asit bakterisi sayısını 3.7×10^1 - 6.4×10^1 kob/g olarak bildirmiştir. Stafilokoklar bir peynir örneğinde bulunmazken, diğer iki örnekte 2.1×10^2 - 7.4×10^1 kob/g olarak bulunduğunu, koliform bakteri iki peynir örneğinde bulunmazken, bir örnekte 2.4×10^2 kob/g olarak bulunduğunu belirtmiştir. Peynir

örneklerinde olgunlaşma dönemi boyunca maya – küfe rastlanmadığını belirtmiştir. Çiğ süttten üretilen Mihaliç peynirinde ise toplam aerob bakteri sayısı $5.3 \times 10^6 - 2.2 \times 10^7$ kob/g, koliform bakteri sayısı $6.3 \times 10^2 - 2.4 \times 10^3$ kob/g, laktik streptokok $5.6 \times 10^3 - 1.7 \times 10^5$ kob/g, fekal streptokok $4.2 \times 10^4 - 3.7 \times 10^5$ kob/g, laktobasiller $6.7 \times 10^1 - 4.7 \times 10^3$ kob/g, propiyonik asit bakteri sayısı $9.5 \times 10^4 - 7.4 \times 10^5$ kob/g, stafilokoklar $4.9 \times 10^2 - 6.4 \times 10^3$ kob/g olarak bulunduğunu, maya - küfe ise rastlanmadığını bildirmiştir. 56 °C’de 2 dakika ısıtıl işlem görmüş süttten üretilen Mihaliç peynirinde ise toplam aerob bakteri sayısı $1.6 \times 10^4 - 5.7 \times 10^6$ kob/g, koliform bakteri iki örnekte bulunmazken bir örnekte 1.2×10^2 kob/g, laktik streptokok $6.2 \times 10^2 - 3.7 \times 10^3$ kob/g, fekal streptokok $5.2 \times 10^3 - 2.3 \times 10^4$ kob/g laktobasiller bir örnekte saptanmazken, diğerlerinde $4.2 \times 10^2 - 7.3 \times 10^2$ kob/g olarak bulunduğunu, propiyonik asit bakteri sayısı ise $2.8 \times 10^3 - 6.4 \times 10^4$ kob/g, stafilokoklar $5.5 \times 10^1 - 4.3 \times 10^2$ kob/g olarak, maya - küfe ise rastlanmadığını bildirmiştir.

Bursa ilinde tüketime sunulan Mihaliç peynirlerinden 50 adet örnek toplayarak koliform grubu mikroorganizmalar yönünden inceleyen Şen, Temelli, & Evrensel (2000) çalışmalarında 50 örneğin 44 tanesinde koliform grubu mikroorganizma bulunduğunu, 6 örnekte ise koliform grubu mikroorganizmalara rastlanmadığını bildirmişleridir.

Pastörize edilmeyen İnek, koyun ve keçi sütleri ile Mihaliç peynirleri ihmal eden ve ürünlerin özelliklerini inceleyen Dayıcı (2000) peynirlerin olgunlaşma döneminin 7. gün, 30. gün, 60. gün ve 90. gününde mikrobiyolojik analizler yapmıştır. Yaptığı analizler sonucu 7. gün, 30. gün, 60. gün ve 90. gün sırasıyla ortalama koliform bakteri sayısını 6.88×10^4 kob/g, 1.01×10^4 kob/g, 17 kob/g, 90. günde ise koliform grubu mikroorganizmalar bulunamamıştır. *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella - Shigella* örneklerin hiçbirinde saptanmamıştır. Küf sayısı ise 7. gün ve 30. günde sırasıyla 220 kob/g - 53 kob/g olarak bulunmuş, olgunlaşmanın 60. gününde küf tespit edilemediğini bildirmiştir.

Gölge (2009) çalışmasında çiğ süttten starter kültür kullanılmadan ve 2 farklı ticari starter kültür kombinasyonu (*Str. thermophilus* + *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Str. thermophilus* + *Lb. helveticus*) kullanılarak pastörize süttten Kelle peyniri üretmiş ve 90 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Çalışma neticesinde peynirlerde *Escherichia coli* bulunamazken; koliform bakteri sayısının olgunlaşma süresince

azaldığını bildirmiştir. Çiğ süt kullanılan peynirlerinde başlangıçta 3.12 log₁₀ EMS/g olan koliform sayısı, olgunlaşmanın 90. gününde 2.36 log₁₀ EMS/g'a düşmüştür. Pastörize süttten ve starter kullanılarak yapılan peynirlerinde ise başlangıçta 0.97 ve 1.05 log₁₀ EMS/g olan koliform sayısı; peynirinde olgunlaşmanın 45. gününde ve 90. gününde tespit edilmediğini bildirmiştir.

Çiğ süttten üretilen Mihaliç peynirinin üretimi ve olgunlaşma dönemi boyunca *Yersinia enterocolitica* O:9 suşunun canlı kalabilme yeteneğini incelemeyi amaçlayan Şen ve diğerleri, (2003) çiğ süte 10⁵ kob/ml düzeyinde *Y. enterocolitica* O:9 şusu inoküle ederek Mihaliç peyniri üretmişlerdir. Çiğ süttten, haşlanmış telemeden ve süzölmüş telemeden olgunlaşma döneminin 1. 3. 5. 8. 15. ve 21. günlerinde numuneler alınarak *Y. enterocolitica* yönünden analiz edilmiştir. Çiğ süte 10⁵ kob/ml düzeyinde inoküle edilen *Y. enterocolitica*, haşlanmış telemede 1,5 x 10⁶ - 7,1 x 10⁶ kob/g, süzölmüş telemede 4,2 x 10⁶ - 3,0 x 10⁷ kob/g düzeyünde olduğunu belirtmişleridir. 1. günde 2,4 x 10⁴ – 3,4 x 10⁶ olan *Y. enterocolitica* sayımı 5. günde 9,2 x 10²- 4,0 x 10⁴ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca olgunlaşma periyodu boyunca pH değeriindeki azalış ve tuz miktarındaki artış sebebiyle *Y. enterocolitica*'nın 1. partide 8. gün, 3. ve 4. partilerde 15. gün, 2. partide ise 21. günden itibaren canlılığını kaybettiğini belirtilmişlerdir.

Keçi süttünden imal edilip 3 ay boyunca olgunlaştırılan Mihaliç peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerini inceleyen Öner, & Şanlıdere (2003), peynirlerde *S. aureus* sayısını 5.5 x 10⁶ - 1.4 x 10⁶ kob/g, toplam aerob mezofil bakteri sayısını 7.0 x 10⁶ - 4.0 x 10⁷ kob/g, koliform sayısını <10 - 1.0 x 10⁶ kob/g, toplam psikrotrofilik bakteri sayısını <10 - 3.5 x 10⁷ kob/g, maya - küf sayısını ise 4.0 x 10² kob/g değeri arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Özdemir ve ark., (2004) Bursa, Balıkesir ve Çanakkale bölgelerinden toplanan 20 adet Mihaliç peynir örneğinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine inceleme yapmıştır. Yaptıkları analizlerde, peynir örneklerinde ortalama laktik asit bakteri sayısını 2.6 x 10⁵ kob/g, spor oluşturan bakteri sayısını 28 kob/g, toplam aerob mezofilik bakteri sayısını 1.8 x 10⁷ kob/g, *S. aureus* sayısını 1.8 x 10² kob/g, maya sayısını 20 kob/g ve küf sayısını 1.2 x 10⁴ kob/g olarak hesaplandığını bildirmişlerdir.

Bursa ilinde tüketime sunulan çeşitli peynir ve et ürünlerinde *Y. enterocolitica* varlığını araştıran Evrensel, Yüksek, & Temelli (2006) aldıkları 10 adet Mihaliç peynir numunesinde *Y. enterocolitica* varlığına rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Çiğ ve pastörize süttten Mihaliç peyniri üreterek elde edilen ürünü olgunlaşma periyodu boyunca mikrobiyolojik olarak inceleyen Bulut (2006) pastörize süttten kültür kullanarak ürettiği Mihaliç peynirinde toplam mezofilik bakteri sayısını 1. ve 90. gün sırayla $3,8 \times 10^8$ - $9,6 \times 10^8$ kob/g, toplam mezofilik laktik asit bakterisi sayısı değerleri $9,3 \times 10^6$ - $4,6 \times 10^7$ kob/g, toplam termofilik laktik asit bakteri sayısı değerleri $1,0 \times 10^9$ - $1,2 \times 10^9$ kob/g, propiyonik bakteri sayısının $1,2 \times 10^8$ - $6,6 \times 10^8$ kob/g, toplam koliform bakteri sayısını ise $2,3 \times 10^7$ - $3,9 \times 10^3$ kob/g, olduğunu belirtmiştir. Çiğ süttten ürettiği Mihaliç peynirinde ise olgunlaşma periyodunun 1 ve 90. günlerindeki değerlerinin sırayla, toplam mezofilik bakteri sayısı değerleri $3,7 \times 10^9$ - $1,7 \times 10^9$ kob/g, toplam mezofilik laktik asit bakterisi sayısı değerleri $1,2 \times 10^8$ - $8,6 \times 10^7$ kob/g, toplam termofilik laktik asit bakteri sayısının $1,9 \times 10^9$ - $9,2 \times 10^8$ kob/g, propiyonik bakteri sayısının $7,0 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^8$ kob/g, toplam koliform bakteri sayısı değerlerini ise $2,1 \times 10^7$ - $4,5 \times 10^2$ kob/g, olduğunu belirtmiştir.

Çokal, Dağdelen, Cenet, & Günşen (2012) Balıkesir bölgesinden topladıkları 200 adet geleneksel gıda numunesinde *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus* ve *E. coli* varlığını inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda *L. monocytogenes*'in Mihaliç peynirlerinin % 5'inde tespit edildiği, *Salmonella* spp.'nin ise örneklerin hiçbirinde tespit edilmediğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *S. aureus*'un Mihaliç peynirlerinde yüksek prevalans gösterdiği, ortalama değerinin 2.69 log kob /g olduğunu ve Mihaliç peynir örneklerinde *E. coli* sayısının ise ortalama 1.23 log kob /g olduğunu belirtmişlerdir.

2.5. Mihaliç Peyniri Üzerine Yapılan Duyusal Analiz Çalışmaları

İnek, koyun, keçi süttünden yapılan Mihaliç peynirinin duyusal özellikleri bakımından inceleyen Yaygın ve diğerleri (1984) yaptıkları çalışmaya göre, inek süttünden üretilen Mihaliç peynirleri krem renginde, koyun süttünden işlenen Mihaliç peyniri açık krem renginde, keçi süttü kullanılan peynirinin ise beyaz renkte olduğu belirlenmiştir. Koyun ve keçi süttü peynirlerinin, inek süttü peynirlerine kıyasla daha sert ve sıkı bir yapıya sahip olduklarını bildirilmiştir. İnek süttü peynirinin yapısında küçük yapıda ve diğerlerinden az sayıda orta büyüklükte gözeneklerin bulunduğu

belirtmiştir. Koyun sütünden yapılan Mihaliç peyniri diğer peynirlere göre daha çok beğenildiği, sıralamayı ise keçi ve inek sütleri peynirleri izlediği rapor edilmiştir.

Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesinden tesadüfi olarak 15 adet Mihaliç peyniri toplayan ve duyuşsal analizlerini inceleyen Altun, & Akyüz (1998), on üzerinden değerlendirme yaptığı puanlamada renk ve görünüşün 2,50 - 4,50, yapının 4,83 - 6,50, tat ve kokunun ise 5,50 - 6,66 arasında değişen puanlar aldığını belirtmişlerdir.

İnek, koyun ve keçi sütlerinin karışımıyla pastörize edilmeden üretilen 4 çeşit Mihaliç peyniri ile çalışan Dayıcı (2000), peynirleri % 20 tuzlu salamura içinde ağzı vakum kapaklı plastik kaplarda oda ısısında (15 °C) 3 ay süre ile olgunlaştırmıştır. Olgunlaşma dönemi sonunda yapılan duyuşsal analiz sonucuna göre; peynir çeşitleri içinde duyuşsal özellikler bakımından en yüksek toplam puanı, sade inek sütü ve eşit miktarlarda karıştırılan inek-koyun sütlerinden yapılan Mihaliç peynirlerinin aldığı rapor edilmiştir.

Gölge (2009) çalışmasında kültür kullanmaksızın çiğ süttten ve 2 farklı ticari kültür kombinasyonu kullanarak pastörize süttten (*Str. thermophilus* + *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Str. thermophilus* + *Lb. helveticus*) Kelle peyniri üretmiş ve 3 ay süreyle olgunlaştırmıştır. Çalışmasında starter kültür ve olgunlaşma süresi interaksiyonunun duyuşsal özelliklere etkisi önemli bulunmadığını belirtmiştir ($p>0.05$). Ayrıca duyuşsal özellikler bakımından *Str. thermophilus* + *Lb. helveticus* kullanılarak üretilen peynirin, en beğenilen peynir olduğunu belirtmiştir.

Aday, & Karagöl -Yüceer (2014) Marmara bölgesi illerinden topladığı 15 adet Mihaliç peyniri örneğinde fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özelliklerini araştırmıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda inceledikleri Mihaliç peynir numuneleri arasında duyuşsal özellikler ve aroma-aktif bileşikler açısından farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir. Duyuşsal analiz sonuçlarına göre peynirlerin merkez (iç) ve kabuk (dış) kısımlarında renk farkı olduğu ayrıca peynirlerin sertlik, iç ve dış yapışkanlık, esneme, çiğnenebilirlik ve sakızimsılık özellikleri arasında da fark olduğu bildirilmiştir. Yapılan aroma maddeleri analizi sonucu; diasetil, etil bütirat, bütirik asit, hekzanoik asit, etil oktanoat, 2-feniletıl alkol, p-kresol ve bilinmeyen 4 aroma maddesinin bütün peynir örneklerinde tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Özer (2015) çalışmasında farklı starter kültür kombinasyonları ve farklı haşlama sıcaklıkları deneyerek Mihaliç peynirleri üretmiştir. Kontrol grubu peynirleri

ise kültür kullanılmadan üretilmiştir. Kontrol grubu peynirler, starter kültür kombinasyonları kullanılarak üretilen peynirlere göre daha düşük duyusal puanlar aldığı belirtilmiştir. En yüksek duyusal puanı alan *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus* ve propiyonik asit bakterisi kombinasyonunun kullanıldığı peynirler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca toplam duyusal puanlar dikkate alındığında 45°C’de haşlanan peynirlerin, 40°C’de haşlanan peynirlere göre daha yüksek puanlar aldığı bildirilmiştir.

2.6. Mihaliç Peyniri Üzerine Yapılan Kültür Çalışmaları

Bulut (2006) çalışmasında pastörize ve çiğ süttten Mihaliç peyniri üretilerek olgunlaştırılan ürünün kimyasal özellikleri ve mikroflorasını incelemiştir. Pastörize süttten Mihaliç peyniri üretimi için % 75 oranında DX – 33A DSL kodlu (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc* spp.) ve % 25 oranında TX - 10A DSL kodlu (*Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Lb. helveticus*) içeren kültür kombinasyonunu kullanılmıştır. Olgunlaşma periyodunda peynirlerin su oranı, yağsız kuru madde, kuru madde de yağ, tuz, kuru madde de tuz, protein, titrasyon asitliği ve pH değerlerindeki değişim istatistiki olarak önemli bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca üretilen her iki grup Mihaliç peynirlerinin toplam mezofilik bakteri, toplam mezofilik LAB, toplam termofilik LAB ve toplam maya – küf sayısındaki değişimin istatistiki olarak önemli olduğunu bildirmiştir.

Gölge (2009) çalışmasında kültür kullanmaksızın çiğ süttten ve 2 farklı ticari kültür kombinasyonu kullanarak pastörize süttten (*Str. thermophilus* + *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Str. thermophilus* + *Lb. helveticus*) Kelle peyniri üretmiş ve 3 ay süreyle olgunlaştırmıştır. Yapılan çalışmada starter kullanılmadan üretilen peynirin diğer peynirlerden farkının önemli bulunduğunu ($p<0.05$) bildirmiştir. Çalışmasında starter kullanımının, koliform, maya ve laktik asit bakterileri sayısına etkisinin önemli olduğunu belirtmiştir.

Özcan, & Kurdal (2012) pastörize süt ile *Mucor miehei*’den elde edilen fungal lipaz (% 0,002 oranında) ve *Bacillus subtilis* ’ten elde edilen bakteriyel nötral proteazı (% 0,002 oranında) kullanarak ayrı ve bunlara ilave olarak *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *Leu. mesentroides* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *diacetylactis* suşlarını içeren mezofilik aerobik kültürü %1 oranında kullanarak ayrı 7 adet Mihaliç peyniri üretmiştir. Çalışma sonucunda süttün pastörize edilmesinden sonra mezofilik aromatik

starter kültür, protez ve lipaz kombinasyonun kullanılması Mihaliç peynirin olgunlaşmasında tavsiye edilen faydalı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Özer (2015) çalışmasında farklı starter kültür kombinasyonları ve farklı haşlama sıcaklıkları deneyerek Mihaliç peynirleri üretmiştir. Bu amaçla *Propionibacterium* spp., *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Leu.mesentroides* ssp. *cremoris*'den oluşan starter kültür kombinasyonları kullanılmış, kontrol grubunda ise kültür kullanmamıştır. Çalışma sonucunda starter kültür kullanımının olgunlaşmayı hızlandırdığı ve duyuşal özelliklere olumlu yönde katkı sağladığı rapor edilmiştir.

Geleneksel yöntemlerle üretilen Mihaliç peynirinden maya izolasyonu ve identifikasyonu yapan, enzimatik aktivitelerini inceleyen, Karasu-Yalçın, Senses-Ergül, & Özbaş (2017) 29 adet Mihaliç peynir örneğinden 72 maya izolatu elde etmiştir. Çalışmalarında tanımlanan mayaların *Candida*, *Geotrichum* ve *Trichosporon* türlerine ait olduğunu belirtmişlerdir. *Candida famata* var. *famata*'nın ise Mihaliç peynir örneklerinde en baskın tür olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Özer, & Kesenkaş (2019) yaptıkları çalışmalarında Mihaliç peyniri üretiminde en uygun kültür kombinasyonunu ve haşlanma sıcaklığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Pastörize süte, *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus* ve *P. freudenreichii* kültürlerini içeren kombinasyonu ilave ederek ürettikleri peynirlerin, duyuşal özelliklere ve olgunlaşma süresine olumlu katkılar yaptığını belirtmişlerdir. Ayrıca proteoliz bakımından, haşlanma sıcaklığının 45°C olması 40°C'den daha uygun olduğunu, yüksek lipoliz seviyeleri için haşlama sıcaklığının 40°C olmasının tavsiye edilebileceğini bildirmişlerdir.

2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri, gıdaların fermentasyonunda rol alan mikroorganizmalar içerisinde önemli bir grubu oluşturmaktadır. Bu bakteriler fermente süt ürünleri, sebze ürünleri, et ürünleri ve hububat ürünleri gibi çeşitli gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. En bilinen fermentasyon olan laktik asit fermentasyonunun yanı sıra alkol fermentasyonu, propiyonik asit fermentasyonu, çeşitli bakteri ve küflerin meydana getirdiği fermentasyon şekilleri de bulunmaktadır (Şengün, 2011).

Doğada çok yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileri uzun zamandır bilinmektedir. XX. yüzyılın başlarında Rus bilim adamı Eli Metchnikoff tarafından olumlu etkileri bahsedilen laktik asit bakterileriyle ilgili, günümüze kadar birçok

Çalışma yapılmıştır (Tamime, & Deeth, 1980). Çok farklı ekolojik ortamlarda bulunabilen laktik asit bakterileri genellikle besin içeriği zengin olan ortamlarda bulunmaktadır. Yaşam alanlarına süt ve strnleri, işlenmemiş taze veya fermente olmuş bitkiler verilebileceği gibi, ağız, vajina, insan ve hayvan bağırsak mukoza içerikleri de doğal yaşam alanlarına birer örnektir. Bu organizmalara su ve toprakta nadiren rastlanılmaktadır (İşleroğlu, Yıldırım, & Yıldırım, 2008).

Morfolojik açıdan çok farklı özelliklere sahip olan laktik asit bakterileri (kısa veya uzun, omak veya kok şekilli) fizyolojik açıdan oldukça benzer özellikler göstermektedir. Tmyeler Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, spor oluşturmayan, sitokromdan yoksun, fakültatif anaerob, genellikle homofermantatif, hareketsiz, çubuk veya kok şekilli mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (şenocak-Soran, 2018). Laktik asit bakterileri, Gram (+) bakteriler arasında düşük düzeyde guanin ve sitozin (G+C) oranına sahip olan ve genom büyüklükleri genel olarak 1.8 - 3.4 M bp arasında değişen mikroorganizmalardır (Wyszynska, Kobierecka, Bardowski, & Jagusztyn-Krynicka, 2015).

Laktik asit bakterileri aynı zamanda asidi tolere edebilen nitratı redükte edemeyen, oldukça düşük pH ve tuz konsantrasyonlarında gelişme gösterebilen, karbonhidrat metabolizması sonucu ana fermentasyonrn olarak laktik asitreten, mikroorganizmalardır (Adams, & Marteau, 1995; Arslan, 2017; Bulut, 2003).

Laktik asit bakterileri yaşamlarını devam ettirebilmeleri için amino asitlere, B grubu vitaminleri ile pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar. Genellikle mezofilik karakterde olan laktik asit bakterilerinin bazı türleri 5 C'den daha düşük, bazı türleri ise optimum 45 C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Laktik asit bakterileri çoğunlukla 4,0 – 4,5 pH değerleri aralığında gelişebilmelerine karşın bazı türler 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'larda da yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Aynı zamanda bazı türler zayıf proteolitik ve lipolitik özellikler gösterebilmektedir (Caplice, & Fitzgerald, 1999).

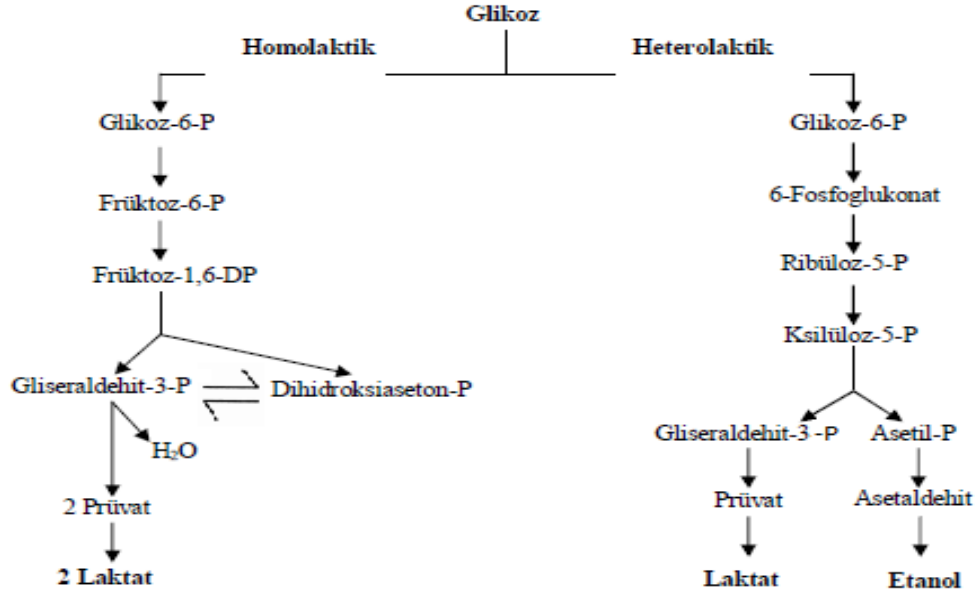
2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında genel olarak kullanılan taksonominin temeli; fizyolojik özelliklere, morfolojik özelliklere, farklı sıcaklık, farklı pH değerleri ve tuz konsantrasyonlarında gelişebilme kabiliyetlerine, arjinin parçalanması ve karbonhidrat katabolizması gibi biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik tanımlamalara dayanmaktadır (Gobbetti, De Angelis, Corsetti, & Di Cagno, 2005).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasına ilişkin yapılan araştırmalar, familyaya ait üyelerin morfolojik özellikleri bakımından değişkenlik gösterse de fizyolojik özellikleri açısından oldukça benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Geleneksel olarak laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasının temelinde morfolojik özellikler önemli bir kriter olarak göz önüne alınmaktadır. Ancak ikinci önemli kriter ise standart koşullar altında glikoz fermantasyon şeklidir (Kırma, 2016).

Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat metabolizmalarına bakıldığında homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki ayrı gruba ayrıldıkları görülür. Açığa çıkan son ürüne göre yapılan bu ayrımında homofermantatif laktik asit bakterileri homolaktik fermantasyon ya da homofermantatif yol ile glikozu parçalayarak, fermantasyon sonucunda % 95–100 oranında laktik asit üretirler.

Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise heterofermantatif ya da heterolaktik fermantasyonla glikozu parçalayarak fermantasyon sonucunda % 50 laktik asit üretirken, bunun yanında yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve früktoz gibi yan ürünler de oluştururlar. Homofermantatif laktik asit bakterilerinin aldolaz ve heksoz izomeraz enzimleri vardır fakat fosfoketolaz enzimi yoktur. Bu nedenle, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) iz yoluna göre 2 laktat/glikoz oluştururlar (Şekil 6). Heterofermantatifler ise fosfoketolaz enzimine sahip olup, aldolaz ve heksoz izomeraz enzimlerinden yoksundurlar ve glikozu indirgemek için heksoz monofosfat (HMP) iz yolunu kullanarak laktik asidin yanında diğer son ürünleri de oluştururlar (Caplice, & Fitzgerald, 1999; Trias, Bañeras, Montesinos, & Badosa, 2008).



Şekil 6. Laktik asit bakterilerinin genel glikoz fermantasyon şeması (Caplice, & Fitzgerald, 1999).

Genel olarak laktik asit bakterilerinin *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* cinsleri heterofermantatif, diğer laktik asit bakterileri ve laktokoklar ise homofermantatiftir (Wormser, & Reid, 2005). Bazı homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit bakterileri türleri Tablo 8’de verilmiştir.

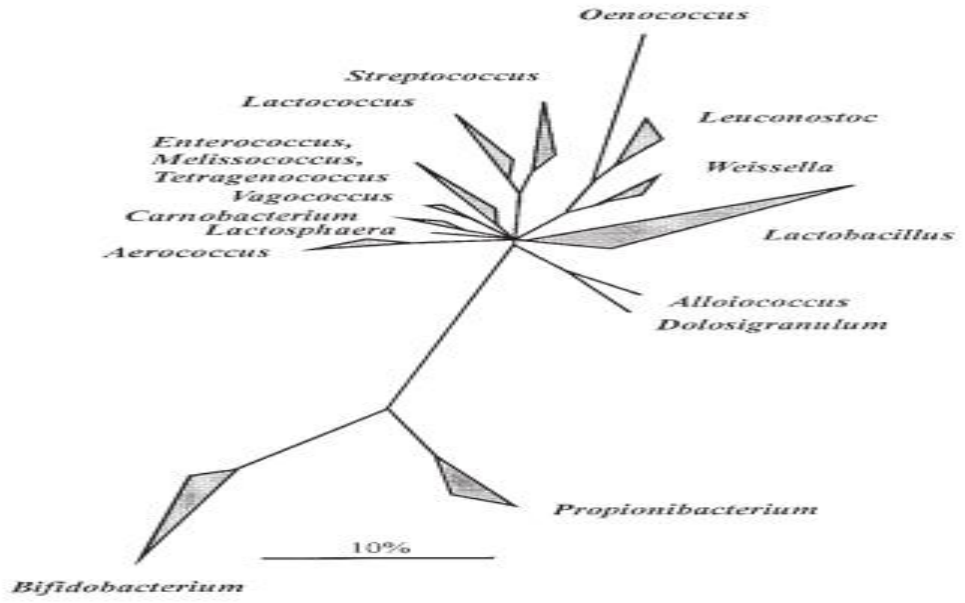
Tablo 8. Homofermantatif ve heterofermantatik laktik asit bakteri türleri (Jay, 2000)

Homofermantatif laktik asit bakterileri		Heterofermantatif laktik asit bakterileri	
<i>Lactobacillus</i>	Guanin + Sitozin (%)	<i>Lactobacillus</i>	Guanin + Sitozin (%)
<i>Lb. leichmannii</i>	50.8	<i>Lb. pontis</i>	53–56
<i>Lb. bulgaricus</i>	50.3	<i>Lb. fermentum</i>	53.4
<i>Lb. lactis</i>	50.3	<i>Lb. cellobiosus</i>	53
<i>Lb. delbrueckii</i>	50	<i>Lb. buchneri</i>	44.8
<i>Lb. casei</i>	46.4	<i>Lb. brevis</i>	42.7–46.4
<i>Lb. plantarum</i>	45	<i>Lb. trichoides</i>	42.7
<i>Lb. coryniformis</i>	45	<i>Lb. coprophilus</i>	41
<i>Lb. curvatus</i>	43.9	<i>Lb. hilgardii</i>	40.3
<i>Lb. helveticus</i>	39.3	<i>Lb. fructivorans</i>	38–41
<i>Lb. acidophilus</i>	36.7	<i>Lb. sanfrancisco</i>	38.1–39.7
<i>Lb. alimentarius</i>	36 - 37	Carnobacterium	
<i>Lb. jurguti</i>	36.5 - 39.0	<i>C. Mobile</i>	35.5–37.2
<i>Lb. jensenii</i>	36.1	<i>C. gallinarum</i>	34.3–36.4
<i>Lb. salivarius</i>	34.7	<i>C. piscicola</i>	33.7–36.4
Vagococcus		<i>C. divergens</i>	33.0–36.4
<i>V. salmoninarum</i>	36-36.5	Weissella	
<i>V. fluvialis</i>	33.6	<i>W. halotolerans</i>	45
Pediococcus		<i>W. confusa</i>	44.5–45.0
<i>P. pentosaceus</i>	38	<i>W. minor</i>	44
<i>P. acidilactici</i>		<i>W. viridescens</i>	43
<i>P. cerevisiae</i>		<i>W. kandleri</i>	39
<i>P. damnosus</i>		<i>W. hellenica</i>	37–47
<i>P. dextrinicus</i>		<i>W. paramesenteroides</i>	38–39
<i>P. inopinatus</i>		Leuconostoc	
<i>P. parvulus</i>		<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	
Tetragenococcus		<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	
<i>T. halophilus</i>	36.5	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	
<i>T. muriaticus</i>		Oenococcus	
Lactococcus		<i>O. oeni</i>	38–42
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	38 - 40		
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i>	38.4 - 38.6		
<i>L. garvieae</i>	38.3 - 38.7		
<i>L. plantarum</i>	36.9 - 38.1		
<i>L. lactis</i> ssp. <i>hordniae</i>	35.2		
<i>L. raffinolactis</i>	40–43		
Streptococcus			
<i>Str. thermophilus</i>	40		
<i>Str. bovis</i>	38–42		

Laktik asit bakterilerin sınıflandırılmasında söz konusu fenotipik tanımlama metotlarından; kesin veriler alınamaması ve az tekrarlanabilirliği gibi nedenlerden dolayı net bir ayırım yapılmadığına kanaat getirilmiş, farklı arayışlar içine girilmiştir. Bazı metotlar halen uygulanabilir olmasına rağmen laktik asit bakterilerin doğru sınıflandırılmasında moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaya başlamıştır. Bununla birlikte geleneksel yöntemlerin uzun süreli analizlere, iş gücüne, yetişmiş personele ihtiyaç duyması, maliyetli olması ve alınan verilerin yoruma açık olması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bundan dolayı, bakterileri sadece bu özelliklerine göre sınıflandırmak, bakteri grupları arasındaki filogenik ilişkiyi tespit etmede ve özellikle de tür ve alt tür tanımlamalarında yetersiz kalmaktadır. Konvansiyonel tekniklerin sayılan dezavantajlarının olması bakterilerin tanımlanmasında moleküler teknikler geliştirilmesine ihtiyacı arttırmıştır (Botina, Tsygankov, & Sukhodolets, 2006; Wormser, & Reid, 2005). Genotipik tiplendirmede yararlanılan metotlar arasında, plazmid profil analizi, restriksiyon endonükleaz analizi, ribotipleme, pulsed-field jel elektroforezi (PFGE), polimeraz zincir reaksiyonuna temeline dayanan yöntemler (PCR-RFLP, Rep-PCR, PCR-ribotipleme ve RAPD) ve nükleotit dizilim analizleri gibi çeşitli yöntemler yer almaktadır.

Woese (1987) yaptığı çalışmada Gram pozitif bakterileri, 16S ribozomal ribonükleik asit (16S rRNA) dizilerinin filogenetik ilişkisine dayanarak, yüksek düzeyde guanin ve sitozin “High (G+C)” oranı içeren *Actinomycetes* dalı ve düşük düzeyde guanin ve sitozin “Low (G + C)” oranı içeren *Clostridium* dalı olmak üzere iki ana dala ayırmıştır. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Pediococcus* gibi tipik laktik asit bakterileri *Clostridium* dalına aittir. Buna karşın, *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium* cinsi ise *Actinomycetes* dalına ait olduğunu belirtmiştir (Stiles, & Holzapfel, 1997; Woese, 1987).

Karşılaştırmalı 16S ribozomal ribonükleik asit (16S rRNA) sekans analizine dayalı DNA’larında düşük guanin ve sitozin “Low (G + C)” oranı içeren laktik asit bakterilerinin başlıca filogenetik grupları içeren konsensus ağacı Şekil 7’de verilmiştir (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth, & Schillinger, 2001).



Şekil 7. Laktik asit bakterilerinin 16S rRNA sekans analizine dayalı başlıca filogenetik grupları (Holzapfel ve ark., 2001).

Laktik asit bakterilerinin taksonomide en çok bilinen cinsleri arasında *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* yer almaktadır (Wormser, & Reid, 2005).

Laktik asit bakterileri ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu son sınıflandırmaya ait sistematik bilgileri Tablo 9’da verilmiştir (LPSN, 2019).

Tablo 9. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması (LPSN, 2019)

<i>Lactobacillales</i>					
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>
<i>Aerococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Abiotrophia</i>	<i>Agitococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Weissella</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Dolosicoccus</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Paralactobacillus</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Floricoccus</i>
<i>Eremococcus</i>	<i>Lactosphaera</i>	<i>Melissococcus</i>	<i>Sharpea</i>	<i>Convivina</i>	<i>Lactavum</i>
<i>Facklamia</i>	<i>Trichococcus</i>	<i>Pilibacter</i>	-	<i>Fructobacillus</i>	-

2.9.Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel Önemi

Laktik asit bakterileri endüstriyel açıdan son derece değerli olan ve son zamanlarda insan sağlığı üzerindeki olumlu fonksiyonları sebebiyle GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde olan “güvenli bakteriler” olarak ta tanımlanmakta ve giderek daha da önem kazanmaktadır.

Fermentasyonu sağlayan laktik asit bakterileri peynir, yoğurt, fermente süt ve tereyağı gibi fermente gıdaların üretimi ve korunmasında gerekli olan mikroorganizmalardır. Ayrıca laktik asit bakterileri son ürünün tat, koku, renk, görünüş gibi organoleptik özelliklerinin geliştirilmesinde de görev almaktadır (Charlier, Cretenet, Even, & Le Loir, 2009). Gıdaların korunmasında kullanımları nedeni de laktik asit üreterek ortam pH' sını düşürmeleri ve buna ilave olarak bazı antimikrobiyal maddeler (bakteriosin ve protein olmayan organik bileşikler gibi) üretme kabiliyetleridir. Laktik asit bakterilerinin birçok suşu gıda ve yem endüstrisinde kullanılır. Bu suşlar süt mamülleri (yoğurt, peynir), fermente et ürünleri (salam, sosis), fermente sebzeler (zeytin, turşu), ekmek gibi gıdalarda bulunurlar. Laktik asit bakterileri bulundukları gıdalarda karbonhidratı β -galaktosidaz enziminin etkisiyle glukoz ve galaktoza parçalar, sonrasında glukoz laktik asite çevrilir. Asidin etkisiyle pH 5'in altına iner ve ürünün istenilen tat ve aroma kazanması sağlanır. Ayrıca gıda kaynaklı patojenler ve patojen olmayan kontaminantların önemli bir bölümü bu pH düşüşüne karşı duyarlıdır (Aşkar, Aslım, & Beyatlı, 1999).

Laktik asit bakterileri gıdaları fermente ederek ürünlerin üretim ve korunması haricinde de birçok fayda sağlamaktadır. Bitki kaynaklı siyanojen gibi sağlık açısından tehlikeli bileşikleri parçalayarak toksisiteyi azaltmaları ve probiyotik etki ile intestinal sistemde mikrobiyal dengeyi düzenlemeleri önemli faydalarındandır (Singh, & Prakash, 2009).

Laktik asit bakterileri, endüstriyel ve geleneksel gıda fermentasyon proseslerinde, fermente gıda ürünlerinin bozulmalara karşı korunmalarında, son ürününün aroma ve tekstür oluşumuna olumlu katkıda bulunmaları gibi amaçlarla endüstride başlatıcı kültür olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri fermentasyon kabiliyetlerinden dolayı süt teknolojisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Starter kültürler, sütte bulunan zararlı mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırarak, ürüne özgü standart kalitede tat, aroma ve yapının oluşması

için süte katılan faydalı mikroorganizmalardır. Starter laktik asit bakterilerinin yanı sıra, starter kültür olarak kullanılmayan bakteriler olan Non-Starter laktik asit bakterileri starter kültürler ile birlikte fermentasyonda ve ürüne özgü aromanın gelişiminde rol oynamaktadır. Starter ve Non-Starter laktik asit bakterileri birlikte laktozu fermente ederek, süt proteinlerini peptitlere ve serbest amino asitlere dönüştürürler, sitratı ise ester, lipid ve uçucu metabolitlere indirgeyerek aroma maddelerinin oluşumuna katkı sağlarlar (Gümüştaş, 2015).

Günümüzde laktik asit bakterileri fermente süt ürünleri başta olmak üzere, etlerin ve sebzelerin fermentasyonunda önemli görevleri olan, faydalı, güvenilir ve son ürünün kalitesini artıran mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri endüstriyel gıda fermentasyon teknolojisinde yaygın olarak yararlanılan mikroorganizma grubudur.

Laktik asit bakterilerinden yararlanılarak üretilen gıdalarda fermentasyon sonucu meydana gelen organik asitler, ürünlerin raf ömrünün uzamasını sağlamıştır. Önemli görevleri olan organik asitler yanında laktik asit bakterileri aynı zamanda istenmeyen mikroorganizmalara karşı inhibitör etkisi olan hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi maddeler de üretmektedirler. Bu antimikrobiyel özellikler laktik asit bakterilerinin endüstride kullanımını oldukça önemli hale getirmiştir (Daeschel, McKenney, & McDonald, 1990).

Laktik asit bakterilerinin önemli kullanım alanlarından biri de probiyotik olarak kullanılabilmesidir. Günümüzde birçok probiyotik türün süt endüstrisinde kullanım alanına girmesiyle birlikte yeni probiyotik fonksiyonel gıdalar da geliştirilmektedir. Probiyotikler genel tanımlamada “Uygun miktarlarda alındıklarında konak canlının sağlığı üzerinde olumlu etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak ifade edilir. Bunun yanı sıra, laktik asit bakterileri antimikrobiyel peptitlerin ve ekzopolisakkaritlerin üretimini gerçekleştirmeleri, diyet takviyeleri, biyodönüştürücüler gibi birçok endüstriyel uygulamalarda bulunmaları nedeniyle çok kıymetli bakterilerdir (Ross, Fitzgerald, Collins, & Stanton, 2002).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması içerisinde yer alan gıda ile ilişkili bakteri cinsleri; *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenecoccus*, *Vagococcus* ve *Weissella*’dır (Arlan, 2017). Gıda endüstrisinde fermente gıda

üretiminde starter kültür olarak kullanılan altı adet laktik asit bakteri cinsi bulunmaktadır. Bunlar *Lactococcus* (süt ürünleri), *Lactobacillus* (süt, et, sebze, hububat ürünleri), *Leuconostoc* (süt ürünleri, sebze), *Pediococcus* (sebze, et ürünleri), *Oenococcus* (*O. oeni*, şarap), ve *Streptococcus* (*Str. thermophilus*, süt ürünleri) şeklinde sıralanabilir (Şengün, 2011). Bunlardan *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconotoc* ve *Streptococcus* olmak üzere 4 grup, süt endüstrisinde kullanılan starter kültür ve kombinasyonlarını içermektedir (Klein, Pack, Bonaparte, & Reuter, 1988).

2.10. Peynirde Laktik Mikrobiyota

Fermente süt ürünleri, fermantasyon ile üretilen gıdalar arasında önemli bir yere sahiptir. Fermente süt ürünleri, sütün laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmesi sonucu oluşur. Fermente süt ürünleri (peynir, yoğurt, tereyağı, kefir ve kıymız) protein, laktoz, yağ, mineral maddeler ve vitaminler bakımından oldukça zengin bir besin kaynağıdır. Ürün mikroflorasında bulunan laktik asit bakterileri bu ürünlere özgü aroma, koku ve yapı gibi özellikleri kazandırmaktadır. Süt ürünleri pastörizasyon ve sterilizasyon gibi ısı işlem görmediği sürece spesifik laktik asit bakterileri bu ürünler içerisinde canlılığını korur. Bu tip doğal fermantasyonla üretilen ürünlerde tat ve aroma ile tekstür gelişimi tamamen doğal laktik mikrobiyotaya bağlıdır ve çok çeşitlilik göstermektedir. Farklı araştırmacıların fermente süt ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterileri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Çeşitli fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri (Şengün, 2011).

Ürün adı	Laktik asit bakteri türü	Kaynak
Tereyağı, yayık ayranı, yoğurt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis diacetylactis</i>	Tamime, & Marshall (1997)
Fermente probiotik süt	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Leroy, & De Vuyst (2004)
Ekşi krema	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Ent. durans</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. pseudomesenteroides</i> , <i>Leu. lactis</i>	Zamfir ve ark., (2006)
Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i>	Chen H, Wang, & Chen M. (2008)
Peynirler	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Leroy, & De Vuyst (2004)

Çiğ süttten üretilen peynirler, laktik asit bakterileri yönünden oldukça zengindir. Bu zengin mikroflora, başlatıcı (starter) laktik asit bakterileri ve ikincil mikroorganizma veya Non- Starter laktik asit bakterileri (starter olmayan laktik asit bakterileri) olarak da bilinen iki gruba ayrılır. Başlatıcı laktik asit bakterileri peynir üretimi esnasında, süt asitliğinin artmasında önemli rol oynarlar. Asitlik artışı kazein stabilitesini zayıflatmakla beraber rennin aktivitesini teşvik ederek peynir üretiminde kullanılan süütün pıhtılaşması kolaylaşmaktadır. Ayrıca olgunlaşma periyodunda sahip oldukları proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ile peynirin karakteristik yapısını oluşumuna katkıda bulunurlar. Non Starter laktik asit bakterileri ise peynir üretimi sırasında süt asitliğinin artmasına katkıları yoktur. Ancak olgunlaşma periyodunda çeşitli organik asitlerin oluşumuna önemli katkı sağlarlar. İkincil mikroflora, peynir dış yüzey kısmında ve/veya merkez iç kısmında gelişebilen, başlatıcı kültür dışında kalan laktik asit bakterilerinden oluşabildiği gibi maya ve küflerden de oluşabilmektedir (Fox, McSweeney, & Lynch, 1998). Farklı araştırmacıların yabancı tip peynir çeşitleri ile yaptıkları çalışmalarda izole ettikleri laktik asit bakterileri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Fermente peynir çeşitlerinden izole edilen laktik asit bakterileri (Şengün, 2011).

Ürün adı	Laktik asit bakteri türü	Kaynak
Gözeneksiz sert peynirler	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Leroy, & De Vuyst (2004)
Küçük gözenekli peynirler	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Leroy, & De Vuyst (2004)
Morocco yumuşak beyaz peyniri	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. bunchneri</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. garvieae</i> <i>L. raffinolactis</i> , <i>Leu. pseudomesenteroides</i> <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. citreum</i> , <i>Ent. durans</i> <i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>Ent. saccharominimus</i>	Ouadghiri, Amar, Vancanneyt, & Swings (2005)
İsveç ve İtalyan tipi peynirler	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. casei</i>	Leroy, & De Vuyst (2004)
Yunan Graviera peyniri	<i>Lb. casei/paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> <i>Str. thermophilus</i> , <i>Ent. faecium</i>	Samelis ve ark., (2011)

2.11. Peynir Teknolojisinde Starter Kültür Kullanımı ve Peynir Starterleri

Besin değerleri bakımından oldukça önemli bir yerde olan fermente süt ürünleri geçmişte doğal fermantasyon ile yapılırken, günümüzde güdümlü fermantasyona geçiş söz konusudur. Güdümlü fermantasyonda süt ürünleri üretiminde ham madde olan süt pastörize edilirken, zararlı mikrobiyota yanında ürün oluşumu sırasında yararlı olabilecek mikrobiyota da yok edilir. Bunların yerine genellikle 2-3 farklı başlatıcı kültürler (starter kültür) katılır. Isıl işlem görmüş sütlerden üretilen fermente ürünlerinin standart ve yüksek kalitede üretilmesi için, ürüne has özellikleri taşıyan başlatıcı kültürlerin kullanılmaları teknolojik bir zorunluluktur. Başlatıcı kültürler, ürüne beklenen tat, koku, aroma ve yapı gibi özellikleri kazandırmanın yanı sıra sütte bulunan zararlı mikroorganizmaların gelişimini sınırlandırabilir, ürüne bulaşan patojen bakterilere karşı inhibisyon özellik gösterebilirler (Bacus, & Brown, 1981; Ertürkmen, 2014; Gümüştas, 2015; Kırmacı, 2010). Bu inhibisyon mekanizması starter kültür tarafından laktik asit üretimiyle başlar. Laktik asit, hücre membranlarından geçer, hücre içindeki asidik pH; deformasyona, enzimatik aktivitelerde hasara, proteinler ve DNA yapısına zarara neden olur. Diğer bir mekanizma ise, hücre zarı geçirgenliğindeki değişiklikleri nedeniyle substrat taşınımının engellenmesidir. Ayrıca hücre içindeki pH değişikliklerini NADH oksidasyonunu baskılar, bu durum elektron taşıma sistemini

etkiler ve sonucunda mikroorganizmanın ölümüne yol açar (Kang, Vézinz, Laberge, & Simard, 1998; Mani-Lopez, García, & López-Malo, 2011; Yüce, 2017).

Peynir üretiminde süte starter kültür ilave edilmesi sütte asitliği artırır ve peynir mayasının sütü pıhtılaştırma süresini kısaltır. Aynı zamanda bu durum peynir suyuna geçen yağ ve protein miktarını azaltmakta, peyniraltı suyunun ise ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca starter kültürler, fermentasyon işlemi esnasında ürettiği laktik asit ile enzimlerinin proteoliz/aminoasit katabolizmasını aktive ederek ile peynir olgunlaşmasına da katkıda bulunurlar. Bu sayede olgunlaşma esnasında gerekli tat aroma maddelerinin oluşumu sağlanır ve peynire özgü lezzet oluşmaktadır. Starter kültür kullanılan peynirlerde salamuradan kitleye yeterli ve dengeli tuz geçişi sağlanmakta, kültürlerin glikolitik ve lipolitik aktiviteleri sonucunda H₂O₂, bakteriyosin gibi antimikrobiyal bileşikler üretilmekte ve bu sayede patojen bakterilerin gelişmesi önlenmektedir. Yine üründe pH ve redoks potansiyelinin düşmesiyle kontaminant bakteriler inhibe olur. Sonuç olarak starter kullanımı ile peynirin raf ömrü uzar, standart kalite ve randımanda ürün elde edilmiş olur.

Peynir üretiminde, laktik asit bakterilerinin belirli türlerinden seçilmiş, kontrollü şartlar altında geliştirilmiş, dayanıklı, asit üretim kapasitesi yüksek kültürler starter kültür olarak tercih edilmelidir (Gürsoy, & Kesenkaş, 2011; Kılıç, 2011; Tekinşen, 1997; Yaygın, & Kılıç, 1993).

Süt endüstrisinde kullanılan starter kültürler optimum gelişim sıcaklıklarına göre mezofilik (optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasında) ve termofilik (optimum gelişme sıcaklıkları yaklaşık 42°C) olarak iki guruba ayrılmaktadırlar. Peynir üretiminin büyük bir bölümünde mezofilik kültürlerden yararlanılır. Termofilik kültürler ise proseslerinde yüksek ısı işlem olan peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır (Kırmacı, 2010; Özer, 2015; Şengün, 2011). Bu tip kültürler yoğurt ve özellikle de sert ve telemesi pişmiş peynirlerde (Emental, Gruyere, Parmigiano ve Grana) kullanılmaktadır (Delcour, Ferain, & Hols, 2000).

Endüstride peynir üretiminde yaygın olarak kullanılan mezofilik kültürler *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* türleridir. Termofilik kültürler ise *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. casei* ssp. *casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Str. thermophilus* türleridir (Nasrollahi, Nasrollahi, Esmaeili, Kaviani, & Shariati, 2016) (Tablo 12).

Ancak bazı özel peynir türlerinde (Mozzaralla ve Cheddar) hem termofilik hem de mezofilik kültürler kullanılabilir (Beresford, Fitzsimons, Brennan, & Cogan, 2001; Parente, Rota, Ricciardi, & Clementi, 1997).

Tablo 12. Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri (Nasrollahi ve ark., 2016)

Peynir Üretiminde Starter kültür Olarak Kullanılan Laktik Asit Bakterileri	
Mezofilik laktik starterler	Termofilik laktik starterler
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
<i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i>
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Lb. helveticus</i>
	<i>Str. ssp. thermophilus</i>

Lactococcus spp., *Lactobacillus* spp., *Str. thermophilus* türlerinin starter olarak kullanıldığı peynirlerde proteoliz artarak özellikle kısa peptitler ve serbest aminoasitlerin seviyelerinin yükselmektedir. Bu türlerle oluşturulan kültürlerde bulunan *Streptococcus* türlerinin asıl işlevi laktik asit üretimidir. *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* asit üretimi yanı sıra, sitratı metabolize ederek diasetil, asetaldehit gibi önemli aroma bileşiklerini ve CO₂ oluşturur.

Leuconostoc türleri (*Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* ve *Leu. lactis*) ise heterofermentatif özellikleri ile glikoz fermantasyonu sonucu laktik asit ile beraber CO₂, asetik asit, etanol gibi bileşikler oluşturmaktadır. Bu cins bakterilerin proteolize etkileri önemli düzeyde olmayıp, Gouda ve Edam gibi gözenekli peynirlerde kullanılmaktadır. Bunların dışında *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* türleri ise Cheddar peyniri, yumuşak İtalyan peynirleri ve bazı İsviçre peynirler üretiminde kullanılan starter kültürlerdir (Özer, 2015; Şengün, 2011).

Ayrıca gözenekli peynirlerin üretiminde genellikle *P. freudenreichii* ve *P. shermanii* türleri içeren kültürler tercih edilmektedir (Fox, & McSweeney, 1996; Mc Sweeney, & Fox, 1997). Bu tür kültürler Emmental ve Gruyere ve İsviçre tipi peynirlerde karakteristik gözenek oluşumunda görev alırlar. Tablo 13'de çeşitli spesifik peynirlerde kullanılan starter kültü kombinasyonları verilmiştir.

Mihaliç peynirinde gözeneklerin oluşumunda propiyonik asit bakterilerinin rol oynadığı bilinmekle beraber bu özel peynirin mikroflorası tam olarak açığa kavuşturulmamıştır (Bulut, 2006; Özer, 2015).

Tablo 13. Bazı Peynirlerde Kullanılan Starter Bakteriler (Cogan ve ark., 1997; Gümüştas, 2015; Hayaloğlu, Güven, & Fox, 2002)

Peynir Çeşitleri	Starter Olarak Kullanılan Laktik Asit Bakteri Türü
Camembert	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Penicillium camemberti</i>
Kaşkaval	<i>Str. thermophilus</i> + <i>Lb delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>Str. thermophilus</i> + <i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i>
Cottage peyniri Krem peyniri	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> + Cit(+) <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>Diacetylactis</i>
Matsoni	<i>Lb. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
Parmesan, Romano	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ve <i>Str. thermophilus</i> karışımı
Cheddar	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
İsviçre tipi Emmental	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>P. shermanii</i>
Provolone	Isıya dayanıklı <i>Lactobacillus</i> ve <i>Str. thermophilus</i>
Blue ,Gorgonzola, Roquefort, Stilton	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> + <i>P. Roqueforti</i>
Brick, Limburger	<i>Str. thermophilus</i> + <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> + <i>Str. thermophilus</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>Str. thermophilus</i>
Muenster	<i>Str. thermophilus</i> + <i>Lactobacillus</i> türleri
Gouda ve Edam	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> + <i>Leu. spp.</i>
Mozzeralla	Isıya dayanıklı <i>Lactobacillus</i> ve <i>Str. thermophilus</i>
Beyaz peynir	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> + <i>Lb. helveticus</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> + <i>Lb. plantarum</i>

2.12. Mikrobiyal Genetik Kaynakların Korunması ve Kültür Koleksiyonları

Önceleri yalnızca bir enfeksiyon etkeni olarak bilinen ve değerlendirilen mikroorganizmalar günümüzde biyoteknoloji alanında kullanılmakta, biyoekonomiye katkı sunmakta hatta biyolojik g   olarak nitelendirilmektedir. Geli  en teknoloji ile mikroorganizmaların sahip oldukları zengin gen potansiyelleri yüksek ekonomik yetkinlikte kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar günümüzde sağlık sektöründen eğitim sektörüne, gıda endüstrilerinden tarım ve  evre endüstrilerine, enzim üretiminden yenilenebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesine kadar daha birçok alanda biyoekonomiye hizmet vermektedir.

Biy  e itliliğin ve mikrobiyal zenginliğin korunması, üretilen ürünlerin zenginliğinde ve dünya piyasasında farklı ürünler ile rekabet etmede önem arz etmektedir. Bu sebeplerle dünyanın farklı ülkelerinde hem ulusal, hem de uluslararası mikroorganizma kültür koleksiyon organizasyonları oluşturulmuştur ( nal, &  alı kan, 2014; Yumuşak,  nc l, & Esen, 2005).

2.13. Uluslararası Kültür Koleksiyonu Organizasyonları

Genel olarak kültür koleksiyonları; özellikleri önceden belirlenen mikroorganizma, hücre dizileri ve biyolojik ürünlerin, fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve genetik özelliklerinin korunarak saklandığı, gerektiğinde de araştırmalarda kullanılmak üzere uzun süre ile muhafaza edildiği merkezler olarak tanımlanmaktadır.

Uluslararası kültür koleksiyonu organizasyonları, ülkelerin sahip oldukları biyolojik potansiyelin gücünü boyutunu ve kaynağını belirlemeye yönelik çalışmalar yaparlar. Ayrıca biyolojik materyalin ulusal ve uluslararası üretimini ve dolaşımını uluslararası düzeyde kabul gören yasal altyapıları ile kontrol altında tutar ve aksi halinde çeşitli yaptırımlarda bulunurlar. Bu amaçlara 1990 yılında kurulan ilk organizasyon Word Federation for Culture Collection (WFCC) Dünya Kültür Koleksiyonu Federasyonudur. İlk  alı malarına Avusturalya’da ba lamı  olsa da  u andaki merkezi ise Japonya’dadır.  u an tüm dünyadan 76 ülke ve 768 kültür koleksiyonu üyedir. Bütün bu koleksiyonlarda 3.145.497 mikroorganizma saklanmaktadır (WFCC info, 2019). WFCC organizasyonuna kayıtlı koleksiyonların kıtalar bazında dağılımında Aysa ve Avrupa en çok kültür koleksiyonuna sahiptir.  lkeler bazında ise A.B.D 32 kültür koleksiyonu ve bu koleksiyonlara ait 337.006 adet

mikroorganizma ile WFCC organizasyonuna kayıtlı en çok organizmaya sahip ülkedir. Ülkemizde ise 11 kültür koleksiyonu ve bu koleksiyonlara ait 7824 adet mikroorganizma WFCC organizasyonuna kayıtlıdır (WFCC statistics, 2019). Tablo 14’de WFCC organizasyonuna kayıtlı bazı ülkeler ve koleksiyon sayıları verilmiştir.

Bir diğer uluslararası kültür koleksiyon otoritesi olan (European Culture Collections Organisation, ECCO) Avrupa Kültür Koleksiyonları Birliği, Avrupa ülkelerindeki kültür koleksiyonları arasında işbirliğini sağlamak ve üye koleksiyonlara hem danışmanlık yapmak hem de koleksiyonların tanıtımını sağlamak amacıyla 1981 yılında kurulmuştur. Merkezi Almanya’da olan ECCO, aynı zamanda WFCC zincirinin bir parçasıdır. Bu organizasyona üye 22 Avrupa Ülkesi ve 61 kültür koleksiyonu vardır. Ülkemizden ise Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK), Hayvan Hücrelerinin Kültür Koleksiyonu (HUKUK) ve Kültür Koleksiyonları Enstitüsü (KÜKENS), ECCO organizasyonuna üye koleksiyonlardır (ECCO info, 2019; ECCO members, 2019).

Dünya çapında bazı önemli mikrobiyel kültür koleksiyon merkezleri aşağıda sıralanmıştır.

ATCC American Type Culture Collection

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

IEGM Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms

JCM Japan Collection of Microorganisms

BCCM Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms

IMI CABI Bioscience Genetic Resource Collection

Developmental Cell and Molecular Biology Group Duke University

ALGAE A world catalogue of algal collections

CCAP The Culture Collection of Algae and Protozoa

Tablo 14. WFCC organizasyonuna kayıtlı bazı ülkeler ve koleksiyon sayıları (WFCC statistics, 2019)

Ülke	Koleksiyon Sayısı	Koleksiyonlara Ait Toplam Suş sayısı
A.B.D.	32	337006
Belçika	7	288366
Çin	44	267982
Japonya	26	258924
Hindistan	32	199461
Danimarka	3	112066
Almanya	14	106386
Hollanda	6	106275
Fransa	38	97596
Rusya	30	63793
Polonya	10	9206
İtalya	20	50192
Yunanistan	8	7962
Türkiye	11	7824

2.14. Ülkemizde Mikrobiyal Kültür Koleksiyonları

Ülkemizde kültür koleksiyon çalışmaları 1951 yılında “araştırma ve üretimde kullanılan bütün suşların herhangi bir virülans değişikliğinden korunması için kurutma usulünün kabul edilmesi” kararıyla başlamıştır. Bu bağlamda 1954 yılında Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu ilk kurulan suş koleksiyonu olmuştur.

1970’li yıllarda Çapa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Kürsüsünün çalışmaları da ülkemizde mikrobiyal kültür koleksiyon alanında ilk çalışmalarındandır.

Günümüzde ülkemizde WFCC organizasyonuna kayıtlı 11 adet kültür koleksiyonu ve üye koleksiyonlarda toplamda 7824 adet mikroorganizma mevcuttur. Bu koleksiyonlardan biri İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji bünyesinde bulunan ilk ismi Kültür Koleksiyonu Enstitüsü (KÜKENS) olan Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu Araştırma ve Uygulama Merkezi koleksiyonudur. Bu koleksiyonda suşlardan 1090 adedi bakteri, 160 adeti maya, 140 adeti de mantardır. Bir diğer koleksiyon Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi bünyesinde bulunan ACTINOcc (Ege Üniversitesi Actinomycetes Kültür Koleksiyonu) isimli

koleksiyondur. Bu koleksiyonda da 1.165 adet bakteri suşu mevcuttur. Ayrıca Pamukkale Üniversitesi, Erciyes Üniversitesi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi, Tübitak, Sağlık Bakanlığı, Tarım ve Orman Bakanlığı gibi kuruluşların sahip oldukları koleksiyonlar mevcuttur. Ülkemizde WFCC organizasyonuna üye olan kültür koleksiyonları ve koleksiyon sayıları Tablo 15 'te verilmiştir.

Tablo 15. Türkiye’de WFCC’ye kayıtlı kültür koleksiyonları ve sayıları (WFCC country, 2019)

Sıra No	Koleksiyon Kısaltma İsmi	Koleksiyon İsmi	Koleksiyon Yeri	Bakteri	Maya	Alg	Mantar	Hayvan Hücre Dizisi/ Hidridoma
1	ACTINOC	Ege Üniversitesi Actinomycetes Kültür Koleksiyonu	Ege Üniversitesi Biyo-mühendislik Bölümü	1.165				
2	EGE-MACC	Ege Üniversitesi Microalgae Kültür Koleksiyonu	Ege Üniversitesi Biyo-mühendislik Bölümü			43		
3	EUCC	Erciyes Üniversitesi Kültür Koleksiyonu	Erciyes Üniversitesi	545	764		32	
4	HUKUK	Hayvan Hücrelerinin Kültür Koleksiyonu	Tarım ve Orman Bakanlığı, Şap Enstitüsü					89/10
5	KÜKENS	Kültür Koleksiyonu Enstitüsü (İlk ismi)/ Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu Araştırma ve Uygulama Merkezi	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü	1.090	160		140	
6	MRC	Tübitak Marmara Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonu	Tübitak, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü	16	23		2.014	
7	MU	Muğla Üniversitesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	300	50		7	
8	PUFECC	Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonu	Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	250				
9	RSKK	Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu	Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Müdürlüğü	833	22		21	
10	SOLEY	Soley Microalgae Kültür Koleksiyonu	Soley Biyoteknoloji Enstitüsü					
11	SUFAKM	Su Ürünleri Fakültesi Kültür Koleksiyonu	İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi	250				
Toplam/Genel Toplam				4.449	1.019	43	2.214	99
								7.824

Ülkemizin sahip olduğu iklim çeşitliliği ve bölgesel üretim farklılıkları sebebiyle geleneksel yolla üretilen gıdalar çok zengin bir mikrofloraya sahiptir. Geleneksel ürünler hammaddeden veya çevreden köken alan laktik asit bakterilerinin ürüne bulaşması sonucu doğal fermantasyon ile meydana gelir. Artisanal kültürler veya saha tipi laktik asit bakterileri olarak da tanımlanan bu bakteriler ticari olanlarına göre rekabetçi özellikleri, büyüme oranları, hammaddeye adaptasyonları, antimikrobiyal özellikleri ve tüketicinin aradığı tat, aroma ve kalite nitelikleri bakımından daha üstündür. Son yıllarda geleneksel ürünlerden izole edilen saha tipi laktik asit bakterilerin starter kültür olarak kullanılması olanaklarına ilgi giderek artmaktadır. Ham madde ve çevre kökenli bu mikroorganizmalar starter kültür olarak kullanıldıklarında hem geleneksel hem de ticari üretilen ürünlerde tüketiciler tarafından aranılan nitelikler oluşmaktadır (Demirel, & Gürler, 2016).

Ülkemizde bazı kurum ve kuruluşlar bünyelerinde mikroorganizma kültür koleksiyonları yapıyor olsalar da bu istenilen seviyede değildir. Gerek ham madde gerekse çevreden kaynaklı bu doğal mikroflorayı oluşturan bakterilerin varyasyon veya mutasyona uğramadan saf halleri ile uzun süre canlı kalmasını sağlanmalıdır. Bu amaçla ülkemize özgü koleksiyon çalışmaları sürdürülmelidir. Tarım ve Orman Bakanlığı hem mikroorganizma gen kaynaklarımızın tespiti hem de muhafazası ve sürdürülebilirliği sağlamak amacıyla ile Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesinde Süt Ürünleri Gen Bankası'nı 2016 yılında faaliyete geçirmiştir.

Geleneksel ürünlerden, ülkemize özgü kültür koleksiyonları oluşturarak ürünlerimizi daha lezzetli, daha güvenilir, daha kaliteli bir şekilde geleceğe taşıyabileceğimiz düşünülmektedir.

Bu amaçla çalışmamızda materyal olarak daha önce laktik mikrobiyotasıyla ilgili kapsamlı ve detaylı çalışmaya rastlanmamış olan ülkemize özgü geleneksel peynirimiz Mihaliç peyniri seçilmiştir. Çalışmamızda bu özel peynirin kendine has organoleptik özelliklerinin oluşumunda görev alan doğal laktik mikrobiyotası geniş çaplı bir şekilde araştırılmış, elde edilen laktik asit bakterileriyle Mihaliç peynir kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Çalışmamız Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenmiş olup, laboratuvar çalışmaları Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

bünyesinde kurulan Süt Ürünleri Gen Bankası'nda gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan Mihaliç peynir kültür koleksiyonu Süt Ürünleri Gen Bankası'nda muhafaza altına alınmıştır. Böylelikle koleksiyonun sürdürülebilirliği sağlanarak, endüstriyel anlamda ihtiyaç duyulduğunda üretim imkanı olacaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Projede yapılan çalışmaların ilk aşamasında örnekler peynirin tamamını temsil edecek şekilde herhangi bir ayırım yapılmaksızın bütün olarak analize alınarak Mihaliç peynirinin genel laktik mikrobiyotasının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Daha sonrasında ise duyu analizi sonuçlarına göre yapı ve aroma kusurlu olanlar elenerek, beğenilen peynirler belirlenmiştir. Duyusal analizlerden yüksek puan alan peynirler içerdikleri tuz oranlarına göre az tuzlu ve tuzlu olarak ayrıştırılmışlardır. Yine peynirlerin dış (kabuk) ve iç (merkez) kısımları ayrı ayrı mikrobiyolojik ve kimyasal yönlerden incelenmiştir.

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada geleneksel yöntemlerle çiğ süttan üretilmiş, ticari kültür bulaşmamış ve en az 3 ay olgunlaşma dönemi geçirmiş 53 adet Mihaliç peyniri kullanılmıştır.

Örnekler, Balıkesir İli'nin Marmara Denizi'ne kıyısı olan, Mihaliç üretiminin aktif olarak yerel üreticiler tarafından yapıldığı Gönen ilçesinden başta olmak üzere, Savaştepe, Havran, Manyas ve Karacabey'den toplanmıştır. Mihaliç peynirinin toplandığı ilçelerin coğrafi haritası Resim 1'de verilmiştir.



Resim 1. Mihaliç peynirleri örneklerinin toplandığı ilçelerin coğrafi gösterimi

İnek sütünün yanında, koyun ve keçi sütünden de elde edilen Mihaliç peynirlerini analize alabilmek için numune toplama işlemi nisan mayıs ve haziran aylarında yapılmıştır. Bu dönemler özellikle koyun ve keçi sütünden yapılan peynirlerin satışa sunulduğu aylardır. Sonuç olarak 53 adet Mihaliç peyniri belirtilen

ilçelerin semt pazarları, yerel üreticileri ve şarküterilerden alınmış steril kaplarda soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmıştır (Resim 2). Örnekler çalışmalar yapılincaya kadar vakumlu paketlerde + 4°C’de muhafaza edilmiştir. Toplanan peynirlerin üreticileri tarafından beyan edilen bilgileri (üretim yeri, üretimde kullanılan süt cinsi, tuz oranı ve olgunlaşma süreleri) kayıt altına alınmıştır (Tablo 16).



Resim 2. Toplanan Mihaliç peynir örnekleri görseli

Tablo 16. Toplanan Mihaliç peynir örneklerine ait bilgiler

ÖRNEK NO	İL/İLÇE	LOKASYON	KULLANILAN SÜT CİNSİ	TUZLULUK AZ/ORTA/ TUZLU	OLGUNLAŞMA SÜRESİ/GÜN
1	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
2	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	İnek	Az Tuzlu	90
3	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	Koyun	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
4	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
5	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	Keçi-İnek	Tuzlu	120
6	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	Keçi-İnek	Az Tuzlu	120
7	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	İnek	Tuzlu	120
8	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	İnek-Koyun	Tuzlu	120
9	BALIKESİR-Havran	Semt Pazarı	İnek	Az Tuzlu	120
10	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
11	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
12	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek	Tuzlu	120
13	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek-Koyun	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
14	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek-Koyun	Tuzlu	120
15	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek	Az Tuzlu	120
16	BALIKESİR-Savaştepe	Yerel işletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
17	BALIKESİR-Savaştepe	Semt Pazarı	İnek	Az Tuzlu	90
18	BALIKESİR-Savaştepe	Semt Pazarı	İnek-Koyun	Tuzlu	90
19	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Az Tuzlu	120
20	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
21	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Tuzlu	120
22	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	Keçi	Az Tuzlu	120
23	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek -Koyun	Az Tuzlu	120
24	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
25	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	Keçi -İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
26	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	Koyun-Keçi-İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
27	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Az Tuzlu	120

Tablo 16. Toplanan Mihaliç peynir örneklerine ait bilgiler (devamı)

ÖRNEK NO	İL/İLÇE	LOKASYON	KULLANILAN SÜT CİNSİ	TUZLULUK AZ/ORTA/TUZLU	OLGUNLAŞMA SÜRESİ/GÜN
28	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Tuzlu	120
29	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Az Tuzlu	120
30	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Tuzlu	120
31	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
32	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Tuzlu	120
33	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	Koyun	Az Tuzlu	120
34	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
35	BALIKESİR-Gönen	Yerel İşletme	İnek	Tuzlu	120
36	BALIKESİR-Gönen	Semt Pazarı	Keçi-İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
37	BALIKESİR-Gönen	Semt Pazarı	Koyun-inek	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
38	BALIKESİR-Gönen	Semt Pazarı	İnek	Az Tuzlu	90
39	BALIKESİR-Manyas	Ulusal İşletme	İnek-Koyun	Tuzlu	120
40	BALIKESİR-Manyas	Ulusal İşletme	İnek-Koyun	Az Tuzlu	120
41	BALIKESİR-Manyas	Ulusal İşletme	İnek-Koyun	Tuzlu	120
42	BALIKESİR-Manyas	Ulusal İşletme	İnek-Koyun	Az Tuzlu	120
43	BALIKESİR-Manyas	Semt Pazarı	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	90
44	BALIKESİR-Manyas	Semt Pazarı	İnek	Az Tuzlu	90
45	BALIKESİR-Manyas	Semt Pazarı	inek	Tuzlu	90
46	BURSA-Karacabey	Ulusal İşletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
47	BURSA-Karacabey	Ulusal İşletme	inek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
48	BURSA-Karacabey	Ulusal İşletme	inek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
49	BURSA-Karacabey	Ulusal İşletme	İnek	Orta Tuzlu/Tuzlu	120
50	BURSA-Karacabey	Yerel İşletme	Koyun	Tuzlu	120
51	BURSA-Karacabey	Yerel İşletme	Koyun	Az Tuzlu	120
52	BURSA-Karacabey	Semt Pazarı	İnek	Tuzlu	90
53	BURSA-Karacabey	Semt Pazarı	İnek	Az Tuzlu	90

3.1.2. Referans Suşlar

MALDI TOF MS cihazı çalışmalarında kalibrasyon için kullanılmak üzere *Escherichia coli* ATCC 8739 (American Type Culture Collection Manassas, ABD) standart bakteri suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Tablo 17. Çalışmada kullanılan besiyeri ve kimyasallar

Kimyasal/Besiyeri Adı	Hazırlanışı	Firma
1.MRS Agar	70 g MRS Agar tartılıp 1000 mL saf suda çözöldü ve otoklavlandı.	LabM
2.M17 Agar	57,2 g M17 Agar tartılıp 1000 mL saf suda çözöldü ve otoklavlandı.	LabM
3.KAA Agar	21,3 g KAA Agar tartılıp 500 mL saf suda çözöldü Kanamycin Supplement eklendi ve otoklavlandı.	Oxoid
4.PIA Agar	40,3 g PIA Agar tartılıp 1000 mL saf suda çözöldü 10 gr Sodyum Laktat eklendi ve otoklavlandı.	HiMedia
5.MRS Broth	50 g MRS Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözöldü ve otoklavlandı.	Merck
6.M17 Broth	42,5 g M17 Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözöldü ve otoklavlandı.	Merck
7.KAA Broth	32,67 g KAA Broth tartılıp 1000 mL saf suda çözöldü ve otoklavlandı.	HiMedia
8.Gliserol		Merck
9.Bactident Katalaz		Sigma
10.Gram Boyama Seti		BioMérieux
11.Anaeropack Kit		MGC
12.BPW		BioMérieux
13.MRD		LabM
14. API 50 CHL Kiti		BioMérieux
15. API 20 STREP Kiti		BioMérieux

3.1.4. Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi (Precisa, 220 M SCS)
- Otomatik dilüsyon terazisi (Dilümat Start, BioMérieux)
- Mikroskop (Olympus, BX51)
- Deiyonize su sistemi (Milipore Mili-Q)
- pH metre (WTW pH 3110)
- Su banyosu (Memmert ONE 22)
- Otoklav (Panasonic, 3180)
- Stomacher (AesChemunex)
- Vorteks (AesChemunex, Fransa)
- Biyogüvenlik kabineti Tip II (Esco, AC2-4E1)
- İnkübatörler (Memmert UN55)
- -20°C'lik derin dondurucu (Uğur)
- -80°C'lik derin dondurucu (Panasonic)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerden Numune Alınması ve Sulandırmaların Yapılması

Çalışmanın ilk aşamasında analize alınan 53 adet Mihaliç peynir örneğinin iç ve kabuk kısımları birlikte alınıp karıştırılmış ve değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Buna istinaden peynir numunelerinden aseptik koşullar altında kabuk kısmından 10 g, iç kısmından 10 g olmak üzere örnek alınmıştır. Toplamda 20 g örnek tartılmış, üzerine 180 ml BPW (Buffer Pepton Water, Ref: 42629, BioMérieux, Fransa) ilave edilmiş ve 2 dakika karıştırıcıda (AesChemunex, Fransa) homojenize edilmiştir. Hazırlanan homojenattan, Maximun Recovery Diluent kullanılarak (MRD, LabM103-A, Ltd., Bury, Lancashire, İngiltere) 10^{-8} 'e kadar bir dizi dilüsyonları yapılarak ekim için hazırlanmıştır (Bracquart, 1981).

3.2.2. Bakteri İzolasyonu

Laktobasillerin izolasyonu için MRS (de Man Rogosa Sharpe agar, LAbM223-A Ltd., Bury, Lancashire, İngiltere) besiyeri kullanılmıştır. Aseptik koşullar altında drigalski spatülü ile homojen yayılmış plaklar anaerobik olarak (MGC, Anaeropack Kit, Japonya) 37 °C'de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda MRS agar'da üreyen tipik görünüşlü koloniler (1-2 mm çaplı, krem renkli, mat, düzgün kenarlı koloniler) ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen koloniler ileri düzeyde tanımlama için seçilmiştir (Kırmacı ve ark., 2016).

Laktokokların izolasyonunda M17 Agar (pH 7,2 $\pm$ 0.2, LAbM092-A, Ltd., Bury, Lancashire, İngiltere) kullanılmıştır. M17 agara uygun dilüsyonlardan yayma plak tekniğine göre ekimleri yapılmıştır. Aseptik koşullar altında drigalski spatülü ile homojen yayılmış plaklar 30 °C'de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda M17 agar'da üreyen tipik görünüşlü koloniler (beyaz, düzgün kenarlı, parlak koloniler) ve morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen koloniler seçilmiştir (Kırmacı ve ark., 2016).

Enterokokların izolasyonu için Kanamycin Esculin Azide Agar (KAA, pH 7,0 $\pm$ 0.2, Oxoid Ltd., CM0591, Hampshire, United Kingdom) ve Kanamycin Supplement (SR0092) ilaveli besiyeri üzerine ekim yapılarak 37 °C' de 48 saat süreyle inkübe edilmiş petrilere tipik görünüşlü koloniler (koyu kahverengi renkte görülen tipik enterokok kolonileri) ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen koloniler seçimde dikkate alınmıştır (Kırmacı ve ark., 2016).

Propiyonibakterilerin izolasyonu için seçici olan Propionibacter Isolation Agar (PIA M956, Himedia, Hindistan) besi ortamına sodyum laktat ilave edilmesi ile hazırlanan PIA (Propionibacter Isolation Agar) katı besiyeri kullanılmıştır. PIA katı besiyeri içeren plaklar anaerobik jar da 30°C’de 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. (Darılmaz, 2010).

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Seçimi ve Saflaştırma İşlemleri

Her bir peynir örneği için MRSA’da üreyenlerden beşer, M17A ve KAA’da üreyenlerden üçer ve PIA’da üreyenlerden de birer adet olmak üzere toplamda 636 adet (53 adet örnek x 12 farklı tipik koloni) seçilmiştir. Seçilen kolonilerin mikroskopik morfolojileri incelenmiş, katalaz testi ile Gram boyamaya tabi tutulmuştur. Bu aşamada PIA besiyerine düşen koloniler Gram boyama ve katalaz testi uygun reaksiyon vermediğinden değerlendirmeye ve ileri tanımlamaya alınmamış, propiyonik asit bakterisi olarak değerlendirilmemiştir. Gram boyamada pozitif, katalaz testinde negatif sonuç veren kok veya çubuk şeklinde bakterilerden alınarak, MRS Broth (Merck10661, Darmstadt, Almanya) ve M17 Broth (Merck,15029 Darmstadt, Almanya) ve KAA Broth’lara (HiMedia M776, Hindistan) ekim yapılmış 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uygun sıvı besiyerlerinde üreyen bakteriler agar plaklarına tek koloni düşecek şekilde ekilmiştir. İşlem art arda iki defa tekrarlanarak saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda Gram boyama ve katalaz testi tekrar edilmiştir. Sonuçta homojen görünümlü Gram pozitif, katalaz testi negatif kok veya basil şeklindeki bakteriler muhtemel laktik asit bakterileri olarak seçilmiştir (Korucu, 2012; Tigu, Assefa, Mehari, & Ashenafi, 2016).

3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojilerinin İncelenmesi ve Saflık Kontrolü

Elde edilen kültürlerin ışık mikroskopunda (Olympus, BX51 Scientific, Tokyo, Japonya) saflık kontrolleri, morfolojileri (kok, basil, çubuk) ve dizilişleri (mono –diplo-tetra kok, balya ve zincir) incelenmiştir (Sharp, 1979). Kültürlere Gram boyama testleri (BioMérieux, Fransa) ve Katalaz (Sigma, Bactident katalase SRE0041, Almanya) testi uygulanmıştır. Gram (+), katalaz (-), kok veya çubuk şekilli bakteriler muhtemel laktik asit bakterileri olarak değerlendirilmiştir (Karaduman ve ark., 2017).

3.2.5. Stok Kùltürlerin Hazırlanması ve Muhafazası

Saflaştırılan kolonilerin uzun süre muhafazası için, 1.5 ml' lik eppendorf tüpler içerisinde hazırlanan gliserol (% 30' luk) ve MRS Broth (Merck 10661, Almanya) (basiller için) veya M17 broth (Merck 15029, Almanya) (koklar için) dan oluşan karışım içerisine 3-4 öze dolusu saflaştırılan mikroorganizmalar alınarak konuldu ve vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan bu stok kùltürler kullanılıncaya kadar (-80°C) muhafaza edilerek stok kùltürler hazırlanmıştır. Her analiz öncesinde izolatlar aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır (Arslan, 2017).

3.2.6. Gram Boyama

Gram boyama için uygun besiyerinde 24 saat boyunca gelişen kùltürler kullanılmıştır. Bu amaçla öze ile alınan bir miktar kùltür distile su içerisinde süspanse edilerek tüm lam yüzeyine yayılmıştır. Lam kuruduktan sonra, üç kez bek alevinden geçirilerek fiksasyon yapılmıştır. Ardından preparat kristal viole ile boyanmış ve 2–3 dakika bekletilmiştir. Preparat yüzeyindeki fazla boyanın giderilmesi için lam distile suda yıkanmıştır. Daha sonra lam yüzeyine lugol çözeltisi yayılmış ve 2 dakika bekletilmiştir. Fazla boyanın distile su yardımıyla yıkanmasını takiben preparat % 95'lik etil alkol ile 15–20 saniye muamele edilmiştir. Sonrasında distile su yardımıyla tekrar yıkanmıştır. Son olarak preparat 45 saniye süreyle, sulu karbol füksin ile boyanmıştır. Ardından fazla boya yıkanarak hazırlanan preparat kuruması için bir süre bekletilmiştir. Hazırlanan preparat mikroskopta (Olympus, BX51 Scientific Tokyo, Japonya) incelenip değerlendirilmiştir. Gram boyama sonucunda mor renkli görülen bakteriler Gram (+), pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak belirlenmiştir (Norris, Berkeley, Logan, & O'donnell, 1981).

3.2.7. Katalaz Testi

Laktik asit bakterileri katalaz negatif bakterilerdir. Bakterilerde katalaz enziminin varlığını veya yokluğunun belirlenmesinde kullanılan bu test, katalaz enziminin ortamda bulunan hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırması prensibine dayanmaktadır. Enzim varlığının belirlenmesi amacıyla öncelikle bakteriler MRS ve M17 agar besiyerlerinde 24-48 saat süreyle geliştirildi. Katalaz testi için, besiyerindeki test edilecek koloninin üzerine 1 damla % 3'lük H₂O₂ çözeltisi (Bactident Catalase, Sigma, Almanya) damlatılmasını takiben gaz çıkışının gözlenmesi pozitif, gaz çıkışının olmaması durumunda negatif olarak belirlenmiştir (Temiz, 2008). Gram (-) ve katalaz (+) olan izolatlar, laktik asit bakterisi olmadığından dolayı değerlendirilmeye alınmayarak elenmiştir. Geriye kalan izolatlarla bir sonraki aşama olan MALDI – TOF-MS ile tanımlamaya geçilmiştir.

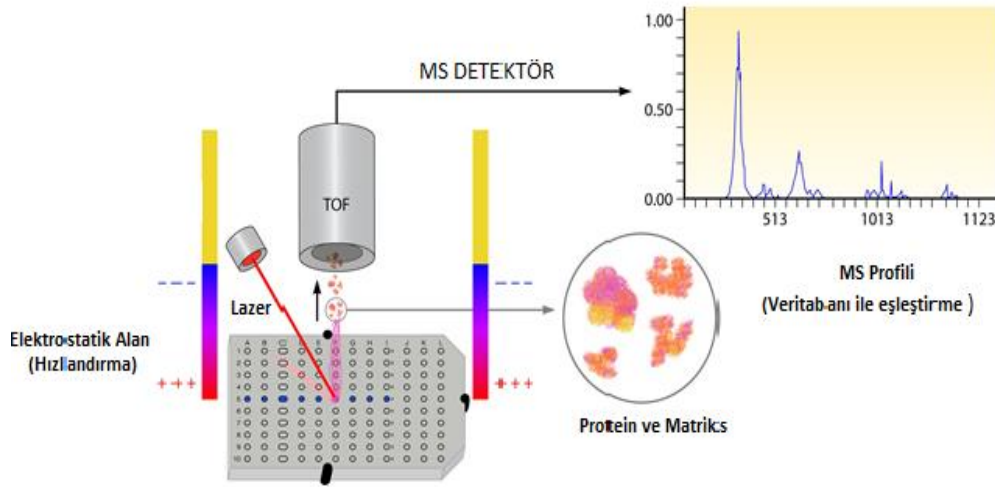
3.2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Sayılarının Belirlenmesi

5 farklı lokasyondan toplanan Mihaliç peynirlerinden elde edilen laktik asit bakterilerinin besiyerlerinde üreme miktarlarının, peynirlerin toplandığı bölgesel farklılıklar açısından istatistiksel bir anlam taşıyıp taşımadığı değerlendirilmiştir. İzolasyon aşamasında belirtilen inkübasyon sürelerinin ardından MRS (de Man, Rogosa, Sharpe Agar) agar ve M17 agar da gelişen kültürlerin katalaz testleri yapılarak katalaz negatif tipik koloniler sayılmış olup, kob/g olarak kayıt altına alınmıştır. (Omemu, & Faniran, 2011; Papamanoli, Tzanetakis, Litopoulou-Tzanetaki, & Kotzekidou, 2003; Yıldız, 2011). Kanamycin Esculin Azide Agar'da ise inkübasyon sonunda gelişen merkezi gri, siyah haleli koloniler sayılmış olup, kob/g olarak kayıt altına alınmıştır (Da Costa, Bica, Vaz-Pires, & Bernardo, 2010; Fontán, Lorenzo, Parada, Franco, & Carballo, 2007; Yıldız, 2011).

3.2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

3.2.9.1. MALDI TOF MS Yöntemi ile Tanımlama

Son zamanlarda MALDI TOF MS yöntemi mikroorganizmaların tanımlanmasında tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Yöntemin hızlı sonuç vermesi, analiz için çok az biyolojik materyale ihtiyaç duyulması gıda laboratuvar uygulamaları için tercih sebeplerindendir. MALDI TOF MS yöntemi, rutin olarak laboratuvarlarda kullanılan çeşitli biyokimyasal reaksiyonları değerlendirerek tanımlama yapan otomatik sistemlerden farklıdır. Bu yöntemde mikroorganizmalara ait proteinler iyonize edilir ve sonrasında manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntüler ile, sistemin veri tabanındaki referans organizmaya ait grafiksel görüntüler karşılaştırılarak bunların uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanmaktadır (Akyar, & Can, 2013). İyonize edilmiş izolatların MS analizinin genel şeması Şekil 8’de gösterilmiştir. MALDI TOF MS tanımlama yönteminin diğer tanımlama yöntemine göre birçok avantajı bulunmaktadır (Rodríguez-Sánchez ve ark., 2016). En önemlilerinden bir tanesi hızlı bir yöntem olmasıdır. Geleneksel yöntemlerle tanımlama işlemleri birkaç gün zaman alırken MALDI TOF MS yöntemi yöntemi ile tanımlama işlemi bir saatten daha az bir zaman almaktadır. Ayrıca bu yöntem örnek başına düşen maliyet açısından diğer yöntemlere göre oldukça avantajlıdır (Kanak, & Yılmaz, 2018; Karaduman ve ark., 2017). Biyokimyasal tanımlama testleri ile karşılaştırıldığında 4 kat daha az bir maliyetinin olduğu belirtilmiştir (Seng ve ark., 2009). Geleneksel yöntemlerle tanımlanması zor olan anaerobik, non-fermantatif bakterilerin ve Gram pozitif basillerin ayırımı başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Ayrıca bu yeni yöntem ayırımında zorlanılan benzer türlerin identifikasyonunda başarılı olmuştur (Kacaniova ve ark., 2017; Mahajan ve ark., 2017). MALDI TOF MS yöntemi, diğer yöntemlere göre daha kısa sürede ve daha az maliyetle tanımlama yapmasından dolayı çalışmamızın ilk tanımlama basamağını oluşturmuştur.

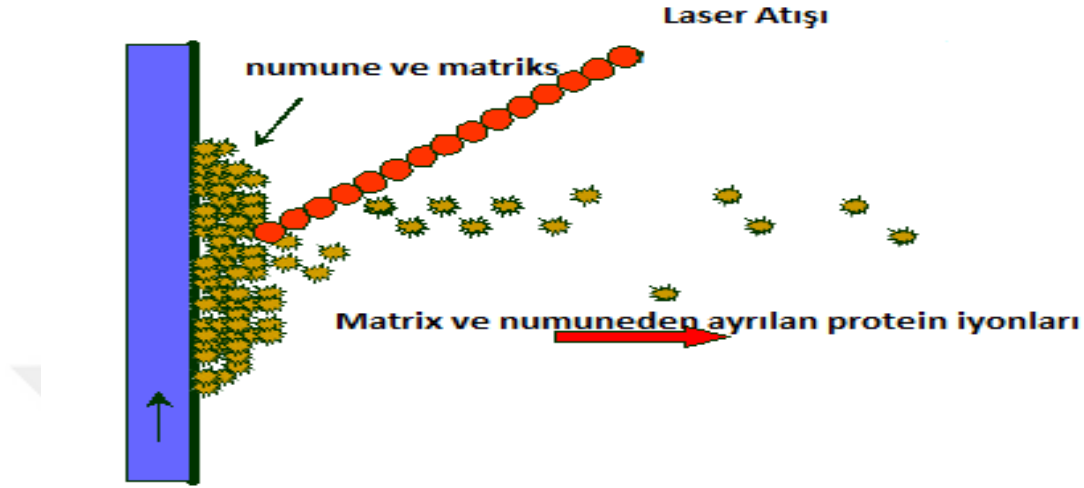


Şekil 8: İyonize edilmiş izolatların MS analizinin genel şeması

3.2.9.2. MALDI-TOF MS Yönteminin Çalışma Prensibi

Bu yöntemde mikroorganizmaya ait protein, peptid, şeker gibi biyomoleküller ve polimer, dendrimer, makromolekül gibi büyük organik moleküller lazer atışı yardımıyla elektromanyetik uçuş tüpünden geçirilmektedir. Lazerden gelen fotonlarla, matriks molekülleri arasındaki ışıktan gelen enerji ile olan etkileşim, matriksin gaz fazına geçtiği sublimasyonu tetikler. Atışlarla birlikte matriks lazer ışığını absorbe eder ve örnekteki moleküller iyonize bir hal alır. Işın atış bombardımanı sonucunda hem numunede hem de matrisde sublimasyon ve iyonizasyon oluşur. Şekil 9'da MALDI TOF 'un lazer atışı ile desorbsiyonu ve iyonizasyonu şematize edilmiştir. İyonize hale gelen moleküller cihaz içinde molekül ağırlıklarına göre uçmaya başlarlar. Kütleleri ile orantılı hız kazanan iyonlar dedektöre farklı zamanda çarparak farklı sinyaller elde edilir. Böylece elde edilen sinyaller, proteinlerin kütle spektralarını oluşturmakta ve bu spektrumların görüntüleri de sistemin veri tabanında ki görüntüler ile eşleştirilerek mikroorganizmalar hem cins hem de tür bazında tanımlanmaktadır. Tanımlama için temel alınan mikroorganizma proteinleri ise hücre içinde bol miktarda bulunan orta hidrofobik özellikteki ribozomal proteinlerdir. Genellikle 4 -15 Kda aralığında bulunan bu proteinler çevresel faktörlerden çok az etkilenirler. Tanımlanacak mikroorganizma sayısı 10^4 - 10^6 gibi az bir miktarda olması dahi analiz için yeterli olmaktadır. Ancak analizin yaşlı kolonilerden alınarak yapılması ribozomal proteinlerin parçalanmasından dolayı ayırt edici piklerin sayısı ve yoğunluğu

azaltmaktadır. Bundan dolayı analiz edilecek koloniler 48 saatten daha yaşlı olmaması gerekmektedir (Guo ve ark., 2014; Kacaniova ve ark., 2017; Kanak, & Yılmaz, 2018; Rodríguez-Sánchez ve ark., 2016).

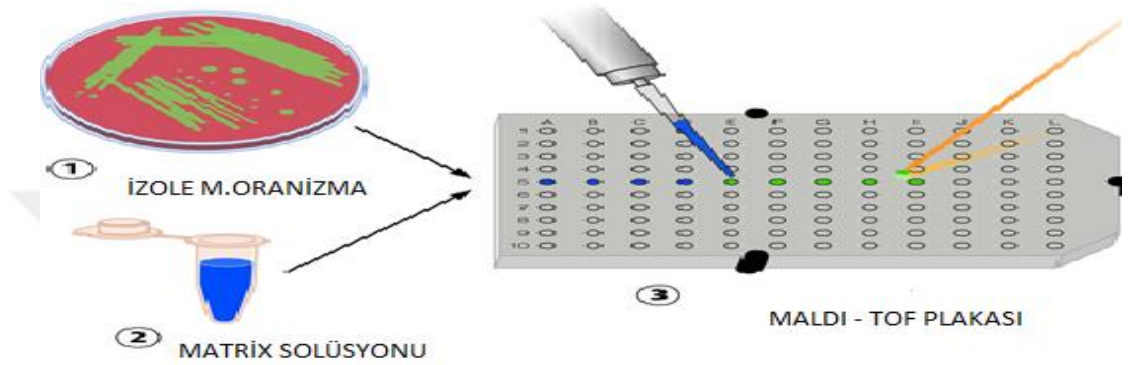


Şekil 9. MALDI'nin lazer atışı ile desorpsiyonu ve iyonizasyonu

3.2.9.3. MALDI-TOF MS Yöntemi ile İzolatların Tanımlanması

Bu sistemin çalışması esnasında kalibrasyon kontrolü için *E. coli* ATCC 8739 (American Type Culture Collection Manassas, ABD) standart bakteri suşu referans olarak kullanılmıştır. MALDI-TOF MS yönteminde spesifik agarlarda gelişen 24 saatlik kültürler doğrudan alınarak sisteme yüklenmiştir. Logaritmik faz sonundaki şüpheli laktik asit bakteri kolonileri direkt petrilere tek kullanımlık 1 µl hacminde halka uçlu öze (Lp Italiana) ile alınarak cihazın “target” adı verilen metalden yapılmış plakası üzerindeki belirlenmiş alanlara sürülmüştür. Ardından 1 µl matriks solüsyonu Vitek MS CHCA (BioMérieux, Ref 411071, Fransa) her bir örneğin üzerine eklenerek havada kuruması için bekletilmiştir. Şekil 10'da izole kültürlerden identifikasyon yönteminin genel şeması yer almaktadır. Matriks solüsyonu % 50 asetonitrile ve % 2,5 trifluoroacetic acid içinde doymuş α -cyano-4-hydro- xycinnamic acid bileşiminden oluşmaktadır. Kuruyan plak daha sonra cihaza yerleştirilerek okuma başlatılmıştır (Guo ve ark., 2014). Tanımlama işlemlerinde cihazın IVD (In-Vitro Diagnosis, MYLA database) veritabanı ve RUO (Research Use Only, SARAMIS-Spectral Archive And Microbial Identification System) veritabanı kullanılmıştır (Wattal, & Oberoi, 2016). MALDI-TOF (VITEK-MS) ile tanımlama sonucu alınan spektrumlar,

2.000-20.000 Da kütle ağırlığındaki yapıların 20 Hz’lik lazer vuruş sıklığı ile lineer pozitif iyon modeli kullanılarak elde edilir. Pik görüntüleri ise Launchpad (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japonya) programı sayesinde oluşturulur. Yine suşların birbirleriyle olan yakınlık ve uzaklıkları “Pearson Korelasyonu” (% 0.8 tolerans) kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritması ile hesaplanmaktadır.



Şekil 10. İzole kültürlerden MALD-TOF MS ile identifikasyon yöntemi

3.2.9.4. API 50 CHL ve API 20 STREP ile İzolatlarının Tanımlanması:

Saf kültürlerin karbonhidratları fermente edebilme özelliklerini temel alan dolayısıyla da kullandıkları karbon kaynaklarını biyokimyasal testlerle belirleyen hazır enzimatik kitler, fermente süt ürünlerinde bulunan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Analytical Profile Index (API, BioMérieux, Marcy l’Etoile, Fransa) test kitlerinin laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan başarılı bir yöntem olduğu ortaya konmuştur (Arslan, 2017; Bezekova, 2013; Fguiri ve ark., 2016; Koruru, 2012; Kumar, Marotta, Bharadwaj, & Mishra, 2017; Maikhan, & Amin, 2017; Papamanoli ve ark., 2003; Turgut ve ark., 2012b; Yıldız, 2011).

Çalışmamızda karbonhidrat metabolizma testi olan API 50 CHL Analytical Profile Index (API, BioMérieux, Marcy l’Etoile, France) test kitleri (laktobasillerin tanımlanması için) ve API 20 Strep Analytical Profile Index (API BioMérieux, Marcy l’Etoile, France) test kitleri (Streptokok ve benzer bakterilerin tanımlanması için) kullanılmıştır. MALDI TOF ile tanımlanan laktik asit bakterilerinden tür düzeyinde

farklı olan 40 adeti seçilerek API Test Kitleri ile tanımlanmıştır. Böylelikle MALDI TOF tanımlama sonuçları, biyokimyasal tanımlama metodu olan API (API BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ile karşılaştırılmıştır.

3.2.9.5 16S DNA Gen Sanger Dizi Yöntemi ile Tanımlamanın Yapılması

Elde edilen verilerin genotipik verilerle desteklenmesi amacıyla Süt Ürünleri Gen Bankası'nda oluşturulan Mihaliç peynir kültür koleksiyonundan farklı tür ve alt türlerde 250 adet laktik asit bakterisi seçilmiştir. DNA izolasyonu öncesinde saf kültürleri elde edilen laktik asit bakterileri MRSA, M17, KAA besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. İnkübasyon sonrasında petriler soğuk zincir altında 16S DNA Sanger dizi analizinin yapılması amacıyla (Letgen Biotechnology, Bornova, İzmir) firmasına teslim edilmiştir.

3.2.9.6. Genomik DNA İzolasyonu

İnkübasyon sonrasında petrilerde gelişen organizmalardan tek koloni alınıp, belirtilen besiyerlerinin brothlarına inokülasyon gerçekleştirilmiştir. İkinci inkübasyon sonrası spesifik brotlarda gelişen hücreler 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmıştır. Seçilen suşlardan genomik DNA izolasyonu için HighPure Template DNA izolasyon kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) protokolü uygulanmıştır. Kullanılan bu kit ile bakteri hücre duvarı parçalanır ve DNA özel bir kolona tutunur. DNA dışındaki protein ve hücre içerikleri yıkanarak uzaklaştırılır. Sonrasında kolondaki DNA' nın elüsyonu gerçekleşir. Hücre lizatı eldesi, DNA bağlanması, DNA yıkanması ve elüsyon işlemlerinde deney kit protokolü izlenmiştir.

3.2.9.7. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Reaksiyonu

16S geninin amplifikasyonu Taq DNA polimeraz kiti (HelixAmp™, NonoHelix, Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA gen bölgesi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', ve 1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT- 3' primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Amplifikasyon tüpüne eklenen bileşenler ve reaksiyon basamakları Tablo 18 ve 19 'da verilmiştir.

Tablo 18 : PZR Bileşen ve Miktarları

Bileşen	Miktarı
Kalıp DNA	5 µl
10x Taq Buffer	5 µl
D9NTP	1 µl
Primer – F	1 µl
Primer – R	1 µl
5x Tune Up Buffer	10 µl
Taq Polimeraz	1,25 unit
Su	50 µl'ye tamamlanır.

Tablo 19 : 16S Geninin PZR Koşulları

İşlem	Süre	Sıcaklık	Döngü
İlk Denatürasyon	2dk	95°C	1
Denatürasyon	20sn	95°C	35
Annealing	40sn	55°C	
Elongasyon	50 sn	72°C	
Son Uzama	5dk	72°C	1
Soğutma	Sınırsız		4°C

3.2.9.8. PZR Ürünlerinin Elektroforez ile Ayrımı

PZR ürünlerinin elektroforez ile ayrımı; agaroz jel elektroforezi, 2,5 µl GelRed'li % 1 agaroz (Sigma) içeren jelde gerçekleştirilmiştir. 2 µl DNA solüsyonu, 1µl yükleme boya solüsyonu ve 3 µl su ile karışımı hazırlanarak 90 V'da 60 dk süreyle yürütülmüştür.

3.2.9.9. 16S Geninin PCR ürünlerinin Dizi Analizi

Dizi analizinde 16S Sanger didioksi dizileme metodu kullanılmıştır. Dizileme hem ileri hem de ters yönde, otomatik dizileme cihazı (ABI 3730XL, Applied Biosystems, ABD) kullanılarak, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) ile yapılmıştır. 16S DNA genlerinin nükleotit sekansları DNA Dynamo 2004-2019 programı (Bluetractor software, İngiltere) kullanılarak hizalanıp, düzenlenmiştir.

3.2.9.10. Dizi Analizlerinin Yapılması

16S DNA genlerinin nükleotit sekansları DNA Dynamo 2004-2019 programı (Bluetractor software, UK) kullanılarak hizalanıp, düzenlenmiş FASTA formatına çevrilmiştir. Elde edilen veriler anlamlı hale getirip gen dizilerine ulaşılmıştır. Proje kapsamında elde edilen 16S genleri sekanslanarak ilgili dizilerin hangi bakteri türüne ait olduğu NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) internet sistesinde BLAST sistemindeki mevcut türler ile karşılaştırılarak bulunmuştur. Karşılaştırılması yapılan izolatların sistemdeki 16S genleri ile % 97 – 100 arasında benzerlik göstermesi bu izolatın o türe ait olabileceği olarak yorumlanmıştır. Elde edilen gen dizileri BLAST sistemine yüklenmiştir. National Center for Biotechnology Information tarafından kayıt numarası alınarak tescillenen 238 adet suş, Süt Ürünü Gen Bankası'nda TSGB (Türkiye Starter Kültür Gen Bankası) TSGB 3001 ile başlayan kodlarla kayıt altına alınmış ve her bir suş gliserol içinde (- 80)°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.10. Mihaliç Peynirlerinin Duyusal Niteliklerinin Belirlenmesi

Mihaliç peynirlerinin duyusal niteliklerinin belirlenmesi amacıyla 9 puanlık duyusal “hedonik skala” kullanılmıştır (Ogden, 1992). Hedonik skala ürünlerin beğenilme derecelerini belirlemek için kullanılan örnekleri renk, görünüş, yapı, koku ve tat gibi duyusal niteliklerine göre sınıflandıran, bir duyusal analiz metodudur. Puanlama 1-9 puan (9- son derece iyi, 8- çok iyi, 7- orta derece iyi, 6- biraz iyi, 5-ne iyi ne kötü, 4- biraz kötü, 3- orta derece kötü, 2- çok kötü, 1- son derece kötü) arasında yapılır. Kullanılan “hedonik skala” Çizelge 1’de gösterilmiştir. Duyusal değerlendirmeler Bursa Gıda Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü’nde çalışan 10 kişinin katılımıyla oluşturulan panalist gurubu tarafından yapılmıştır. Duyusal analizi yapılan peynir örneklerinden yapı ve aroma kusurlu olanlar elenerek, en yüksek puan alan 15 adeti seçilmiştir. Seçilen peynirler % tuz oranlarına ve etiket bilgileri ve/veya satıcı bilgilerine istinaden tuzlu ve az tuzlu olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra kabuk ve merkezleri ayrı, ayrı olmak üzere mikrobiyolojik ve kimyasal analize alınmıştır.

NİTELİKLER	ÖRNEK (A)	ÖRNEK (B)
RENK		
GÖRÜNÜŞ		
YAPI		
KOKU		
TAT		

BEĞENİLME DERECEİ	PUAN
Son derece iyi	9 Puan
Çok iyi	8 Puan
Orta derecede iyi	7 Puan
Biraz iyi	6 Puan
Ne iyi ne de kötü	5 Puan
Biraz kötü	4 Puan
Orta derecede kötü	3 Puan
Çok kötü	2 Puan
Son derece kötü	1 Puan

Çizelge 1: Dokuz puanlı hedonik skalaya göre duyusal değerlendirme çizelgesi (Ogden, 1992)

3.2.11. Seçilen Mihaliç Peynir Örneklerine Uygulanan Kimyasal Analizler:

Kimyasal analizler için, duyusal analizden en yüksek puanı alan 15 adet Mihaliç peynir örneğinin kabuk ve iç kısımları ayrı ayrı analize alınmıştır.

3.2.11.1. Toplam Kuru Madde İçeriği Tayini

Peynir örneklerinde toplam kuru madde içeriğinin tayini için Türk standardı TS 5311 EN ISO 5534 (2006) referans yöntemi kullanılmıştır.

3.2.11.2. Tuz Oranı Tayini

Peynir örneklerinde tuz tayini MOHR titrasyon yöntemine göre hazırlanan örneğin 0.1 N AgNO₃ çözeltisi ile titrasyonu sonucu belirlenmiştir (AOAC, 1983.14).

3.2.11.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Mihaliç peynirlerinde protein tayini KJELDAHL yöntemi ile Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC) 991.20 (1995)'e göre yapılmıştır.

3.2.11.4. Yağ Muhtevası Tayini ve Kuru maddede Yağ Oranı

Peynirlerde kütlece yağ muhtevası tayini için peynir bütirometresi kullanılarak GERBER yöntemi ile Türk standardı TS ISO 3433 (2008)'e göre yapılmıştır.

3.2.11.5. Tirtasyon Asitliği Tayini (% LA) ve pH

Peynir örneklerinde titre edilebilir asitliği belirlemek amacıyla Türk standardı TS 591 (2006)'e göre analiz yapılmıştır.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

Analiz sonuçlarında elde edilen veriler ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Besiyerlerindeki üreme miktarlarının bölgesel olarak farklılıkları, parametrik olmayan bir test (SPSS-Non parametrik teslerden-Kruskal-Wallis Test) ile değerlendirilmiştir. Kimyasal analizler bağımsız 3 tekrarın sonrasındaki ortalamalar olup, farklılıkların değerlendirildiği istatistiksel analizlerde t- testi kullanılmıştır. Elde edilen verilerin istatistik sonuçları $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışmada Balıkesir ve Bursa illerinin 5 farklı bölgesinden (Gönen, Savaştepe, Manyas, Havran ve Karacabey) toplanan 53 adet Mihaliç peynirinden, laktik asit bakterileri, enterekoklar ve propiyonik asit bakterilerinin izolasyonu için spesifik besiyerlerine ekim yapılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında örnekler peynirin tamamını temsil edecek şekilde, iç kısım ve kabuk kısmı ayrımı yapılmaksızın bütün olarak teste alınmıştır. Yapılan ekimin ardından MRSA, M17A, KAA, PIA katı besiyerlerinde üreyen, ayrı ve tek düşen tipik koloniler ileri düzeyde tanımlama için seçilmiştir. Her bir peynir örneği için MRSA'da üreyenlerden beşer, M17A ve KAA'da üreyenlerden üçer, ve PIA'da üreyenlerden de birer adet olmak üzere toplamda 636 adet (53 adet örnek x 12 farklı tipik koloni) seçilmiştir.

Gram boyama ve katalaz testi sonucunda; MRSA'dan izole edilen 265 adet izolattan 259 adetinin, M17 agardan izole edilen 159 izolattan 112 adetinin, KAA'dan izole edilen 159 izolattan 96 adetinin laktik asit bakterisi özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. PIA besiyerine düşen koloniler bu aşamada Gram boyama ve katalaz testi uygun sonuç vermediğinden değerlendirmeye ve ileri tanımlamaya alınmamış, propiyonik asit bakterisi olarak değerlendirilmemiştir.

Laktik asit bakterisi olduğu şüphelenilen 467 adet izolat saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, uygun sıvı besi yerinde üreyen bakteriler katı besi yerine tek koloni düşecek şekilde ekilmiştir. İşlem art arda iki defa tekrarlanarak saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

4.2. Stok Kültürlerin Hazırlanması ve Muhafazası

Saflaştırılan kolonilerin uzun süre muhafazası için, 1.5 ml lik eppendorf tüpler içerisinde hazırlanan gliserol (% 30'luk) ile MRS veya M17 sıvı besiyerlerine 3-4 öze dolusu saf kültürler ilave edilerek vortekslenmiştir. Hazırlanan bu stok kültürler kullanılıncaya kadar (-80°C) muhafaza edilmiştir. Daha sonra yapılan ileri tanımlama işlemleri için izolatlar aktifleştirilmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir (Arslan, 2017).

4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı

Ekimi yapılan Mihaliç peynir örneklerinde gelişen laktik asit bakteri sayıları Tablo 20’de verilmiştir. MRSA’da gelişen ortalama laktik asit bakteri sayıları Havran, Gönen, Manyas, Karacabey, Savaştepe için sırasıyla $7,53 \pm 0,38$, $7,6 \pm 0,63$, $7,48 \pm 0,39$, $7,83 \pm 0,26$, $7,57 \pm 0,45$ log (kob/g), M17 besiyerinde gelişen ortalama laktik asit bakteri sayıları aynı sırayla $8,43 \pm 0,71$, $8,69 \pm 0,66$, $8,78 \pm 0,41$, $8,73 \pm 0,13$, $8,48 \pm 1,13$ log (kob/g), KAA besiyerinde gelişen ortalama bakteri sayıları ise sıra ile $7,19 \pm 0,79$, $6,98 \pm 0,62$, $7,23 \pm 0,57$, $7,07 \pm 0,47$, $6,55 \pm 0,65$ log (kob/g) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan görüldüğü üzere M17 besiyerinde gelişen mikroorganizma sayısının diğer besiyerlerinde gelişenlerden yaklaşık 1 log seviyesinde daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, daha ziyade streptokoklar için spesifik olan bu besiyerinde sayısal olarak daha fazla üremenin gözlenmesinin Mihaliç peynirinde bu cinse ait mikroorganizmaların daha baskın olduğu sonucunu çıkarmaktadır.

Tablo 20. Mihaliç peynir örneklerinde gelişen laktik asit bakteri sayıları

Mihaliç Peynir Örneklerinde Gelişen LAB Sayıları (log kob/g)					
Besiyeri	Bölgeler				
	Havran (n = 9)	Gönen (n= 20)	Manyas (n= 7)	Karacabey (n = 8)	Savaştepe (n=9)
*MRS Agar	$7,53 \pm 0,38$	$7,6 \pm 0,63$	$7,48 \pm 0,39$	$7,83 \pm 0,26$	$7,57 \pm 0,45$
*M17 Agar	$8,43 \pm 0,71$	$8,69 \pm 0,66$	$8,78 \pm 0,41$	$8,73 \pm 0,13$	$8,48 \pm 1,13$
*KAA Agar	$7,19 \pm 0,79$	$6,98 \pm 0,62$	$7,23 \pm 0,57$	$7,07 \pm 0,47$	$6,55 \pm 0,65$

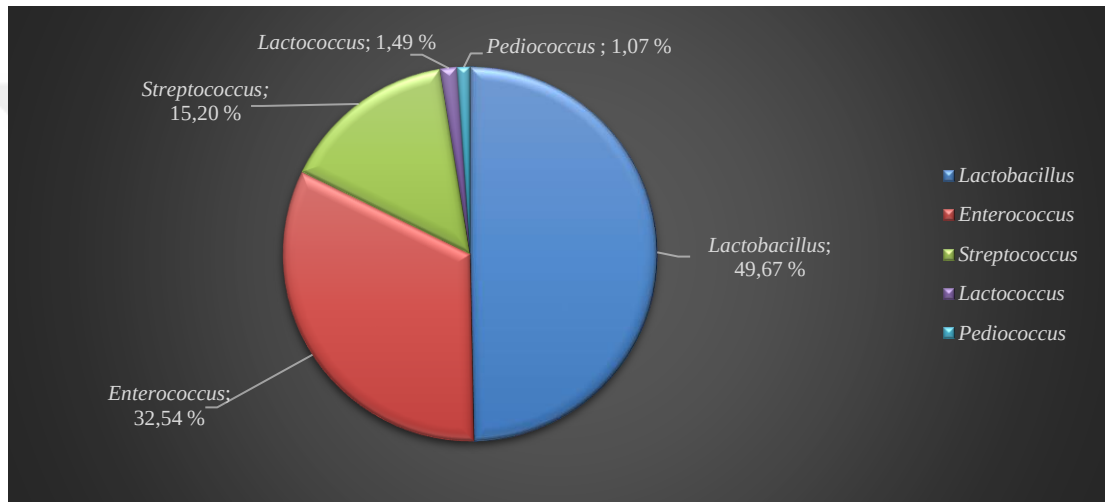
*Aynı satırdaki değerler arasında farklılık bulunmamıştır ($P > 0,05$).

Örneklerin toplandığı 5 farklı ilçe arasında, besiyerlerinde (MRSA, M17, KAA) üreme miktarları bakımından, istatistiksel olarak (Non Parametrik Kuruskal Wallis Test, SPSS 22) anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.4. İzolatların MALDI - TOF MS ile Tanımlanması

Tanımlama işlemi için, spesifik agarlarda gelişen 24 saatlik taze kültürler kullanılarak “target” adındaki plakalar hazırlanmıştır. Hazırlanan plakaları cihazın IVD (In-Vitro Diagnosis, MYLA Database) veritabanında okutularak elde edilen verilerin mevcut veritabanında taranması sağlanmıştır.

Analiz sonuçlarına göre tanımlanan 467 adet izolattan; 232 adeti (% 49,67), laktobasil, 152 adeti enterokok (% 32,54), 71 adeti streptokok (% 15,20), 7 adeti laktokok (% 1,49), 5 adeti de (% 1,07) pediokok olarak tanımlanmıştır (Şekil 11).

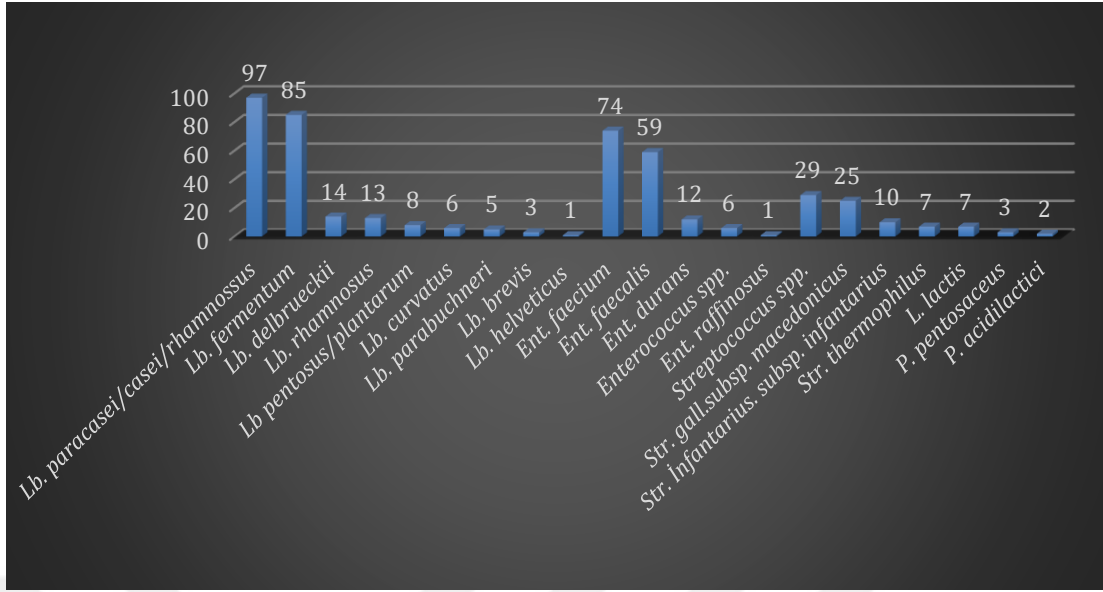


% Hesaplarında virgülden sonra son iki rakam alınmış, yuvarlama yapılmamıştır.

Şekil 11. MALDI-TOF MS ile tanımlanan laktik asit bakterilerinin cins seviyesinde yüzdelik dağılımı.

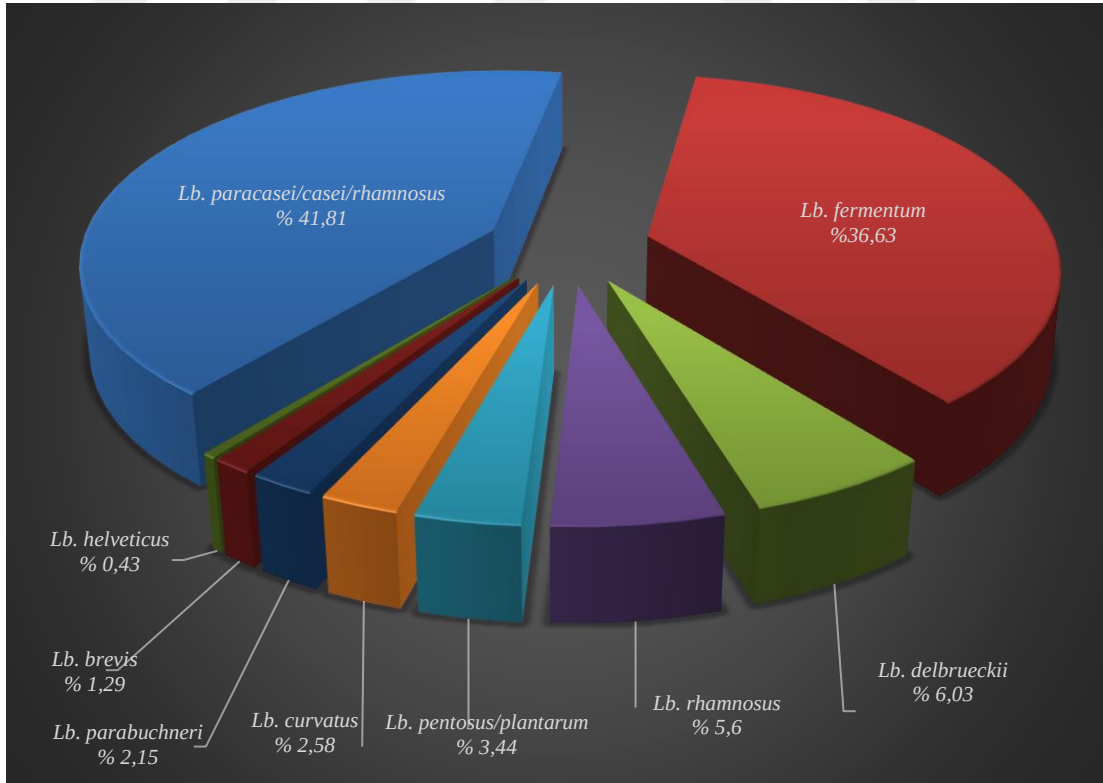
Elde edilen izolatların tür düzeyinde dağılımı ise Şekil 12’de verilmiştir.

MRS besiyerinde üreyen mikroorganizmaların dağılımı değerlendirildiğinde; laktobasil cinsi olarak tanımlanan 232 izolattın, 97 adeti (% 41,81) *Lb.paracasei/casei/rhamnosus*, 85 adeti (% 36,63) *Lb. fermentum*, 14 adeti (% 6,03) *Lb. delbrueckii*, 13 adeti (% 5,6) *Lb. rhamnosus*, 8 adeti (% 3,44) *Lb. pentosus/plantarum*, 6 adeti (% 2,58) *Lb. curvatus*, 5 adeti (% 2,15) *Lb. parabuchneri*, 3 adeti (% 1,29) *Lb. brevis*, 1 adet izolat ise *Lb. helveticus* (% 0,43) olarak tanımlanmıştır (Şekil 13).



Şekil 12. MALDI-TOF MS ile tanımlanan laktik asit bakterilerinin tür seviyelerinde dağılımı

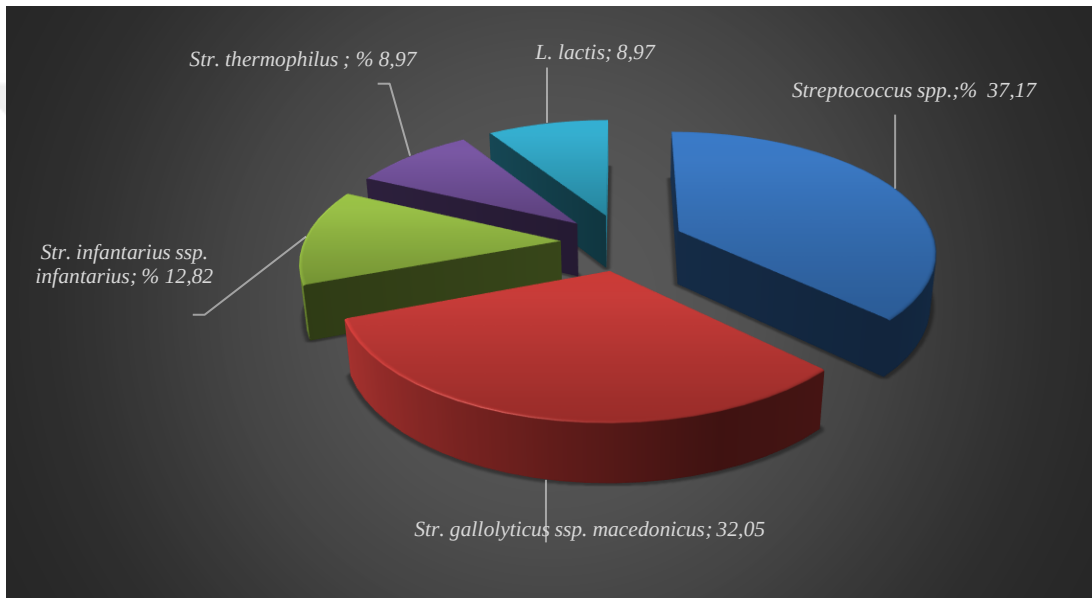
Genellikle laktobasillerin ürettiği MRS besiyerinde 22 adet enterekok ve 5 adet pediokok izolatinın da ürettiği saptanmıştır.



% Hesaplarında virgülden sonra son iki rakam alınmış, yuvarlama yapılmamıştır.

Şekil 13. MRS besiyerinden izole edilip, tanımlanan laktobasil izolatlarının dağılımı

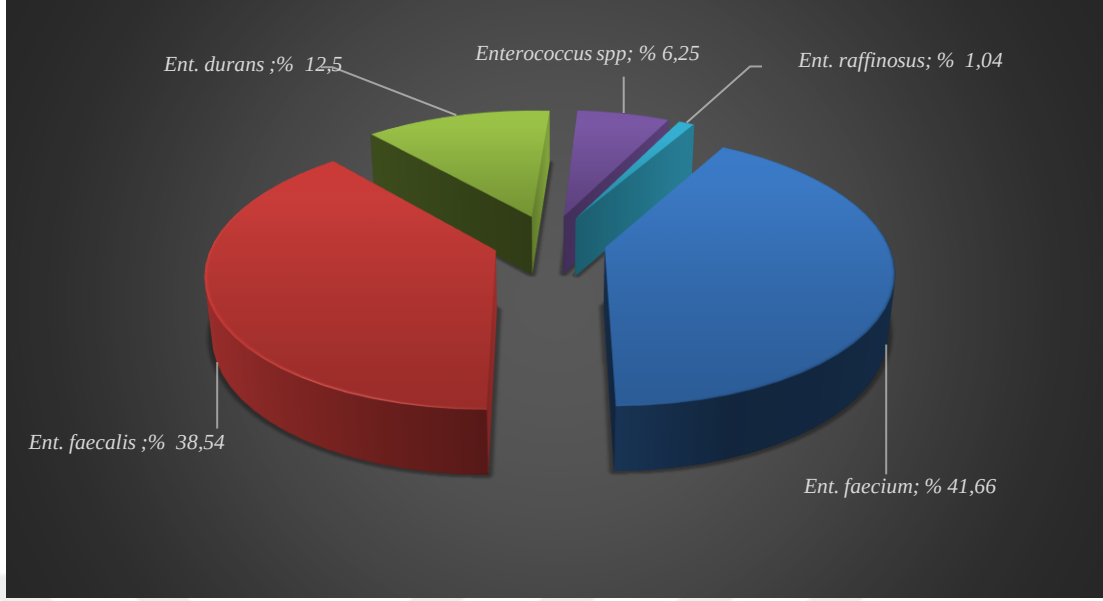
M17 besiyerinde üreyen 78 adet streptokok izolatının 25 adeti (% 32,05) *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus*, 10 adeti (% 12,82) *Str. infantarius* ssp. *infantarius*, 7 adeti (% 8,97) *Str. thermophilus*, 7 adeti (% 8,97) *L. lactis* olarak tanımlanmıştır. 29 (% 37,17) adet suş ise streptokok olarak tanımlanmakla birlikte tür seviyesinde tanımlanamamıştır (Şekil 14). M17 besiyeri, daha önceleri N-Lancefield streptokoklar olarak adlandırılan enterokoklar için de uygun bir üreme ortamıdır. Bu açıdan bu besi yerinde üreyip tanımlanan mikroorganizmalar içinde enterokok olarak sınıflandırılan 34 adet koloni izole edilmiştir.



% Hesaplarında virgülden sonra son iki rakam alınmış, yuvarlama yapılmamıştır.

Şekil 14. M17 besiyerinden izole edilip, tanımlanan streptokok izolatlarının dağılımı

KAA besiyerinde enterokok cinsine ait oldukları tanımlanan 96 adet izolatın 40 adeti (% 41,66) *Ent. faecium*, 37 adeti (% 38,54) *Ent. faecalis*, 12 adeti (% 12,5) *Ent. durans*, 1 adet (% 1,04) izolat *Ent. raffinosus*, 6 adeti (% 6,25) ise tür seviyesinde tanımlanamamıştır (Şekil 15).

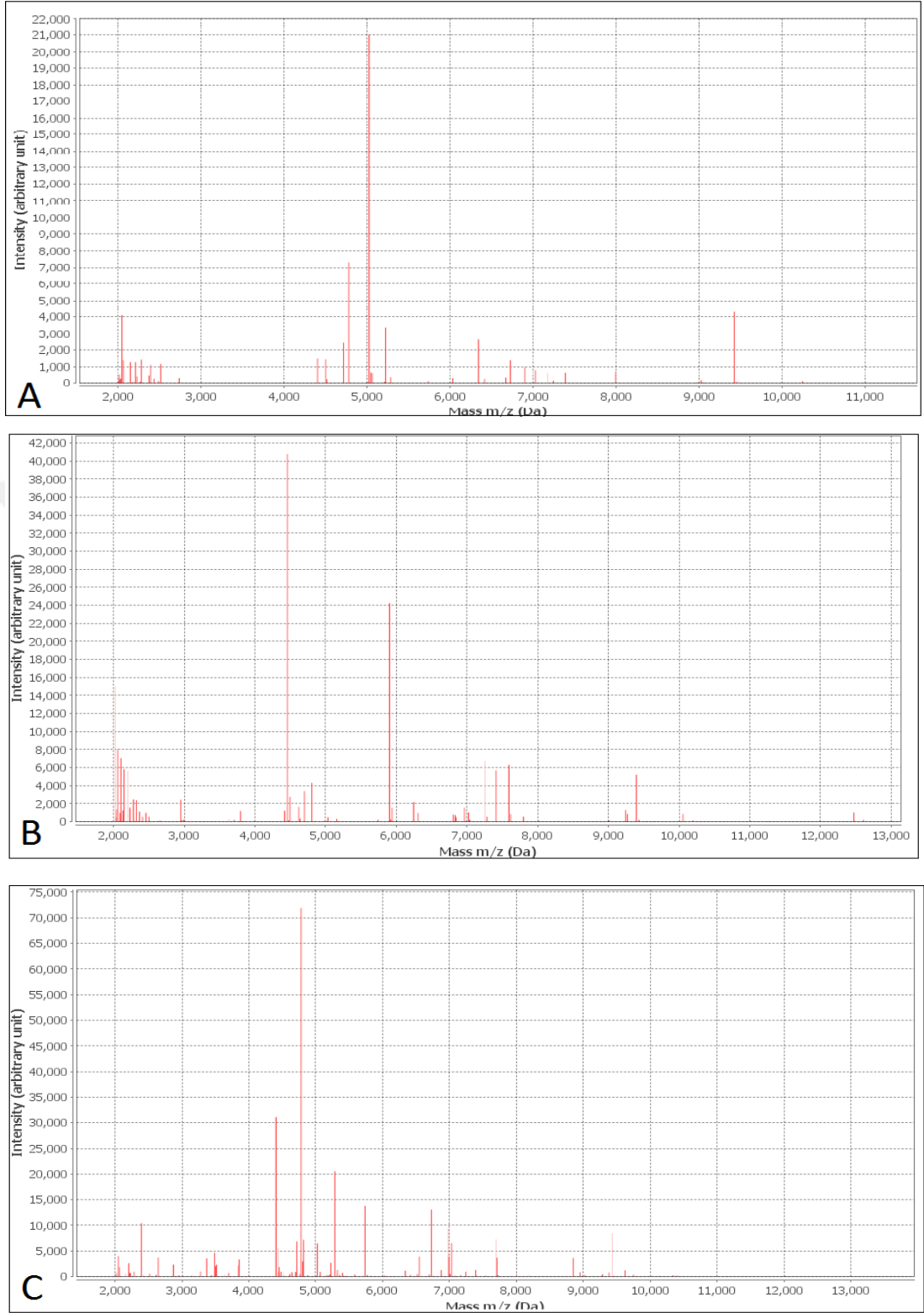


% Hesaplarında virgülden sonra son iki rakam alınmış, yuvarlama yapılmamıştır.

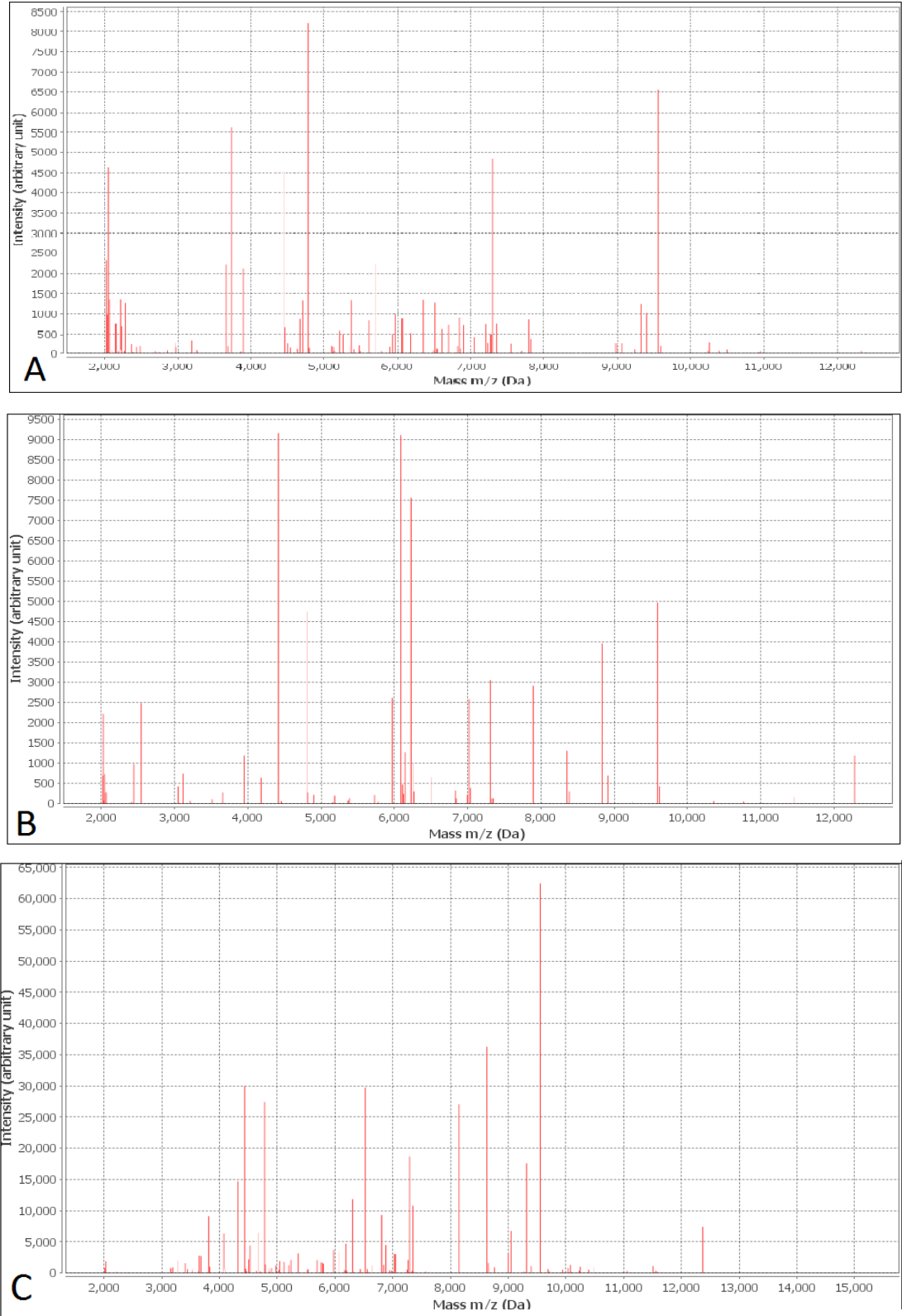
Şekil 15. KAA besiyerinden izole edilip, tanımlanan enterokok izolatlarının dağılımı

4.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlanan Laktik Asit Bakterilerinin Türlerle Ait Elde Edilen Spektrumları ve Dendrogram Analizleri

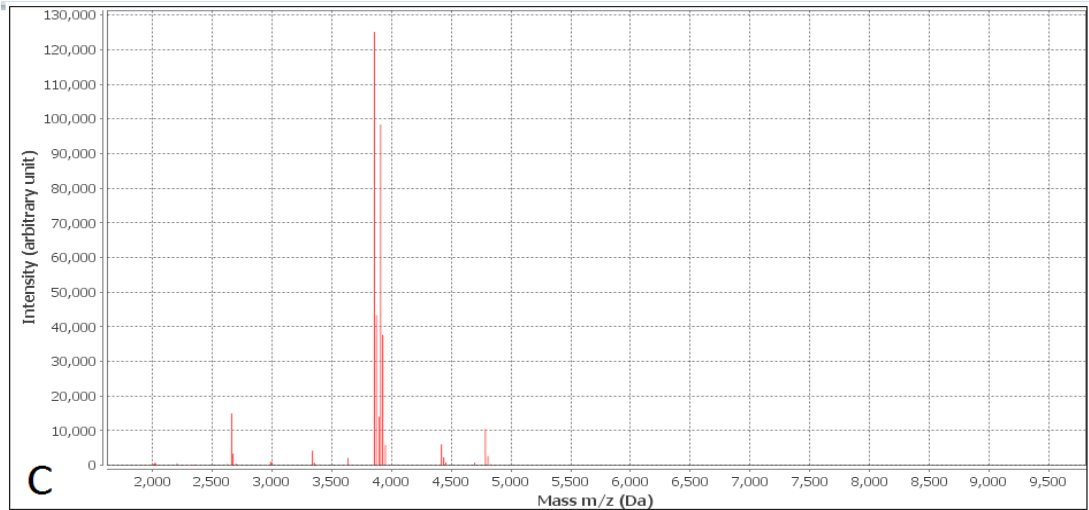
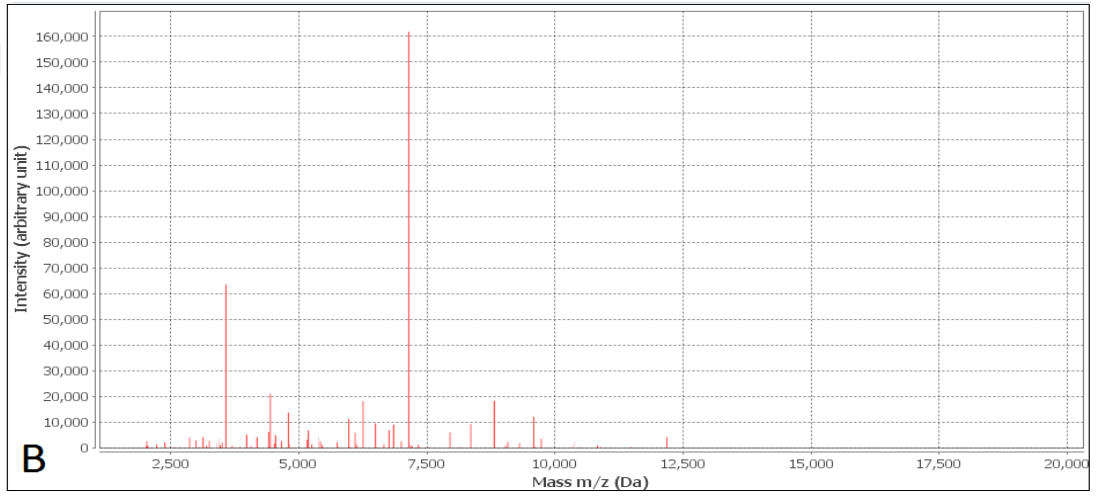
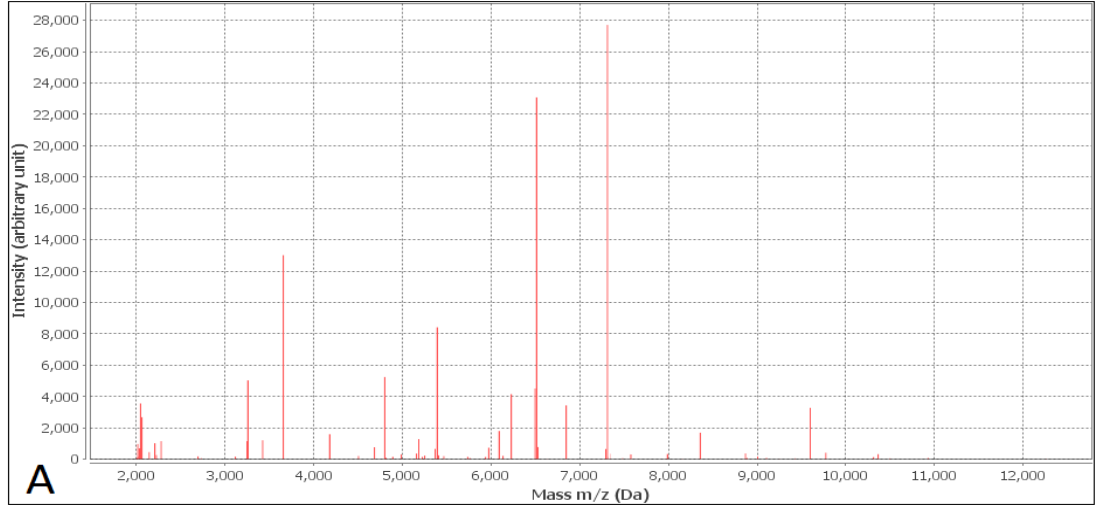
MALDI-TOF MS ile tanımlama sonucu alınan spektrumlar, 2.000 - 20.000 Da kütle ağırlığındaki yapıların 20 Hz'lik lazer vuruş sıklığı ile lineer pozitif iyon modeli kullanılarak elde edilmiştir. Lazer atışları sonrasında moleküllerin iyonize hale geçip cihazın tüpü içerisinde molekül ağırlığına göre uçmaya başlayarak detektöre çarpmasıyla oluşan veriler Launchpad (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japonya) programı sayesinde dijital hale çevrilip pik görüntüleri oluşturulmuştur. Tanımlanan farklı türlerdeki laktobasil, streptokok, laktokok ve enterekoklara ilişkin MALDI-TOF MS spektrumları Şekil 16,17 ve 18'de verilmiştir. Farklı türlere ait profillerin de farklı oldukları görülmektedir. Bununla birlikte tekniğin özellikle IVD veritabanının birbirine yakın olan türlerin ayırımında yeterli etkinliğe sahip olmadığı görülmektedir. *Lb. plantarum* ve *Lb. pentosus*'un ayırımı yapılamazken, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* türlerinin de ayrıştırılamadığı görülmektedir.



Şekil 16. MALDI-TOF MS laktobasillerden alınan spectrumlar m/z (da). A. *Lb. fermentum* B. *Lb. paracasei/casei/rhamnosus* C. *Lb. delbrueckii*

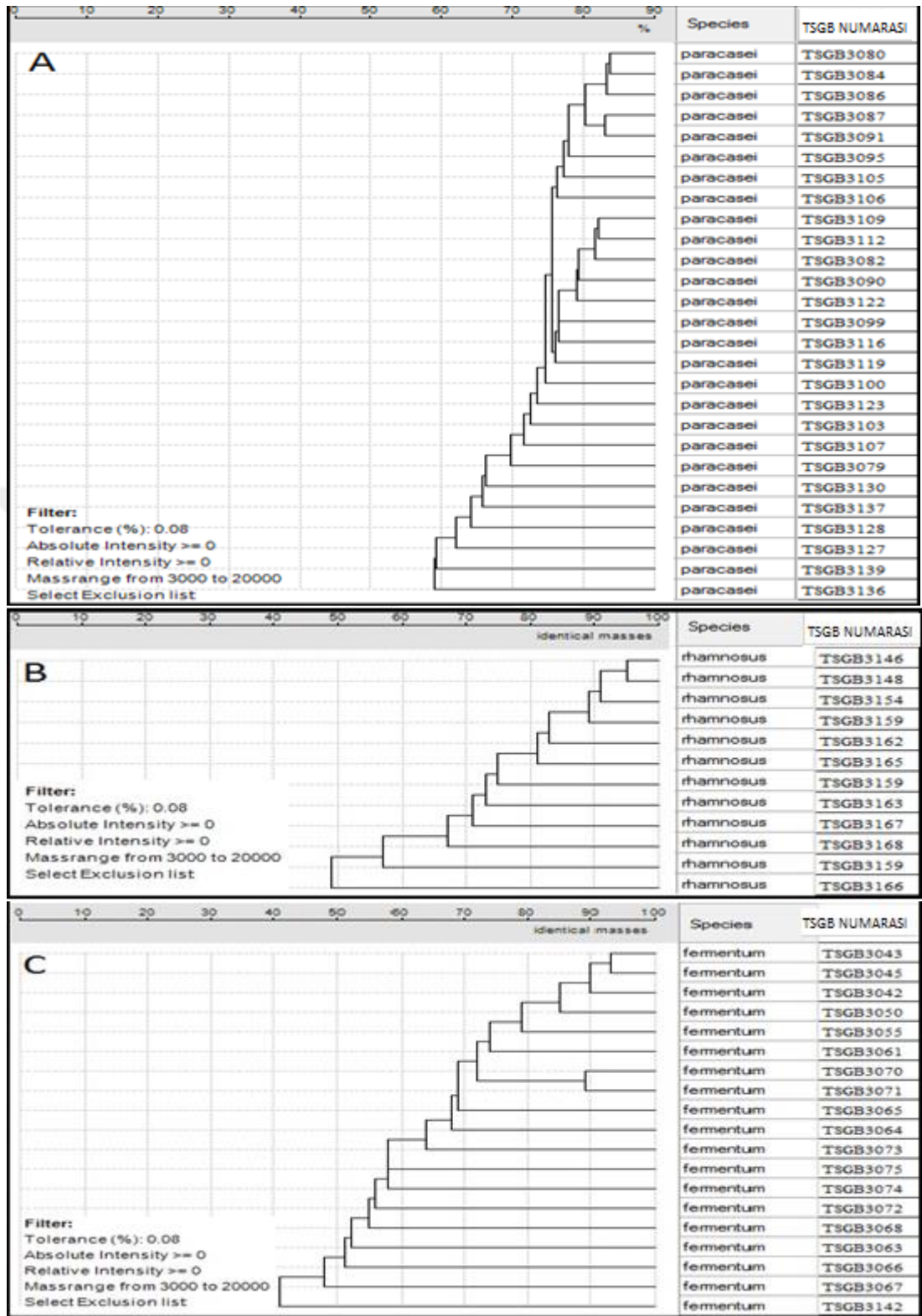


Şekil 17. MALDI-TOF MS ile enterekoklardan alınan spectrumlar m/z (da). A. *Ent. faecium* B. *Ent. faecalis* C. *Ent. durans*



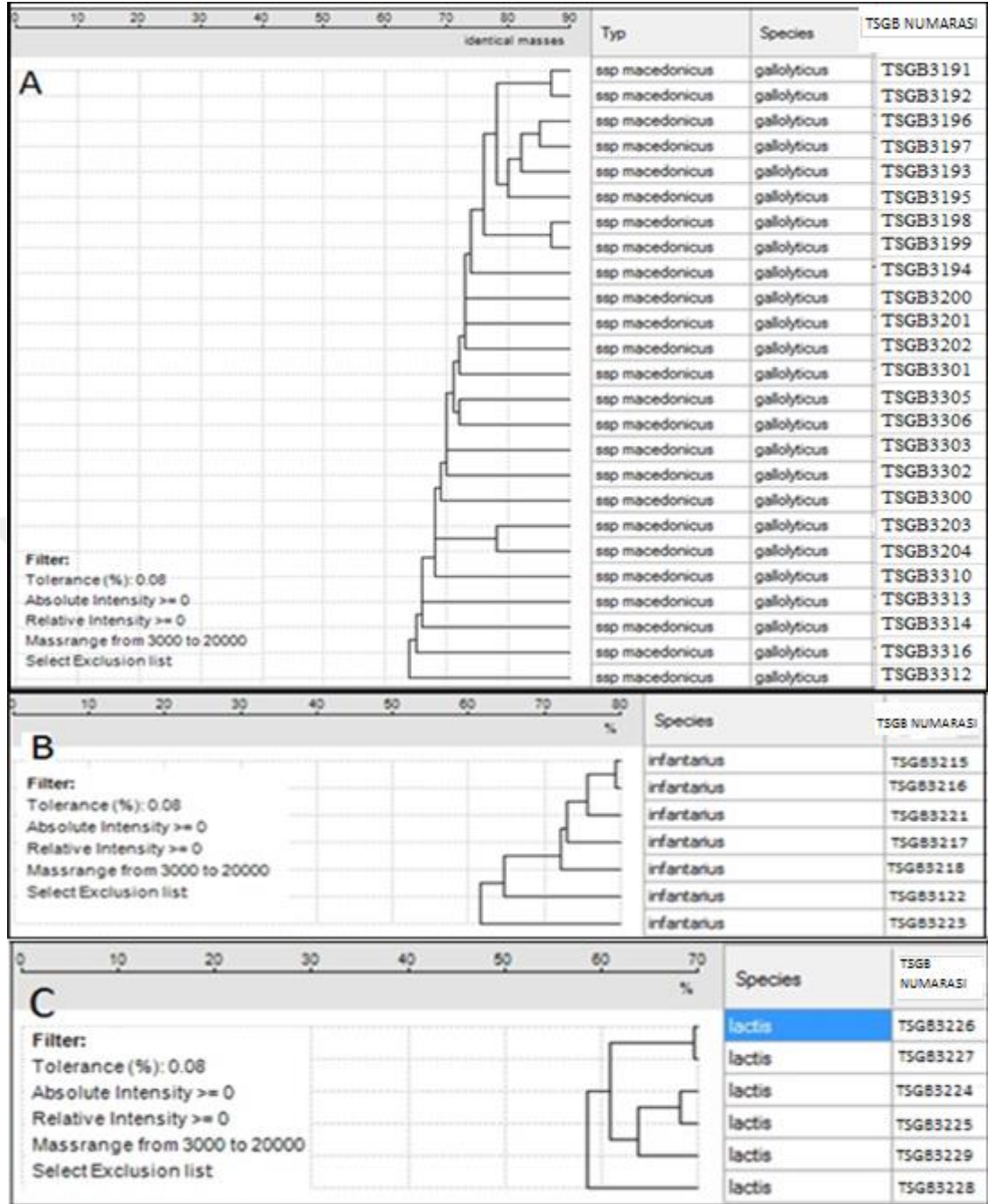
Şekil 18. MALDI-TOF MS streptekoklardan alınan spektrumlar m/z (da). A. *Str. gallolyticus ssp. macedonicus* B. *Str. infantarius ssp. infantarius* C. *L. lactis*.

Yine elde edilen bu profiller kullanılarak aynı türe ait suşlar arasındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya konulması da cihazın yapısına entegre edilmiş olan dendogram oluşturma sistemi ile incelendi (Şekil 19, 20, 21). Elde edilmiş olan protein pik profilleri kıyaslanarak suşların birbirleriyle olan yakınlık ve uzaklıkları “Pearson Korelasyonu” (% 0.8 tolerans) kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritması ile hesaplanmış ve dendogramlar oluşturulmuştur (De Respinis ve ark., 2013). Dendogramda analiz edilen birçok suşun % 80 seviyesinin daha altındaki seviyelerde homojenite gösterdiği ve farklı suşlar olma ihtimalinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu değerin üzerinde benzerlik gösterenlerin ise aynı suşun farklı izolatları olma ihtimali yüksektir. Bununla birlikte kullanılan bu tekniğin suş seviyesinde ayırım yapabilme gücünün sınırlı olduğu bilinmektedir, bu sebepten suşların ayırım gücü yüksek başka tekniklerle de onaylanması gerekmektedir.



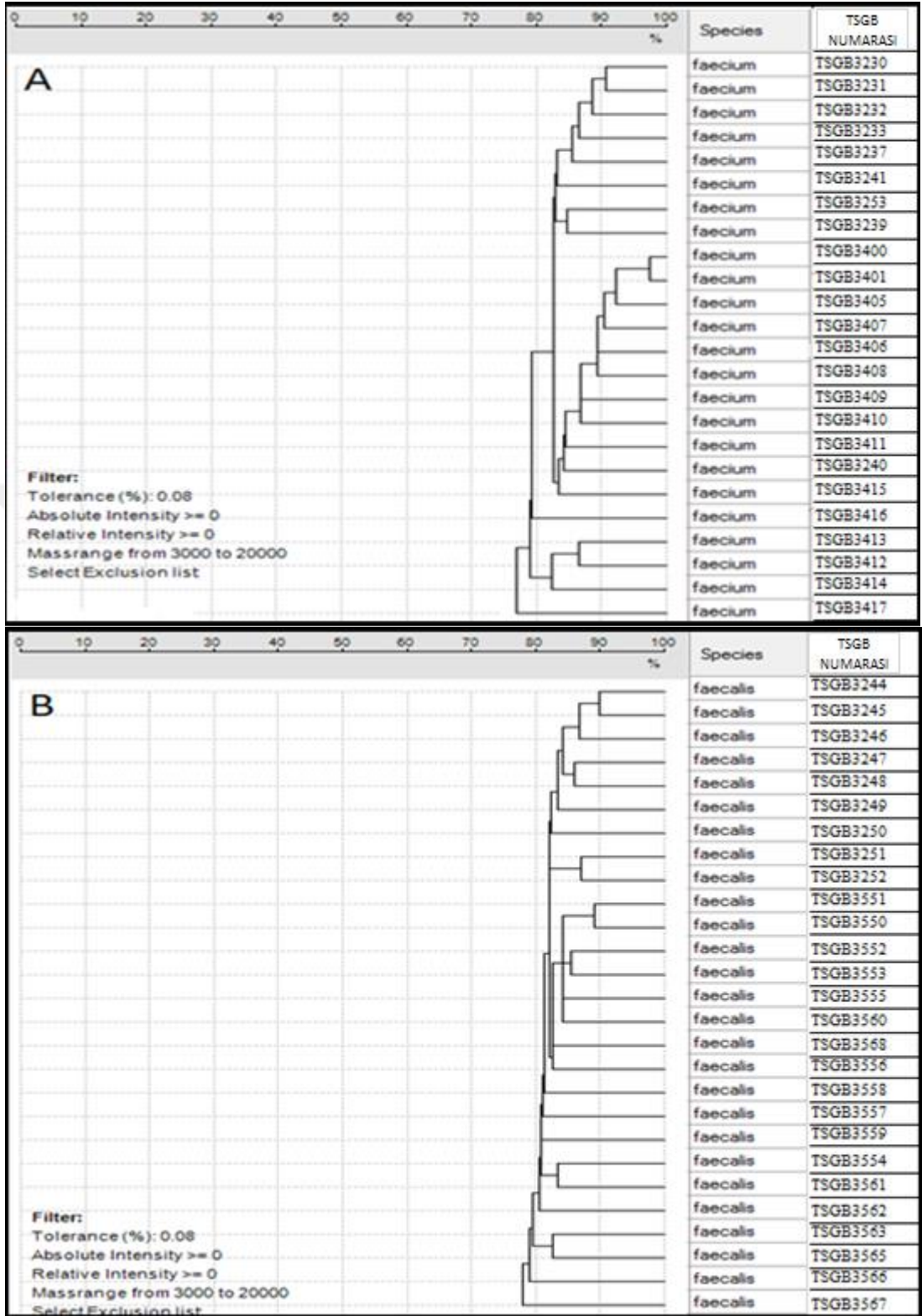
*TSGB:Türkiye Starter Kültür Gen Bankası Erişim Kodu

Şekil 19. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatların dendrogram görüntüleri. A. *Lb. paracasei* B. *Lb. rhamnosus* C. *Lb. fermentum*



*TSGB:Türkiye Starter Kültür Gen Bankası Erişim Kodu

Şekil 20. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatların dendrogram görüntüleri. A. *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* B. *Str. infantarius* ssp. *infantarius* C. *L. lactis*



*TSGB:Türkiye Starter Kültür Gen Bankası Erişim Kodu

Şekil 21. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatların dendrogram görüntüleri. A. *Ent. faecium* B. *Ent. faecalis*

4.6. API (50 CHL - 20 STREP), MALDI – TOF MS ve 16S rDNA Dizi Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Kullanılan tekniğin tanımlamadaki etkinliğini kıyaslamak amacıyla MALDI-TOF MS ile tanımlanmış olan 40 adet LAB suşu hem API ile hem de 16S rDNA dizi analizi ile teste tabi tutulmuştur (Tablo 21). Elde edilen sonuçlar laktobasiller ve enterokoklar için büyük oranda paralellik göstermiştir. Bununla birlikte bazı farklılıkların da bulunduğu gözlenmektedir. Örneğin *Lb. paracasei/casei/rhamnosus* olarak tanımlanan ancak ayrımı yapılamayan mikroorganizmalar hem API hem de 16S rDNA dizi analiziyle *Lb. paracasei* olarak tanımlanmıştır. *Lb. pentosus/plantarum* olarak belirlenenler ise *planarum* türü olarak tanımlanmıştır. *Lb. delbrueckii* olarak tür seviyesinde tanımlanan suşlar dizi analizi ile alt tür seviyesinde *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. Benzer şekilde MALDI-TOF MS ile *Lb. parabuchneri* olarak tanımlanan mikroorganizmalar dizi analiziyle de *Lb. parabuchneri* ancak API ile *Lb. buchneri* olarak tanımlanmıştır.

Streptokokların karşılaştırılmasından da bazı farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir. MALDI-TOF MS ile *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* olarak tanımlanan 5 adet suş, API 20 Strep test kitleri *Str. gallolyticus* ssp. *pasteurianus* olarak tanımlanmıştır. Bu durumun API test kitlerinin veritabanında *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* 'un yer almamasından kaynaklanmaktadır. *Str. infantarius* ssp. *infantarius* olarak tanımlanan 3 adet suşun, API ile yapılan tanımlamada *Str. infantarius* ssp. *infantarius* olarak tanımlandığı ancak tanımlama yüzdelerinin, % 85'in altında kaldığı görülmüştür. Ayrıca API 20 Strep test kitleri bu suşlar için yapılan tanımlamada, ikinci bir olası takson olan *Str. lutetiensis* 'i de vermiştir. 16S rDNA dizi analizi ise bu suşları (MK752865, MK752872, MK752873) *Str. lutetiensis* olarak tanımlamıştır. Ancak blast analizleri ile beraber incelendiğinde bu suşların, *Str. infantarius* HDP90056 suşuna % 99,9 oranında benzerliği görülmektedir. Görüldüğü üzere kullanılan bu teknikler *infantarius* veya *lutetiensis* tür/alttürlerini ayırt etmek için yeterli değildir. Bu iki mikroorganizmanın ayrımında *sodA* geni dizi analizinin de belirtilen bu tekniklere ilave olarak yapılması tanımlamada gereklidir (Almuzara ve ark., 2013).

Tablo 21. API, MALDI-TOF MS, 16S rDNA dizi analiz sonuçlarının karşılaştırılması

*TSGB NUMARASI	NCBI KAYIT NUMARASI	API 50 CHL-API 20 STREP	MALDI-TOF MS	16S rDNA
TSGB3080	MK752690	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei/casei/rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
TSGB3098	MK752709	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei/casei/rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
TSGB3086	MK752696	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei/casei/rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
TSGB3109	MK752723	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei/casei/rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
TSGB3090	MK752700	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei/casei/rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei</i>
TSGB3004	MK744067	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
TSGB3048	MK752638	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
TSGB3047	MK752637	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
TSGB3036	MK752624	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
TSGB3022	MK752610	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
TSGB3158	MK752784	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
TSGB3161	MK752787	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
TSGB3167	MK752795	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
TSGB3190	MK752823	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. pentosus/plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>
TSGB3186	MK752819	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. pentosus/plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>
TSGB3188	MK752821	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. pentosus/plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i>
TSGB3172	MK752801	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>
TSGB3175	MK752804	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>
TSGB3183	MK752815	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
TSGB3258	MK752816	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
TSGB3181	MK752811	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
TSGB3182	MK752814	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>

*TSGB : Türkiye Starter Gen Bankası Erişim Kodu

Tablo 21. Tablo 21'nin devamı

TSGB NUMARASI	NCBI KAYIT NUMARASI	API 50 CHL-API 20 STREP	MALDI-TOF MS	16S rDNA
TSGB3192	MK752825	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	<i>Str. macedonicus</i>
TSGB3197	MK752830	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	<i>Str. macedonicus</i>
TSGB3201	MK752834	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	<i>Str. macedonicus</i>
TSGB3204	MK752837	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	<i>Str. macedonicus</i>
TSGB3203	MK752836	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>pasteurianus</i>	<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	<i>Str. macedonicus</i>
TSGB3215	MK752865	<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	<i>Str. lutetiensis</i>
TSGB3222	MK752872	<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	<i>Str. lutetiensis</i>
TSGB3223	MK752873	<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	<i>Str. lutetiensis</i>
TSGB3228	MK752879	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
TSGB3224	MK752875	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
TSGB3230	MK752888	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>
TSGB3231	MK752889	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>
TSGB3232	MK752890	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>
TSGB3233	MK752891	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>
TSGB3237	MK752895	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium</i>
TSGB3244	MK752908	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>
TSGB3245	MK752909	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>
TSGB3246	MK752910	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>

*TSGB : Türkiye Starter Gen Bankası Erişim Kodu.

4.7. Laktobasillerin ve Streptekokların 16S rDNA Dizi Analizi ile Tanımlanması

Toplamda 203 adet laktobasil suşu 16S rDNA dizi analizine tabi tutulmuştur (Tablo 22). MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapıp dondurulan 14 adet *Lb. delbrueckii* suşundan sadece 2 tanesi tekrar canlandırılabilindi. Bu suşların donmaya karşı dirençlerinin düşük olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (Bozoğlu, Özilgen, & Bakır, 1987; Gündüz, 2010; Tsvetkov, & Shishkova, 1982).

MALDI-TOF MS ile yapılan tanımlamada filogenetik olarak birbirine yakınlık gösteren *paracasei*, *casei* ve *rhamnosus* türleri ayrıştırılamamakta ve bu sebepten dolayı da aletin IVD veri tabanında bu türler aynı grupta yer almaktadır. Bu şekilde tür seviyesinde MALDI-TOF MS ile *Lb. paracasei/casei/rhamnosus* olarak tanımlanan 85 adet suşun dizi analizi yapıldığında tür seviyesinde daha net sonuçlar elde edildiği ve bunların 66 adetinin *Lb. paracasei*, 16 adetinin *Lb. rhamnosus* 3 adetinin ise tamamen farklı bir tür olan *Lb. coryniformis* olduğu belirlenmiştir. *Lb. coryniformis* olarak tanımlanan MK752808, MK752809, MK752810 giriş numaralı bu suşların *Lb. paracasei* ATCC 25302 suşuna sırası ile % 96,40, %94,93 % 95,31 oranında benzer oldukları tespit edilmiştir. MALDI-TOF ile tanımlanan 13 adet *Lb. rhamnosus*, dizi analizi ile de *Lb. rhamnosus* olarak tanımlanmıştır. *Lb. fermentum* olarak tanımlanmış olan 80 suşun, 77'si dizi analizi ile onaylanmış ancak 3 tanesi tanımlanamamıştır. Yine *Lb. pentosus/plantarum* olarak tanımlanan 8 suşun 7'si dizi analizi sonuçlarına göre *Lb. plantarum* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca 6 *Lb. curvatus* suşunun 3'ü *Lb. curvatus* olarak, 5 adet *Lb. parabuchneri* suşunun 2'si *Lb. parabuchneri*, 3 adet *Lb. brevis*'in ise hepsi *Lb. brevis* olarak tanımlanmıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde her iki test sonuçlarının birbirine paralellik gösterdiği ancak birlikte kullanımlarının birbirlerini tamamlayıcı olduğu görülmüştür.

Dizi analizine tabi tutulan 47 streptekok suşuna ilişkin sonuçlar Tablo 23'de verilmiştir. MALDI-TOF MS veritabanında *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* olarak tanımlanan suşların hepsi aynı adla anılan *Str.macedonicus* olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS'de *Str. infantarius* ssp. *infantarius* olarak tanımlanan 10 suşun 7 tanesi dizi analizinde *Str. lutetiensis* olarak tanımlanırken, 3 tanesi *Str. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Dizi analizinde *Str. lutetiensis* olarak tanımlanan ve NCBI giriş numaraları MK752865, MK752866, MK752867, MK752868, MK752871, MK752872 ve MK752873 olan 7 suşun blast analizleri incelendiğinde *Str. infantarius*

HDP90056 suşuna sırası ile % 99,9, % 99,8, % 99,7, % 99,8, % 99,7, % 99,9, % 99,9 oranında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Dizi analizinde *Str. thermophilus* olarak tanımlanan MK752854, MK752843 ve MK752845 numaralı suşlar ise *Str. infantarius* HDP90056 suşuna benzerlik göstermektedir.

MALDI-TOF MS ile streptokok olarak tanımlanan ancak tür düzeyinde tanımlanamayan 8 suşun 6'sı *Str. thermophilus*, 2'si ise *Str. salivarius* türlerine benzerlik göstermiştir. Öte yandan *Str. thermophilus* olarak işaretlenen 7 suşun 7'si de *Str. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. *L. lactis* suşlarının 6 adeti dizi analizi ile onaylanırken bir adedi tanımlanamamıştır.

Tablo 22. Laktobasiller için karşılaştırmalı MALDI-TOF MS ve 16S rDNA dizi analiz sonuçları

MALDI-TOF MS ile tanımlama	16S rDNA Dizi Analizi ile Tanımlama						
	Dizi analizine alınan suş sayısı	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. delbr. ssp. lactis</i>	Tanımlanamayan
<i>Lb. paracasei/casei/rhamnosus</i>	85	66	16	3	-	-	-
<i>Lb. rhamnosus</i>	13	-	13	-	-	-	-
<i>Lb. curvatus</i>	6	-	-	-	3	-	3
<i>Lb. delbrueckii</i>	2	-	-	-	-	2	-
Toplam (adet/yüzde)	-	66 (% 32,5)	29 (% 14,2)	3	3	2	3
MALDI-TOF MS ile tanımlama	Dizi analizine alınan suş sayısı	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. helveticus</i>	Tanımlanamayan
<i>Lb. fermentum</i>	80	77	-	-	-	-	3
<i>Lb. pentosus/plantarum</i>	8	-	7	-	-	-	1
<i>Lb. parabuchneri</i>	5	-	-	2	-	-	3
<i>Lb. brevis</i>	3	-	-	-	3	-	-
<i>Lb. helveticus</i>	1	-	-	-	-	-	1
Toplam (adet/yüzde)	203	77 (% 37,9)	7	2	3	-	8

Tablo 23. Streptokoklar için karşılaştırmalı MALDI-TOF MS ve 16S rDNA dizi analiz sonuçları

MALDI-TOF MS ile tanımlama	16S rDNA Dizi Analizi ile Tanımlama							
	Dizi analizine alınan suş sayısı	<i>Str. macedonicus</i>	<i>Str. lutetiensis / infantarius</i>	<i>Str. infantarius</i>	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Str. salivarius</i>	<i>L. lactis</i> *	Tanımlanamayan
<i>Streptococcus</i> spp.	8	-	-	-	6	2	-	-
<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i>	10	-	7	-	3	-	-	-
<i>Str. thermophilus</i>	7	-	-	-	7	-	-	-
<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	15	15	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i>	7	-	-	-	-	-	6	1
Toplam	47	15 (% 31,9)	7 (% 14,8)	-	16 (% 34)	2	6 (% 12,7)	1

*Maldı Tof ile tanımlanan bir adet * *L. Lactis*, 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanamamıştır.

4.8. Organoleptik Olarak Yüksek Puan Alan Peynirlerin Florasının Değerlendirilmesi

Toplanan Mihaliç peynir numunelerinin duysal analizlerinin sonuçlarına göre yapı ve aroma kusurlu olanlar elenerek, beğenilen peynirler belirlenmiştir. Duysal analizlerden yüksek puan alan bu peynirler içerdikleri tuz oranlarına göre ve etiket bilgilerine göre tuzlu/az tuzlu olarak ayrılmışlardır. Yine peynirlerin kabuk (dış) ve iç (merkez) kısımları da kimyasal ve mikrobiyolojik yönlerden incelenmiştir.

4.8.1 Mihaliç Peynirlerinin Kimyasal ve Duysal Analizleri

Aroma ve yapı kusurları olan peynirlerin elenmesi amacıyla, peynir örnekleri hedonik skalaya göre duysal analize tabi tutulmuştur. Peynir örnekleri renk, görünüş, yapı, koku ve tat gibi duysal niteliklerine göre 1-9 (9- son derece iyi, 8- çok iyi, 7- orta derece iyi, 6- biraz iyi, 5-ne iyi ne kötü, 4- biraz kötü, 3- orta derece kötü, 2- çok kötü, 1- son derece kötü) arasında puanlama ile değerlendirilmiştir.

Duysal analizlerden orta seviye (5) ve üzeri puan alan 15 adet peynir kimyasal olarak ta test edilmiştir. Peynirlerde ortalama % tuz oranı değeri ise % 5,38 ± 0,99 olarak saptanmıştır. Bu değerin altındakiler az tuzlu üzerindeki ise tuzlu olarak sınıflandırılmıştır. Az tuzlu gruba ayrılan peynirlerdeki ortalama tuz oranı % 4.48 ± 0,65, tuzlu peynirlerde ortalama tuz oranı % 6,16 ± 0,33 olarak hesaplanmıştır.

Peynirlerin etiket bilgilerinin de bu değerdendirmeye paralellik gösterdiği ve uygun olduğu gözlenmiştir. Tablo 24’de Mihaliç peynirlerinin (8 adet tuzlu, 7 adet az tuzlu) tuz analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 24. Mihaliç peynirlerinin % tuz analiz sonucu

Peynir No	1	2	3	4	5	6	7	
Az Tuzlu Peynirler	5,37 ± 0,25	4,83 ± 0,23	4,83 ± 0,23	4,62 ± 0,22	4,48 ± 0,21	3,91 ± 0,18	3,36 ± 0,16	
Peynir No	1	2	3	4	5	6	7	8
Tuzlu Peynirler	6,61 ± 0,31	6,52 ± 0,31	6,4 ± 0,30	6,17 ± 0,29	6,15 ± 0,29	5,94 ± 0,27	5,89 ± 0,27	5,64 ± 0,26

Az tuzlu ve tuzlu olarak tasnif edilen peynirlerin aldıkları duyusal puan ortalamaları Tablo 25’de verilmiştir. Buna göre az tuzlu ve tuzlu peynirlerin ortalama duyusal nitelik puanları 5,80 ± 0,35 ile 5,85 ± 0,30 arasında değışiklik göstermiştir.

Tablo 25. Mihaliç peynir örneklerinin duyusal analiz sonuçları (Tuzlu / Az tuzlu)

Duyusal Nitelikler	Tuzlu Mihaliç Peynirleri	Az Tuzlu Mihaliç Peynirleri
Renk	6,16 ± 0,76	5,44 ± 1,26
Görünüş	5,63 ± 0,5	5,75 ± 0,96
Yapı	5,83 ± 0,39	6,2 ± 0,72
Koku	5,63 ± 0,70	5,88 ± 0,15
Tat	5,76 ± 0,79	6 ± 0,3
Ortalama	5,8 ± 0,35	5,85 ± 0,30

Tuzlu ve az tuzlu olarak tasnif edilen peynirlerin kimyasal analiz sonuçlarının ortalama değeri Tablo 26’de verilmiştir. Peynirlerin kabuk kısımları ile iç kısımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05).

Tablo 26. Mihaliç peynirleri kimyasal analiz sonuçları

Kimyasal Analizler	Tuzlu Mihaliç Peynirleri		Az Tuzlu Mihaliç Peynirleri	
	Kabuk (Dış)	İç (Merkez)	Kabuk (Dış)	İç (Merkez)
% Kuru madde	59,47 ± 1,41	57,80 ± 1,28	58,44 ± 1,92	56,47 ± 1,36
% Kuru maddede yağ	44,39 ± 0,79	45,14 ± 1,1	49,89 ± 1,39	48,16 ± 1,38
% Protein	21,20 ± 0,25	22,12 ± 1,02	20,85 ± 0,85	21,26 ± 0,29
pH	5,26 ± 0,88	5,28 ± 0,06	5,64 ± 0,16	5,61 ± 0,55
% LA	1,54 ± 0,14	1,64 ± 1,93	1,24 ± 0,21	1,26 ± 0,25

4.8.2. Az Tuzlu ve Tuzlu Mihaliç Peynirlerinin Mikrobiyolojik Analizleri

Tuzlu ve az tuzlu Mihaliç peynirleri ile bu peynirlerin kabuk ve iç kısımları ayrı ayrı laktik mikrobiyota yönünden incelenmiştir (Tablo 27). Laktobasil sayısı bakımından tuzlu ve az tuzlu peynirlerin arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Yine laktobasiller ve enterokok sayıları bakımından kabuk ve iç kısımları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 27. Mihaliç peynirlerinin laktik asit bakteri sayımları

Mihaliç Peynirleri	<i>Lactobacillus</i> spp. log (kob/gr) (MRS agar)	<i>Streptococcus</i> spp. log (kob/gr) (M17 agar)	<i>Enterococcus</i> spp. log (kob/gr) (KA agar)
Tuzlu	6,2±0,52 ^a	7,1±0,47	6,09±0,19
Az Tuzlu	7,06±0,44 ^b	7,27±0,12	6,14±0,28
Kabuk	5,30±0,52 ^a	7,00±0,27	5,26±0,31 ^b
İç Kısım	6,78±0,29 ^b	6,78±0,32	6,31±0,18 ^a

Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık ^{a, b} $P<0.05$ düzeyinde önemlidir

4.8.2.1. Az tuzlu/tuzlu Peynirlerin Kabuk ve İç Kısımlarında Laktik Floranın Değerlendirilmesi

Test edilen 15 adet peynir örneğinin kabuk ve iç kısımlarından ayrı ayrı yapılan ekimler sonucunda MRSA, M17, KAA besiyerlerinden (her bir peynirin kabuğundan 15, iç kısmından 15 olmak üzere) toplam 450 koloni tür/alttür seviyesinde tanımlama için seçilmiştir. Gram boyama ve katalaz testi olumsuz çıkan ve LAB profili göstermeyen mikroorganizmalar elendikten sonra MRS agardan 142, M17 agardan 120 ve KAA agardan 107 koloni olmak üzere toplam 369 koloni MALDI-TOF (RUO-SARAMIS) /16S rDNA ile tanımlanmıştır.

Tuzlu ve az tuzlu peynirlerin kabuk ve merkez kısımlarında bulunan LAB dağılımları Tablo 28 ve 29’de verilmiştir.

Tablo 28. Tuzlu ve az tuzlu peynirlerin LAB florası

Mikroorganizma	Tuzlu		Az Tuzlu		Toplam	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
<i>Lb. paracasei</i>	15	30,6	52	55,9	67	47,1
<i>Lb. rhamnosus</i>	6	12,2	12	12,9	18	12,6
<i>Lb. fermentum</i>	27	55,1	23	24,7	50	35,2
<i>Lb. plantarum</i>	1	2	-	-	1	0,7
<i>Lb. delbrueckii</i>	-	-	4	4,3	4	2,8
<i>Lb. curvatus</i>	-	-	2	2,1	2	1,4
Toplam <i>Lactobacillus</i> spp.	49	100	93	100	142	100
<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	16	41	17	41,4	33	41,2
<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i> (<i>Str. lutetiensis</i>)	4	10,2	2	4,8	6	7,5
<i>Str. thermophilus</i>	3	7,6	3	7,3	6	7,5
<i>L. lactis</i>	16	41	19	46,3	35	43,7
Toplam <i>Streptococcus</i> spp.	39	100	41	100	80	100
<i>Ent. faecium</i>	32	45	32	42,1	64	43,5
<i>Ent. faecalis</i>	28	39,4	34	44,7	62	42,1
<i>Ent. durans</i>	11	15,4	6	7,8	17	11,5
<i>Ent. raffinosus</i>	-	-	4	5,2	4	2,7
Toplam <i>Enterococcus</i> spp.	71	100	76	100	147	100

Tablo 28’de görüldüğü üzere; tuzlu ve az tuzlu peynirlerin florası kıyaslandığında göze çarpan önemli hususlardan biri *Lb. paracasei*’nin izolasyon yaygınlığı az tuzlu peynirlerde daha yüksek iken, *Lb. fermentum*’un tuzlu peynirlerdeki

yaygınlığının daha yüksek bulunması olmuştur. *Lb. delbrueckii* ve *Lb. curvatus* sadece az tuzlu peynirlerden alınan örneklerden tanımlanmıştır. Oransal olarak *Str. infantarius* ssp. *infartarius* tuzlu peynirlerde nispeten daha yaygın bulunmuştur. Duyusal olarak üstün seçilen bu peynirlerden izole edilen *L. Lactis* yaygınlığının (% 43,7) M17 agarda üreyen diğer türlerden yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 29. Peynirlerin kabuk ve iç kısımlarında mikrobiyal dağılımı

Mikroorganizma	Kabuk		İç		Toplam	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
<i>Lb. paracasei</i>	30	63,8	37	38,9	67	47,1
<i>Lb. rhamnosus</i>	4	8,5	14	14,7	18	12,6
<i>Lb. fermentum</i>	9	19,1	41	43,1	50	35,2
<i>Lb. pentosus</i>	1	2,1	-	-	1	0,7
<i>Lb. delbrueckii</i>	2	4,2	2	2,1	4	2,8
<i>Lb. curvatus</i>	1	2,1	1	1,05	2	1,4
Toplam <i>Lactobacillus</i> spp.	47	100	95	100	142	100
<i>Str. gallolyticus</i> ssp. <i>macedonicus</i>	18	47,3	15	35,7	33	41,2
<i>Str. infantarius</i> ssp. <i>infantarius</i> (<i>Str. lutetiensis</i>)	2	5,2	4	9,5	6	7,5
<i>Str. thermophilus</i>	2	5,2	4	9,5	6	7,5
<i>L. lactis</i>	16	42,1	19	45,2	35	43,7
Toplam <i>Streptococcus</i> spp.	38	100	42	100	80	100
<i>Ent. faecium</i>	46	52,8	18	30	64	43,5
<i>Ent. faecalis</i>	29	33,3	33	55	62	42,1
<i>Ent. durans</i>	9	10,3	8	13,3	17	11,5
<i>Ent. raffinosus</i>	3	3,4	1	1,6	4	2,7
Toplam <i>Enterococcus</i> spp.	87	100	60	100	147	100

Tablo 29’da görüldüğü üzere *Lb. fermentum* (% 43,1) ve *Lb. rhamnosus* (% 14,7) oransal olarak iç kısımda daha yaygın olduğu, buna karşın *Lb. paracasei* ’nin (% 63,8) kabuk kısımda daha yaygın olduğu belirlenmiştir. *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus*’un kabuk kısmında nispeten daha yaygın olduğu, az sayıda izole edilmiş olsada *Str. infantarius* ssp. *infantarius* ve *Str.thermophilus*’un iç kısımda daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Enterokoklar değerlendirildiğinde ise *Ent. faecium*’un kabuktan (% 52,8), *Ent. faecalis*’in ise (% 55) merkez kısımdan daha yüksek yüzde oranı ile izole edildiği belirlenmiştir.

4.9. Elde Edilen Suşların Kültür Koleksiyonuna Dahil Edilmesi

Çalışmamızda elde ettiğimiz suşların 16S rDNA geni NCBI kayıt numaraları ile ilgili Türkiye Starter Kültür Gen Bankası numaraları Tablo 30’ da verilmiştir.

Tablo 30. Tanımlanan ve kültür koleksiyonuna alınan mikroorganizmaların listesi (NCBI kayıt ve TSGB kodları ile birlikte)

Sıra No	*TSGB Kodu	*NCBI Kayıt Numarası	16S rDNA Dizi Analiz Sonucuna Göre En Yakın Tür
1	TSGB3001	MK744064	<i>Lb. fermentum</i>
2	TSGB3002	MK744065	<i>Lb. fermentum</i>
3	TSGB3003	MK744066	<i>Lb. fermentum</i>
4	TSGB3004	MK744067	<i>Lb. fermentum</i>
5	TSGB3005	MK744068	<i>Lb. fermentum</i>
6	TSGB3006	MK744069	<i>Lb. fermentum</i>
7	TSGB3007	MK744070	<i>Lb. fermentum</i>
8	TSGB3008	MK744071	<i>Lb. fermentum</i>
9	TSGB3009	MK744072	<i>Lb. fermentum</i>
10	TSGB3010	MK744073	<i>Lb. fermentum</i>
11	TSGB3011	MK752599	<i>Lb. fermentum</i>
12	TSGB3012	MK752600	<i>Lb. fermentum</i>
13	TSGB3013	MK752601	<i>Lb. fermentum</i>
14	TSGB3014	MK752602	<i>Lb. fermentum</i>
15	TSGB3015	MK752603	<i>Lb. fermentum</i>
16	TSGB3016	MK752604	<i>Lb. fermentum</i>
17	TSGB3017	MK752605	<i>Lb. fermentum</i>
18	TSGB3018	MK752606	<i>Lb. fermentum</i>
19	TSGB3019	MK752607	<i>Lb. fermentum</i>
20	TSGB3020	MK752608	<i>Lb. fermentum</i>
21	TSGB3021	MK752609	<i>Lb. fermentum</i>
22	TSGB3022	MK752610	<i>Lb. fermentum</i>
23	TSGB3023	MK752611	<i>Lb. fermentum</i>
24	TSGB3024	MK752612	<i>Lb. fermentum</i>
25	TSGB3025	MK752613	<i>Lb. fermentum</i>
26	TSGB3026	MK752614	<i>Lb. fermentum</i>
27	TSGB3027	MK752615	<i>Lb. fermentum</i>
28	TSGB3028	MK752616	<i>Lb. fermentum</i>
29	TSGB3029	MK752617	<i>Lb. fermentum</i>
30	TSGB3030	MK752618	<i>Lb. fermentum</i>
31	TSGB3031	MK752619	<i>Lb. fermentum</i>
32	TSGB3032	MK752620	<i>Lb. fermentum</i>
33	TSGB3033	MK752621	<i>Lb. fermentum</i>
34	TSGB3034	MK752622	<i>Lb. fermentum</i>
35	TSGB3035	MK752623	<i>Lb. fermentum</i>
36	TSGB3036	MK752624	<i>Lb. fermentum</i>
37	TSGB3037	MK752625	<i>Lb. fermentum</i>
38	TSGB3038	MK752626	<i>Lb. fermentum</i>
39	TSGB3039	MK752627	<i>Lb. fermentum</i>
40	TSGB3040	MK752628	<i>Lb. fermentum</i>

41	TSGB3041	MK752631	<i>Lb. fermentum</i>
42	TSGB3042	MK752632	<i>Lb. fermentum</i>
43	TSGB3043	MK752633	<i>Lb. fermentum</i>
44	TSGB3044	MK752634	<i>Lb. fermentum</i>
45	TSGB3045	MK752635	<i>Lb. fermentum</i>
46	TSGB3046	MK752636	<i>Lb. fermentum</i>
47	TSGB3047	MK752637	<i>Lb. fermentum</i>
48	TSGB3048	MK752638	<i>Lb. fermentum</i>
49	TSGB3049	MK752639	<i>Lb. fermentum</i>
50	TSGB3050	MK752640	<i>Lb. fermentum</i>
51	TSGB3051	MK752641	<i>Lb. fermentum</i>
52	TSGB3052	MK752642	<i>Lb. fermentum</i>
53	TSGB3053	MK752643	<i>Lb. fermentum</i>
54	TSGB3054	MK752644	<i>Lb. fermentum</i>
55	TSGB3055	MK752645	<i>Lb. fermentum</i>
56	TSGB3056	MK752646	<i>Lb. fermentum</i>
57	TSGB3057	MK752647	<i>Lb. fermentum</i>
58	TSGB3058	MK752648	<i>Lb. fermentum</i>
59	TSGB3059	MK752649	<i>Lb. fermentum</i>
60	TSGB3060	MK752650	<i>Lb. fermentum</i>
61	TSGB3061	MK752651	<i>Lb. fermentum</i>
62	TSGB3062	MK752652	<i>Lb. fermentum</i>
63	TSGB3063	MK752653	<i>Lb. fermentum</i>
64	TSGB3064	MK752654	<i>Lb. fermentum</i>
65	TSGB3065	MK752655	<i>Lb. fermentum</i>
66	TSGB3066	MK752656	<i>Lb. fermentum</i>
67	TSGB3067	MK752657	<i>Lb. fermentum</i>
68	TSGB3068	MK752658	<i>Lb. fermentum</i>
69	TSGB3069	MK752659	<i>Lb. fermentum</i>
70	TSGB3070	MK752660	<i>Lb. fermentum</i>
71	TSGB3071	MK752661	<i>Lb. fermentum</i>
72	TSGB3072	MK752662	<i>Lb. fermentum</i>
73	TSGB3073	MK752663	<i>Lb. fermentum</i>
74	TSGB3074	MK752664	<i>Lb. fermentum</i>
75	TSGB3075	MK752665	<i>Lb. fermentum</i>
76	TSGB3142	MK752666	<i>Lb. fermentum</i>
77	TSGB3143	MK752667	<i>Lb. fermentum</i>
78	TSGB3076	MK752686	<i>Lb. paracasei</i>
79	TSGB3077	MK752687	<i>Lb. paracasei</i>
80	TSGB3078	MK752688	<i>Lb. paracasei</i>
81	TSGB3079	MK752689	<i>Lb. paracasei</i>
82	TSGB3080	MK752690	<i>Lb. paracasei</i>
83	TSGB3081	MK752691	<i>Lb. paracasei</i>
84	TSGB3082	MK752692	<i>Lb. paracasei</i>
85	TSGB3083	MK752693	<i>Lb. paracasei</i>
86	TSGB3084	MK752694	<i>Lb. paracasei</i>
87	TSGB3085	MK752695	<i>Lb. paracasei</i>
88	TSGB3086	MK752696	<i>Lb. paracasei</i>
89	TSGB3087	MK752697	<i>Lb. paracasei</i>
90	TSGB3088	MK752698	<i>Lb. paracasei</i>

91	TSGB3089	MK752699	<i>Lb. paracasei</i>
92	TSGB3090	MK752700	<i>Lb. paracasei</i>
93	TSGB3091	MK752701	<i>Lb. paracasei</i>
94	TSGB3092	MK752702	<i>Lb. paracasei</i>
95	TSGB3093	MK752703	<i>Lb. paracasei</i>
96	TSGB3094	MK752704	<i>Lb. paracasei</i>
97	TSGB3095	MK752705	<i>Lb. paracasei</i>
98	TSGB3096	MK752707	<i>Lb. paracasei</i>
99	TSGB3097	MK752708	<i>Lb. paracasei</i>
100	TSGB3098	MK752709	<i>Lb. paracasei</i>
101	TSGB3099	MK752710	<i>Lb. paracasei</i>
102	TSGB3100	MK752711	<i>Lb. paracasei</i>
103	TSGB3101	MK752712	<i>Lb. paracasei</i>
104	TSGB3102	MK752713	<i>Lb. paracasei</i>
105	TSGB3103	MK752714	<i>Lb. paracasei</i>
106	TSGB3104	MK752715	<i>Lb. paracasei</i>
107	TSGB3105	MK752716	<i>Lb. paracasei</i>
108	TSGB3106	MK752720	<i>Lb. paracasei</i>
109	TSGB3107	MK752721	<i>Lb. paracasei</i>
110	TSGB3108	MK752722	<i>Lb. paracasei</i>
111	TSGB3109	MK752723	<i>Lb. paracasei</i>
112	TSGB3110	MK752724	<i>Lb. paracasei</i>
113	TSGB3111	MK752725	<i>Lb. paracasei</i>
114	TSGB3112	MK752726	<i>Lb. paracasei</i>
115	TSGB3113	MK752727	<i>Lb. paracasei</i>
116	TSGB3114	MK752728	<i>Lb. paracasei</i>
117	TSGB3115	MK752729	<i>Lb. paracasei</i>
118	TSGB3116	MK752730	<i>Lb. paracasei</i>
119	TSGB3117	MK752731	<i>Lb. paracasei</i>
120	TSGB3118	MK752732	<i>Lb. paracasei</i>
121	TSGB3119	MK752733	<i>Lb. paracasei</i>
122	TSGB3120	MK752734	<i>Lb. paracasei</i>
123	TSGB3121	MK752735	<i>Lb. paracasei</i>
124	TSGB3122	MK752736	<i>Lb. paracasei</i>
125	TSGB3123	MK752737	<i>Lb. paracasei</i>
126	TSGB3124	MK752738	<i>Lb. paracasei</i>
127	TSGB3125	MK752739	<i>Lb. paracasei</i>
128	TSGB3126	MK752743	<i>Lb. paracasei</i>
129	TSGB3127	MK752744	<i>Lb. paracasei</i>
130	TSGB3128	MK752745	<i>Lb. paracasei</i>
131	TSGB3129	MK752746	<i>Lb. paracasei</i>
132	TSGB3130	MK752747	<i>Lb. paracasei</i>
133	TSGB3131	MK752748	<i>Lb. paracasei</i>
134	TSGB3132	MK752749	<i>Lb. paracasei</i>
135	TSGB3133	MK752750	<i>Lb. paracasei</i>
136	TSGB3134	MK752751	<i>Lb. paracasei</i>
137	TSGB3135	MK752752	<i>Lb. paracasei</i>
138	TSGB3136	MK752760	<i>Lb. paracasei</i>
139	TSGB3137	MK752761	<i>Lb. paracasei</i>
140	TSGB3138	MK752762	<i>Lb. paracasei</i>

141	TSGB3139	MK752763	<i>Lb. paracasei</i>
142	TSGB3140	MK752764	<i>Lb. paracasei</i>
143	TSGB3141	MK752765	<i>Lb. paracasei</i>
144	TSGB3144	MK752770	<i>Lb. rhamnosus</i>
145	TSGB3145	MK752771	<i>Lb. rhamnosus</i>
146	TSGB3146	MK752772	<i>Lb. rhamnosus</i>
147	TSGB3147	MK752773	<i>Lb. rhamnosus</i>
148	TSGB3148	MK752774	<i>Lb. rhamnosus</i>
149	TSGB3149	MK752775	<i>Lb. rhamnosus</i>
150	TSGB3150	MK752776	<i>Lb. rhamnosus</i>
151	TSGB3151	MK752777	<i>Lb. rhamnosus</i>
152	TSGB3152	MK752778	<i>Lb. rhamnosus</i>
153	TSGB3153	MK752779	<i>Lb. rhamnosus</i>
154	TSGB3154	MK752780	<i>Lb. rhamnosus</i>
155	TSGB3155	MK752781	<i>Lb. rhamnosus</i>
156	TSGB3156	MK752782	<i>Lb. rhamnosus</i>
157	TSGB3157	MK752783	<i>Lb. rhamnosus</i>
158	TSGB3158	MK752784	<i>Lb. rhamnosus</i>
159	TSGB3159	MK752785	<i>Lb. rhamnosus</i>
160	TSGB3160	MK752786	<i>Lb. rhamnosus</i>
161	TSGB3161	MK752787	<i>Lb. rhamnosus</i>
162	TSGB3162	MK752788	<i>Lb. rhamnosus</i>
163	TSGB3163	MK752789	<i>Lb. rhamnosus</i>
164	TSGB3164	MK752792	<i>Lb. rhamnosus</i>
165	TSGB3165	MK752793	<i>Lb. rhamnosus</i>
166	TSGB3166	MK752794	<i>Lb. rhamnosus</i>
167	TSGB3167	MK752795	<i>Lb. rhamnosus</i>
168	TSGB3168	MK752796	<i>Lb. rhamnosus</i>
169	TSGB3169	MK752797	<i>Lb. rhamnosus</i>
170	TSGB3170	MK752798	<i>Lb. rhamnosus</i>
171	TSGB3171	MK752799	<i>Lb. rhamnosus</i>
172	TSGB3261	MK752800	<i>Lb. rhamnosus</i>
173	TSGB3172	MK752801	<i>Lb. brevis</i>
174	TSGB3173	MK752802	<i>Lb. brevis</i>
175	TSGB3175	MK752804	<i>Lb. brevis</i>
176	TSGB3176	MK752805	<i>Lb. curvatus</i>
177	TSGB3177	MK752806	<i>Lb. curvatus</i>
178	TSGB3178	MK752807	<i>Lb. curvatus</i>
179	TSGB3179	MK752808	<i>Lb. coryniformis</i>
180	TSGB3180	MK752809	<i>Lb. coryniformis</i>
181	TSGB3260	MK752810	<i>Lb. coryniformis</i>
182	TSGB3181	MK752811	<i>Lb. parabuchneri</i>
183	TSGB3182	MK752814	<i>Lb. parabuchneri</i>
184	TSGB3183	MK752815	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>
185	TSGB3258	MK752816	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>
186	TSGB3184	MK752817	<i>Lb. plantarum</i>
187	TSGB3185	MK752818	<i>Lb. plantarum</i>
188	TSGB3186	MK752819	<i>Lb. plantarum</i>
189	TSGB3187	MK752820	<i>Lb. plantarum</i>
190	TSGB3188	MK752821	<i>Lb. plantarum</i>

191	TSGB3189	MK752822	<i>Lb. plantarum</i>
192	TSGB3190	MK752823	<i>Lb. plantarum</i>
193	TSGB3191	MK752824	<i>Str. macedonicus</i>
194	TSGB3192	MK752825	<i>Str. macedonicus</i>
195	TSGB3193	MK752826	<i>Str. macedonicus</i>
196	TSGB3194	MK752827	<i>Str. macedonicus</i>
197	TSGB3195	MK752828	<i>Str. macedonicus</i>
198	TSGB3196	MK752829	<i>Str. macedonicus</i>
199	TSGB3197	MK752830	<i>Str. macedonicus</i>
200	TSGB3198	MK752831	<i>Str. macedonicus</i>
201	TSGB3199	MK752832	<i>Str. macedonicus</i>
202	TSGB3200	MK752833	<i>Str. macedonicus</i>
203	TSGB3201	MK752834	<i>Str. macedonicus</i>
204	TSGB3202	MK752835	<i>Str. macedonicus</i>
205	TSGB3203	MK752836	<i>Str. macedonicus</i>
206	TSGB3204	MK752837	<i>Str. macedonicus</i>
207	TSGB3268	MK752838	<i>Str. macedonicus</i>
208	TSGB3205	MK752839	<i>Str. thermophilus</i>
209	TSGB3206	MK752840	<i>Str. thermophilus</i>
210	TSGB3207	MK752841	<i>Str. thermophilus</i>
211	TSGB3208	MK752842	<i>Str. thermophilus</i>
212	TSGB3209	MK752843	<i>Str. thermophilus</i>
213	TSGB3210	MK752844	<i>Str. thermophilus</i>
214	TSGB3211	MK752845	<i>Str. thermophilus</i>
215	TSGB3212	MK752846	<i>Str. thermophilus</i>
216	TSGB3213	MK752847	<i>Str. thermophilus</i>
217	TSGB3214	MK752848	<i>Str. thermophilus</i>
218	TSGB3262	MK752850	<i>Str. thermophilus</i>
219	TSGB3263	MK752851	<i>Str. thermophilus</i>
220	TSGB3264	MK752852	<i>Str. thermophilus</i>
221	TSGB3265	MK752853	<i>Str. thermophilus</i>
222	TSGB3266	MK752854	<i>Str. thermophilus</i>
223	TSGB3267	MK752855	<i>Str. thermophilus</i>
224	TSGB3215	MK752865	<i>Str. lutetiensis</i>
225	TSGB3216	MK752866	<i>Str. lutetiensis</i>
226	TSGB3217	MK752867	<i>Str. lutetiensis</i>
227	TSGB3218	MK752868	<i>Str. lutetiensis</i>
228	TSGB3221	MK752871	<i>Str. lutetiensis</i>
229	TSGB3222	MK752872	<i>Str. lutetiensis</i>
230	TSGB3223	MK752873	<i>Str. lutetiensis</i>
231	TSGB3219	MK752869	<i>Str. salivarius</i>
232	TSGB3220	MK752870	<i>Str. salivarius</i>
233	TSGB3224	MK752875	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
234	TSGB3225	MK752876	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
235	TSGB3226	MK752877	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
236	TSGB3227	MK752878	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
237	TSGB3228	MK752879	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
238	TSGB3229	MK752880	<i>L. lactis ssp. lactis</i>

*TSGB : Türkiye Starter Gen Bankası Erişim Kodu

*NCBI : National Center for Biotechnology Information

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemiz peynir çeşitliliği bakımından zengin bir ülkedir. Geleneksel peynirlerin doğal mikrobiyotasında bulunan laktik asit bakterileri, ürettikleri bileşikler ile peynirlerde dokuyu geliştirir ve nihai ürünün tat, koku, yapı ve görünüm açısından beklenen nitelikleri kazanmasına katkıda bulunurlar. Bu sebeple geleneksel süt ürünlerinin doğal mikrobiyotasını oluşturan laktik asit bakterileri üzerine hem endüstriyel alanda, hem de bilimsel alanda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Kanak, & Yılmaz, 2018; Kıran, & Osmanağaoğlu, 2011). Bu çalışmada kendine has özellikleri ile ayrı bir yerde olan, önemli bir peynir çeşidimiz, Mihaliç peynirinin geniş çaplı mikrobiyotası ortaya çıkartılmıştır.

Mihaliç peynirlerinde LAB sayılarını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda; Şen (1991) çiğ süttten yapılan Mihaliç peynir örneklerinde laktik *Streptococcus* spp. sayısını 3,74- 5,23 log kob/g, *Lactobacillus* spp. ise 1,82- 3,67 log kob/g düzeyinde; Özdemir ve ark., (2004) ise laktik asit bakteri sayılarının 5,41 log kob/g düzeyinde olduğunu rapor etmişlerdir. Bulut (2006) çiğ süttten yapılan peynir örneklerinin toplam mezofilik laktik asit bakteri sayısını olgunlaşmanın 1. gününde 8,07 log kob/g, olgunlaşmanın 90. Gününde 7,93 log kob/g olarak, toplam termofilik laktik asit bakterisi sayısını ise olgunlaşmanın 1. gününde 9,2 log kob/g, olgunlaşmanın 90. gününde ise 8,96 log kob/g olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 5 farklı bölgeden toplanan peynirinin üreme sayıları MRS agarda ortalama 7,6 log kob/g, M17 agarda ise 8,62 log kob/g olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen üreme sayıları Şen (1991) ve Özdemir ve ark., (2004) yaptığı çalışma sonuçlarına göre yüksek, Bulut (2006) çalışması ile uyumludur. Çalışmamızda M17 besiyerinde gelişen mikroorganizma sayısının, diğer besiyerlerinde gelişenlerden yaklaşık 1 log seviyesinde daha yüksek olduğu görüldü. Bu durum aslında baskın florada kokların hakimiyetini göstermektedir. Ancak bu besiyerinde enterokoklarında üreyebildikleri ve bu şekilde sayısal artışa katkı sağladıkları göz önünde bulundurulması gereken bir husustur. Çalışmamızda peynirlerin toplandığı 5 farklı ilçe arasında, besiyelerinde üreme miktarları bakımından anlamlı bir fark bulunamaması ($p>0,05$); süt hayvanı, üretim tekniği ve iklimin belirgin bir etkisinin olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Peynir salamuralarında tuza dirençli şekilde canlılığını koruyan laktik asit bakterileri ve mayaların, peynirin dış yüzeyinde biyofilm tabakası oluşturmaları ve peynirin ekosistemi içerisinde gelişmelerini sürdürerek tat ve aromaya katkı sağladıkları belirtilmektedir (Montel ve ark., 2014). Hatta bu sebeple son zamanlarda eski peynir salamuralarının, yeni peynir salamuralarına ilave edilerek kullanılmaları da yaygınlaşmaktadır (İrkin, 2017). Çalışmamızda peynirin iç (merkez) kısımlarında laktobasillerin ve enterokokların, peynirin dış (kabuk) kısmına kıyasla sayıca fazla olmasının nedeni bu durumla açıklanabilir. Ancak çalışmamızda peynirlerin iç kısmındaki tuz oranıyla dış kısımdaki tuz oranları arasında belirgin farklılık bulunmamıştır. Üreticiler tuzlu peynirlerin fazla tuzunun giderilmesi için paketlemeden evvel bir müddet normal su içinde bekletebilmektedir. Özellikle pazarlanma aşamasındaki ürünlerin kabuk kısmında tuz oranının iç kısımla benzerlik göstermesi buna bağlı olabilir. Kabuk ve iç kısımda mikroorganizmaların üreme dinamikleri incelendiğinde peynirin iç (merkez) kısmında laktobasil ve enterokokların 1 log ve daha üstü oranlarda çoğaldıkları bu durumun özellikle laktobasiller için daha bariz olduğu görülmektedir. Streptokok sayısında ise böyle bir farklılık söz konusu değildir. İç kısımda % LA değerinin nispeten daha yüksek olması da yüksek oranda bulunan bu mikroorganizma sayılarıyla açıklanabilir. Mihaliç peynirinin özellikle iç kısmında daha yoğun bulunan laktobasil ve enterokoklar bu kısımlarda aroma ve lezzetin daha yüksek oranda şekillenmesinde öncü rol oynarlar. Yine bu mikroorganizmalar ve özellikle heterofermentatif niteliğe sahip olan *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* iç kısımdaki gözenek oluşumundan da sorumlu olabilecek mikroorganizmalardır. Üretimi esnasında haşlama işlemine maruz kalan Mihaliç peynirinde propiyonik asit bakterilerinin üremesi için uygun şartların şekilleneceği düşünülse de, çalışmamızda bu grup mikroorganizmalar izole edilememiştir.

Peynir ortamında iyi gelişebilen *Ent. faecium* düşük pH'ya dayanıklı ve dış faktörleri yüksek seviyede tolere edebildiği bildirilmiştir (Franz, Holzapfel, & Stiles, 1999). Sanchez, Palop, & Ballesteros (2000) bir çeşit patlıcan turşusu olan Almagro'dan izole ettikleri *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis* ve *Lb. fermentum* türlerinin % 4 tuz konsantrasyonunda geliştiğini, % 6,5 tuz konsantrasyonunda belirli oranlarda bütün türlerde gelişme görülebildiğini, % 8 tuz oranında ise *Lb.*

fermentum 'un gelişemediği ancak diğer türlerin sınırlı da olsa gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir. Peynirdeki tuz konsantrasyonunun; ürünün yapısı, pH değeri ve nem miktarına uygun olması önem taşımaktadır. Tuzun gıdada bulunan su içerisinde çözünmesi ile birlikte su aktivitesi düşmekte ve mikroorganizma inhibisyonu oluşmaktadır (İrkin, 2017). Çalışmamızda *Lactobacillus* spp. ve *Enterococcus* spp. sayısının peynirin kabuk örneklerinde daha düşük tespit edilmesi, kabuktaki tuz oranı ve buna bağlı olarak düşük a_w değeri ile kuru maddede artan yağ oranından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bove ve ark., 2012; Koch ve ark., 2010).

Mihaliç peynirleri ile bugüne kadar yapılmış çalışmaların daha ziyade kimyasal özelliklerini belirleme, patojen bakteri arama çalışmaları ve kültür denemeleri ile sınırlı kalması ve olgunlaşmayı sağlayan floraya ilişkin yeterli ve kapsamlı çalışma olmaması kıyas imkanını sınırlandırmaktadır.

Ertürkmen, & Öner (2015), Isparta yöresinden temin ettiği çiğ inek sütünden kültür kullanmadan 7 adet beyaz peynir üretmiştir. Bu örneklerden 77 adet laktik asit bakterisi izole edip, biyokimyasal yöntemlerle ve Gram-pozitif ID test kiti ile tanımlama yapmışlardır. Çalışmalarının sonucunda tanımlanan laktik asit bakterilerinin 30 adeti *Lactobacillus* spp., 25 adeti *Lactococcus* spp., 22 adetini ise *Enterococcus* spp. olarak belirtmişlerdir. Araştırmacılar test ettikleri peynirde hakim floranın *Lactobacillus* spp. ve *Lactococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. grubu laktik asit bakterilerince oluşturulduğu sonucuna varmışlardır. Yaptığımız çalışmada baskın floranın streptokoklar ile birlikte, laktobasil ve kısmen enterokoklardan oluştuğu sonucu çıkmıştır. Birçok peynirin yapısında yaygın olarak yer alan laktokokların sınırlı olarak floraya katkı sağladığı sonucu ortaya çıkmıştır. Turgut ve ark., (2012b) Karın Kaymağı peynirinden izole edilen 107 adet izolatın API 50 CHL kiti ile tanımlamasını yapmışlardır. Tanımlanan 82 adet laktobasilin % 47,56'sının *Lb. plantarum* tip 1 ve tip 2, % 21,9'unun *Lb. brevis* tip 1 ve tip 3, % 10,97'nin *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, % 9,75'nin *Lb. acidophilus* tip 3 ve % 2,43'ünün ise *Lb. fermentum* olduğunu bildirilmiştir. Tanımlanan izolatlardan *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* tip 2'nin ise 25 adet ile floranın % 24,4'ünü oluşturduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, bu çalışmadan farklı olarak lökonostok türlerine rastlanmamıştır. Ayrıca çalışmamızda tür bazında laktobasillerden *Lb. acidophilus* bulunmazken, *Lb. paracesi/casei/rhamnosus* 'un (% 41,8) ve *Lb. fermentum* 'un

(% 36,6) MRS agardan en fazla izole edilen türler olduğu tespit edilmiştir. Hakim mikrobiyotanın *Lactobacillus* spp. olarak rapor edildiği çalışmalardan Bostancı (2019), Afyonkarahisar ilinde satışa sunulan paketsiz peynirlerden izole ettiği laktik asit bakterilerini 16S rDNA PZR analizi ile tanımlamıştır. İzolatların 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, peynir örneklerinden en çok *Lactobacillus* cinsine ait türler tanımlanmış olup bunlar arasında; *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus* yer almaktadır. Bu çalışmadan alınan sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Buna ilave olarak, çalışmamızda *Lb. delbrueckii*, *Lb. parabuchneri* ve *Lb. brevis* türleri de tanımlanan laktobasil türleri arasında bulunmaktadır. Ghahremani, Mardani, & Rezapour, (2015) peynir örnekleriyle yapıları çalışmada laktik asit bakterilerinin izolasyonunu gerçekleştirmiş, baskın flora olarak *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerini tanımlamışlardır. Yine baskın floranın *Lactobacillus* spp. olduğu Fas'a ait geleneksel bir peynir türü Moroccan peyniri ile çalışan Ouadghiri ve ark., (2005) tanımlanan laktik asit bakterilerinin % 34'ünü *Lactobacillus* spp., % 27'sini *Lactococcus* spp., % 27'sini *Leuconostoc* spp. ve % 10'unu *Enterococcus* spp.'nin oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Turgut ve ark., (2012a) Kars yöresinin geleneksel ürünlerinden olan Gravyer peyniri ile yaptıkları çalışmada 120 adet laktobasil suşu izole etmişlerdir. API 50 CHL test kitleri ile yaptıkları tanımlama sonucunda; % 25 *Lb. brevis*, % 18,3 *P. pentosaceus*, % 14,1 *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, % 13,3 *Lb. fermentum*, % 12,5 *L. lactis* ssp. *lactis*, % 7,5 *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, % 5 *Lb. plantarum* ve (% 4,16) *Lb. rhamnosus* olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda bu peyniri oluşturan mikrobiyotada laktobasillerin baskın tür olduğunu belirtmişlerdir. Laktobasiller genellikle çiğ sütte bulunurlar ve buna bağlı olarak çiğ süttten üretilen peynirlerde laktobasillerin bulunması doğaldır. *Lb. casei* ssp. *casei*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. curvatus* ve *Lb. pentosus/plantarum* suşlarının daha ziyade hayvan ve çiftlik orijinli olabileceği bildirilmiştir (Coeuret, Dubernet, Bernardeau, Gueguen, & Vernoux, 2003). Terzic-Vidojevic, Vukasinovic, Veljovic, Ostojic, & Topisirovic (2007) Sırbistan'a ait yarı-sert geleneksel bir peynir olan Zlata peynirinin mikroflorasını inceledikleri çalışmada baskın cins olarak laktobasiller yer almıştır. API 50 CH sistemi ile yapılan tanımlamada laktik asit bakteri florasını % 53,9 *Lactobacillus* (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei*), % 35,9 *Enterococcus*

(*Ent. faecium*, *Ent. faecalis*), % 9,3 *Lactococcus* (*L. lactis* ssp. *lactis*) olarak belirlemişlerdir.

Ülkemize özgü farklı yörelerde üretilen değişik peynirin baskın florasında farklı farklı mikroorganizmaların bulunduğu görülmektedir. Peynir üretim aşamalarında uygulanan farklılıklar bu değişikliklere sebebiyet vermektedir. Tulum peynirlerinde *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (Öner, & Aloğlu, 2004), *Lb. casei* ssp. *casei* ve *Lb. plantarum* (Öksüztepe, Patır, & Çalıcıoğlu, 2005) baskın türler bulunurken, Kars ilinde üretilen bazı mahalli peynirlerde *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum* ve *Lb. plantarum* baskın olarak izole edilmiştir (Turgut ve ark., 2012a; Turgut ve ark., 2012b).

Lb. paracasei ssp. *paracasei* türü dünyada üretilen birçok peynir çeşidinde yer alan bir mikroorganizma olarak bulunmaktadır (Antonsson, Molin, & Ardö, 2003; Gürsoy, & Kımık, 2006; Nikolic ve ark., 2008; Willimas, & Banks, 1997; Zarate, Belda, Pérez, & Cardell, 1997). Peynirlerin pH değeri, tuz içeriği ve redoks potansiyeli *Lb. casei* grubunda yer alan mikroorganizmaların çoğunun gelişimine uygundur. Bu nedenle sayıları < 10 kob/g düzeyinden 10^7 - 10^8 kob/g'a kadar ulaşabilir. *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* suşunun aminotransferaz aktivitesinin peynirlerde bazı aroma aktif bileşiklerin oluşumundan sorumlu olduğu ve dallanmış zincirli aminoasitleri (lösin, izolösin ve valin) degradasyona uğratarak aroma bileşikleri oluşmasında rol aldığı bildirilmektedir (Hansen, Houlberg, & Ardö, 2001). *Lb. casei* grubu peynirde sitrat, laktat ve aminoasitler gibi diğer substratlardan yararlanarak olgunlaşmayı etkileyen ürünler oluştururlar. Ayrıca *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei* türleri ekzopolisakkarit, bakteriyosin ya da aroma maddeleri oluşturmaları nedeniyle fermente ürünlerin üretiminde kullanılan starter kültür kombinasyonlarında yer alırlar. Genel olarak sütte yavaş bir asitlik gelişimini sağladıkları için, probiyotik fermente ürünlerde de kullanılabilirler. *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* ya non-starter (kontaminant) laktik asit bakterileri olarak ya da yardımcı kültür halinde peynirde bulunabilirler. Yaptığımız çalışmada tuzlu peynir örneklerine kıyasla, az tuzlu peynirlerde *Lb. paracasei* daha sık bulunmuştur. Peynirin tuz oranı, *Lb. casei* gelişimi üzerinde suşlara bağlı olarak etki gösterir. Bu gruptaki birçok suş % 4 - 6 nem-tuz oranından etkilenmez, ancak bu oran diğer non-starter laktik asit bakteri türlerinin gelişimini önemli ölçüde yavaşlatır. Yaptığımız tez çalışmasında *Lb. paracasei*' den sonra MRS agarda gelişen baskın tür *Lb. fermentum* (% 36,6) olarak tespit edilmiştir. Turgut ve

ark., (2012b) Karın Kaymağı peynirleriyle, Bostancı (2019), Afyonkarahisar ilinde satışa sunulan paketsiz peynirlerle, Randazzo, Torriani, Akkermans, De Vos, & Vaughan (2002) Sicilya yöresel peyniri Ragusano ile yaptığı çalışmada, Candia ve ark., (2007) Mozzarella peyniri ile yaptıkları çalışmalarda *Lb. fermentum*'u florada tespit etmişlerdir. *Lb. reuteri* grubunda yer alan *Lb. fermentum* heterofermantatiftir ve bazı peynir çeşitlerinde (Comté, Ragusano) Non-Starter laktik asit bakteri popülasyonu olarak bulunurlar. Ayrıca sert bir pasta fileta peyniri Caciocavallo Silano'nun peynir altı suyu kültürlerinde ve Parmigiano Reggiano peynirlerinde en sık bulunan laktobasil türlerindendir (Elkhider, 2017). Fermantasyonun son aşamalarına kadar mikroflorada hakim tür olarak yaşamını sürdürülebilen *Lb. fermentum*'un spesifik aroma bileşiklerinin oluşumunda ve yüksek lipolitik aktivitesi ile de kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (Pulido ve ark., 2007).

Enterokoklar özellikle çiğ süttten yapılan peynirlerde olmak üzere farklı türde peynirlerin florasında bulunan mikroorganizmalardır. Peynirlerin olgunlaşmasında zamana bağlı olarak sayısal artışları ile aroma ve lezzet oluşumuna hatırı sayılır şekilde katkı sağlamaları bu mikroorganizmaların starter kültür olarak kullanım tekliflerini gündeme getirir de, birçok gıda maddesinde bulaşma indikatörü olmaları, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında ve özellikle de hastane enfeksiyonlarında kötü nam salmaları onların starter olarak kullanımlarının önünde engel etmen olmuştur. Bu mikroorganizmalar bazı peynirlerde erken şişmeden sorumlu tutulmaktadırlar (Giraffa, 2003). Bununla birlikte, Mihaliç peynirinde iç kısımda şekillenen gözeneklerin oluşumunda daha önce bahsedildiği gibi florada baskın bulunan heterofermantatif özelliğe sahip *Lb. paracasei* ve *Lb. fermentum* gibi mikroorganizmalar ön plana çıksa da enterokokların etkileri de göz ardı edilmemelidir.

Çiğ süttten geleneksel tekniklere üretilen peynirlerin üretim ve olgunlaşma aşamalarında yetersiz hijyen koşulları sebebiyle *Enterococcus* cinsi bakterilerin sayılarındaki artış, çiğ süte direkt fekal kaynaklı bir bulaşmanın olduğunun veya üretim prosesi esnasında ekipmanlardan endirekt bir kontaminasyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (Giraffa, 2003). Geleneksel peynirlerde sık rastlanma nedenlerinin biri de enterokokların yüksek sıcaklık, tuz ve aside toleranslı olmalarından ileri geldiği düşünülmektedir. Ayrıca enterokoklar oldukça geniş bir pH aralığında çoğalabilen, düşük O/R potansiyelindeki ortamlarda çok iyi gelişen, % 6.5

tuz konsantrasyonunda üreyebilen, ısıtma, kurutma, dondurma, temizlik ve dezenfeksiyon gibi birçok dış faktöre karşı oldukça dayanıklı olan mikroorganizmalardır (Kaleli, & Durlu-Özkaya, 2000). Yapılan çalışmalara paralel, bizim çalışmamızda da KAA agarda en baskın *Enterococcus* türü, % 41,6 oranla *Ent. faecium* olarak belirlenmiş, diğer türler *Ent. faecalis* (%38,5), *Ent. durans* (% 12,5), *Enterococcus* spp. (% 6,25) ve *Ent. raffinosus* (% 1,04) olarak tespit edilmiştir. Geleneksel peynirlerde *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* türleri asetaldehit, etanol, diasetil ve aseton gibi uçucu bileşikler üreterek peynirlerde aromanın gelişmesine önemli katkıda bulunsalar da fırsatçı patojen olmaları sebebiyle starter kültür kombinasyonlarında yer almaları için tüm patojenite testlerinin yapılmasını gerektirmektedir (Akoğlu ve ark., 2016; Kırmacı, 2010; Turhan, & Öner, 2014).

Ülkemizdeki değişik peynirlerde bu grup mikroorganizmaların varlığına ilişkin çalışmalar incelendiğinde, Bolu yöresine ait geleneksel bir peynir olan Mengen peyniri ile çalışan Akoğlu ve ark., (2016) 50 peynir numunesinden 117 adet laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Elde edilen bakterilerin % 44,5'i *Enterococcus* spp., % 29,9'u *Lactobacillus* spp., % 25,6'sı *Lactococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada enterokokların % 60'ının *Ent. faecium*, % 27'sinin *Ent. faecalis*, % 13'ünün ise *Ent. durans* olduğu belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada Kırmacı ve ark., (2016) Şanlıurfa yöresine özgü çiğ süttten üretilen 20 adet peynirden elde edilen 143 izolatın 16S rDNA ile tanımlandığı ve baskın floranın % 48,95'inin *Enterococcus* spp.'den oluştuğu bildirilmiştir. Durlu-Özkaya (2001) ülkemizde üretilen beyaz peynirlerle ilgili yaptığı çalışmasında, baskın floranın % 63,52 oranla *Enterococcus* (*Ent. durans*, *Ent. faecium*) türlerine ait olduğunu bildirmiştir. Korucu (2012) Elazığ yöresinin mahalli peynirlerinden olan Tomas peynirleriyle ilgili yaptığı çalışmada 20 adet çubuk ve 25 adet kok şeklinde laktik asit bakterisi izole etmiştir. Bu izolatların API test kitleri ile tanımlaması sonucunda baskın tür (16 adet) *Ent. faecium* olarak belirlenmiştir. Kanak, & Yılmaz (2018) Sakarya'da üretilen geleneksel peynirlerden laktik asit bakterileri izole edilip, MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmışlardır. Tür düzeyinde yapılan tanımlanma sonucu % 25 oranında *Ent. faecium*, % 31 oranında *Ent. faecalis*, % 38 oranında *Leu. mesenteroides*, % 6 oranında *Lb. paracasei* tespit edilmiş, sonucunda baskın olan türlerin enterokok türleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Yurt dışında yapılan değişik çalışmalarda da bu mikroorganizmaların yaygın olarak izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Freitas, Pais, Malcata, & Hogg (1996) Picante da Beira Baixa peynirinde, Suzzi ve ark., (2000) Semicotto Caprino peynirinde, Jurkovic ve ark., (2006) Bryndza peynirinde, Centeno, Menendez, & Rodriguez-Otero, (1996) çiğ süttten yapılan ve geleneksel bir peynir türü olan İspanyol Cebreiro peynirinde, *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* ve *Ent. durans* türlerinin baskın florada yer aldığını rapor etmişlerdir. İtalya'nın Sicilya bölgesinde yöresel olarak üretilen ve sert bir peynir türü olan Pecorino Siciliano peynirinde laktik asit bakteri florasının % 47,2'sinin *Enterococcus* spp., % 32,4'ünün *Lactobacillus* spp., % 12,6'sının *Lactococcus* spp.'den oluştuğu bildirilmiştir (Vernile ve ark., 2008).

Streptokoklar çevresel stres faktörlerine (tuz, pH, ısı) dirençli olmalarına rağmen, *Str. thermophilus* suşları arasında bu direnç farklılık göstermektedir (Parente Rota, & Ricciardi, 2014). Aynı şekilde az sayıda izole edilmiş olsa da peynirlerin iç kısımlarından izole edilen *Str. thermophilus*'un daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda *Streptococcus* türleri arasında asıl dikkati çeken M17 agarda gelişen *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* (% 32,05) ve *Str. infantarius* ssp. *infantarius* (%12,8) tanımlanmasıdır. Bu türlerin Mihaliç peynirlerden izole edildiğini ortaya koyan bir çalışma veya literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu mikroorganizmalar taksonomide *Str.bovis* / *Str. equinus* complex (SBSEC) içinde sınıflandırılmış 7 tür (*Str. gallolyticus* ssp. *gallolyticus*, *Str. gallolyticus* ssp. *pasteurianus*, *Str. gallolyticus* ssp. *macedonius*, *Str. infantarius* ssp. *infantarius*, *Str. infantarius* ssp. *coli* [*Str. lutetiensis*], *Str. galactolyticus* ve *Str. equines*) içinde yer alır. Lancefield grup D antijeni taşıması özelliği ile enterokoklara benzer olsa da fizyolojik özellikleri bakımından streptokoklarla daha yakındır. İnsan kaynaklı *Str. bovis* suşları tip1 ve tip 2 olarak ayrılır. *Str. bovis* Tip 1 biyotipi manitolü fermente ederek gluklan oluşturur. *Str. bovis* Tip 2 biyotipi ise manitolü fermente edemez (Coykendall, 1989). Bir insan patojeni olarak kabul edilen *Str.bovis*, endokardit, sepsis, gastroenterit, menenjit, endoftalmitis ve gastrointestinal sistem kanseri gibi hastalıklarla ilişkilendirilir (Alozie ve ark., 2015). Ruoff, Miller, Garner, Ferraro, & Calderwood (1989) yaptıkları çalışmada *Str. bovis* Tip 1 biyotipini kolon kanseri ile ilişkilendirmişlerdir. *Str.bovis* normalde sığır ve koyun gibi hayvanların rumenlerinde bulunan laktik asit bakterileridir. *Str. gallolyticus* ssp. *macedonius* ve *Str. infantarius* ssp. *infantarius* özellikle spontan

fermente gıda ürünlerin mikrobiyotasında bulunur (Corredoira, Alonso, Coira, & Varela, 2008).

Abdelgadir, Nielsen, Hamad, & Jakobsen (2008) Sudan'a ait deve sütünden üretilen Gariss adlı fermente ürün ile yaptıkları çalışmada florada baskın tür olarak *Str. infantarius* ssp. *infantarius* ve *Lb. fermentum*'u rapor etmişlerdir. Tanımladıkları 13 adet *Str. infantarius* ssp. *infantarius* suşunun housekeeping gen (rpoB, sodA, gtf) bölgelerini incelemişler ve virülens belirleyicisi gtfyi (glukoziltransferaz) kodlayan geni, 10'un da tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* ise ilk olarak Yunan Kasseri peynirinde izole edildi daha sonrasında Fransa, İtalya, Slovakya gibi ülkelerde geleneksel peynirlerin (Salers ve Byrnda peynirleri) mikrobiyotasında tespit edildiği rapor edilmiştir (Callon ve ark., 2004; Chebeňová-Turcovská, Ženišová, Kuchta, Pangallo, & Brežná, 2011; Franciosi, Settanni, Cavazza, & Poznanski, 2009; Lombardi ve ark., 2004; Tsakalidou ve ark., 1998). Bu türlerde bulunan *Str. thermophilus* benzeri lacS and lacZ genleri süt ürünlerine adaptasyonu sağlar (Jans ve ark., 2013; Schlegel, Grimont, Ageron, Grimont, & Bouvet, 2003; Tsakalidou ve ark., 1998). Özellikle fermantasyonda bu türlerden *Str. thermophilus*'a benzer aktivite gösterenler olsa da SBSEC grubu içinde yer almasından dolayı Mihaliç peynirinde bulunmaları halk sağlığı açısından önemli risk oluşturabilir.

Tüketicilerin peynir tercihini peynirin tat, aroma ve yapı gibi özellikleri belirlemektedir. Bu özellikler çiğ sütün kimyasal kalitesi, mikrobiyal florası, enzim aktivitesi ve peynirin depolama koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Wilkinson, & Kilcawley, 2005). Çiğ sütün kimyasal kalitesi, mikrobiyal florası ve olgunlaşma periyodu boyunca şekillenen metabolik reaksiyonlar (proteoliz, lipoliz ve organik asitlerin oluşumu) peynirin tat ve aromasını geliştirmektedir. Bu metabolik reaksiyonlar sonucunda; kısa zincirli yağ asitleri, asetaldehit, diasetil ve serbest amino asit gibi uçucu aroma bileşikleri oluşmaktadır (Awad, Ahmed, & El Soda, 2007; Singh Drake, & Cadwallader, 2003). Çiğ sütlerin mikroflorasındaki değişkenlik peynirin olgunlaşma periyodunda aroma bileşiklerinin konsantrasyonunda dengesizliklere ve yapı kusurlarının oluşumuna neden olmaktadır (Youssef ve ark., 2019). Çalışmamızda en uygun laktik floranın identifikasyonu amacı ile aroma ve yapı kusurları da dikkate alınarak 53 örnekten 15'inin kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tuzlu ve az tuzlu peynir örnekleri panelistler tarafından duyu nitelikleri 5,5 (ne iyi

ne kötü) düzeyinin üzerinde puanlanmıştır. Çalışmanın bu kısmında önemli verilerden biri duyuşal olarak üstün seçilen bu peynirlerden izole edilen *L. lactis* yaygınlığının (% 43.7) M17 agarda üreyen diğer türlerden yüksek çıkmasıdır. Bu oran daha önceki 53 adet test edilen peynirde % 8,97 olarak belirlenmiştir. Bu grupta elde edilen farklılık laktokokların bu peynirlerde aroma ve diğer olumlu duyuşal niteliklere katkı sağlamasındaki rolü ile ilişkili olabilir. Mihaliç peynirinin kimyasal kompozisyonu duyuşal niteliklerin gelişiminde etkili diğer faktörlerden biridir. Bu kimyasal kalite özellikleri kuru madde, protein, yağ, pH, titrasyon asitliği ve tuz oranı gibi parametrelerdir. Mihaliç peynirinin kimyasal kompozisyonu üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde Aday, & Karagül-Yüceer, (2014) Mihaliç peynir örneklerinde kuru madde, yağ ve protein oranlarını sırasıyla 56,7- 64,1; 25,2- 33; 18,6- 24,6 aralığında tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada pH, % laktik asit ve tuz oranlarının ise sırasıyla 5,09- 5,99; 0,37- 1,04; 3,27- 8,18 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Yine başka bir çalışmada Özcan, & Kurdal (2012) Mihaliç peynir örneklerinde kuru madde, yağ ve protein oranlarının sırasıyla 64,13 ; 24,58; 23,15 pH, % laktik asit ve tuz oranlarının ise sırasıyla 5,86; 0,53; 8,7 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında benzer bulguların olduğu ancak kimyasal kompozisyonda var olan birkaç farklılığın peynirlerin yapılışı, süt çeşidi, olgunluk derecesi, işlendiği sütün niteliği gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermesi ile açıklanabilir (Erceyes, Yıldırım, & Yıldırım, 2018).

Yaptığımız tez çalışmasında API 50 CHL-20 STREP, MALDI-TOF MS, 16S rDNA dizi analizi teknikleri kullanıldı. Böylelikle çalışmada izole edilen suşların tanımlanmasına yönelik güvenilirlik artırıldı. Literatürde laktik asit bakterilerinin tanımlamasında MALDI-TOF MS, 16S rDNA dizi analizinin beraber kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Anderson ve ark., 2014; Dec, Puchalski, Urban-Chmiel, & Wernicki, 2016; Dec, Urban-Chmiel, Gnat, Puchalski, & Wernicki, 2014; Dusková, Šedo, Kšicová, Zdráhal, & Karpíšková, 2012; Mahajan ve ark., 2017). Bu çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda biyokimsal tanımlama metodu API 50 CHL-20 STREP test kitleri de kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında API test kitleri uzun yıllardır ve yaygın şekilde kullanılmakta, iyi sonuç alınmaktadır (Özlü, 2015). Çalışmamızda API 50 CHL-20 STREP ile elde edilen sonuçlar ile 16S rDNA dizi analizi sonuçları laktobasiller ve enterokoklar için

paralellik gösterse de bazı farklılıkların da bulunduğu gözlenmiştir. API 50 CHL ile *Lb. delbrueckii* olarak tür seviyesinde tanımlanan 2 adet suş dizi analizi ile alt tür seviyesinde *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. Aynı şekilde API ile *Lb. buchneri* olarak tanımlan 2 adet suş dizi analiziyle de *Lb. parabuchneri* olarak tanımlanmıştır. Streptokokların karşılaştırılmasından da bazı farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir. MALDI-TOF ile *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* olarak tanımlanan 5 adet suş, API 20 Strep test kitleri *Str. gallolyticus* ssp. *pasteurianus* olarak tanımlanmıştır. Bu durumun API test kitlerinin veritabanında *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* 'un yer almamasından kaynaklanmaktadır. *Str. infantarius* ssp. *infantarius* olarak tanımlanan 3 adet suşun, API ile yapılan tanımlamada *Str. infantarius* ssp. *infantarius* olarak tanımlandığı ancak tanımlama yüzdelерinin, % 85'in altında kaldığı görülmüştür. Ayrıca API 20 Strep test kitleri bu suşlar için yapılan tanımlamada, ikinci bir olası takson olan *Str. lutetiensis* 'i de vermiştir. Ouadghiri ve ark., (2005) tarafından ve yürütölen çalışmada Fas yumuşak beyaz peynirinden izole edilen 164 izolatın API 50 CHL kiti kullanılarak tanımlanan 34 izolatın, sadece 22 (% 64,70) tanesinin SDS-PAGE ve REP-PCR ile doğrulaması yapılmıştır. Özlü, (2015) yaptığı çalışmada API 50 CHL kiti ile fenotipik olarak tanımladığı 77 izolatın moleküler olarak ancak 52 (% 67,53) tanesi doğrulanabilmiştir. Bu bilgiler ışığında fenotipik yöntemlerin her zaman hata payı içerebileceğini, elde edilen sonuçların moleküler yöntemlere desteklenmesi gerektiğini göstermektedir. MALDI-TOF -MS ile alınan sonuçlar 16S rDNA dizi analiz sonuçları ile örtüşse de bazı farklılıklar görülmüştür. Örneğin MALDI-TOF MS ile *Lb. paracasei/casei/rhamnosus*, *Lb. pentosus/plantarum* olarak tanımlanan ancak ayrımı yapılamayan mikroorganizmalar 16S rDNA dizi analiziyle *Lb. paracasei* ve *Lb. plantarum* olarak belirlenmiştir. Ayrıca MALDI-TOF MS'te *Lb. delbrueckii* olarak tür seviyesinde tanımlanan suşlar dizi analizi ile alt tür seviyesinde *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS ile *Str. infantarius* ssp. *infantarius* olarak tanımlanan 10 adet suşun, 16S rDNA dizi analizinde 7 adeti *Str. lutetiensis*, 3 adeti ise *Str. thermophilus* olarak tanımlanmıştır. Kacaniova ve ark., (2017) süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerini MALDI-TOF MS ile tanımlamışlardır. Yöntemin hızlı sonuç, kullanım kolaylığı ve test başına düşen maliyet gibi avantajları olduğu ancak yöntemin veritabanına bağımlılık, destekleyici programlara ihtiyacı, filogenetik olarak yakın

suşların ayırımının yapılamaması gibi bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. 16S rDNA dizi analizi ile MALDI-TOF MS'e göre tür seviyesinde daha net sonuçlar edilmiştir. Ancak 16S rDNA dizi analizi ile *Str. lutetiensis* olarak tanımlanan 7 suşun blast analizleri incelendiğinde *Str. infantarius* HDP90056 suşuna sırası ile % 99,9, % 99,8, % 99,7, % 99,8, % 99,7, % 99,9, % 99,9 oranında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere kullanılan bu teknikler *infantarius* veya *lutetiensis* tür/alttürlerini ayırt etmek için yeterli değildir. Bu iki mikroorganizmanın ayırımında *sodA* geni dizi analizinin de belirtilen bu tekniklere ilave olarak yapılması tanımlamada gereklidir (Almuzara ve ark., 2013). Sonuç olarak laktik asit bakterilerinin cins ve/veya tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan metotlar aynı cins veya türde her zaman benzerlik göstermeyebilir. Peynirin doğal mikrobiyotasında mevcut suşlar arasında yatay gen transferleri ile lineer plazmidlerin oluşumu tanımlamaların net ve hassas sonuçlar vermemesine neden olabilir. Bu durum bazı atipik suşların diğer türlerle karıştırılmasına yol açabilir (Özlü, 2015). Bu nedenle yapılacak çalışmalarda doğruluğunu artırmak için farklı tekniklerin bir arada kullanılması, daha kesin ve hassas sonuçlar elde etmek için ise ileri moleküler tanımlama yöntemlerinin tercih edilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

5.1. Genel Değerlendirme ve Sonuçlar

Yapılan bu tez çalışması sonuçları genel hatlarıyla şu şekilde sıralanabilir:

1. Marmara bölgesinin farklı yörelerinden toplanan bu peynirin oldukça geniş bir mikrobiyotaya sahip olduğu gözlemlendi.
2. Bu peyniri oluşturan mikrobiyotada baskın florayı streptokok, laktobasil ve enterokok cinslerine ait türlerin bulunduğu tespit edildi.
3. Tür bazında laktobasillerden *Lb. paracasei* ve *Lb. fermentum* baskın olarak bulunmaktadır. Heterofermantatif özelliğe sahip bu mikroorganizmalar Mihaliç peynirinde tipik gözenek oluşumunda birincil rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu peynirin olgunlaşmasında gelişebilme ortamı bulamayan ve bazı peynirlerde büyük gözenek oluşturan propiyonik asit bakterileri ile daha küçük gözenek oluşturan lökonostokların izole edilmemesi bu mikroorganizmaların gözenek oluşumundaki etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Buna ilaveten yine gaz oluşturan enterokokların da gözenek oluşumundan sorumlu olabilecekleri öngörüldü.

4. Kendine has organoleptik özellikleri olan bu özel peynirin daha detaylı incelenmesi sonucunda tuzlu/az tuzlu peynirler ile peynirlerin kabuk (dış) ve iç (merkez) kısımlarında mikrobiyota da baskın türlerin bulunuşu açısından farklılıklar olduğu tespit edildi.
5. MALDI-TOF MS'in laktik asit bakterilerini tanımlamada bazı avantajlarının olduğu, ancak birbirlerine yakın alttürlerin (*Lb. paracasei/casei/rhamnosus*) tanımlanmasında özellikle IVD veritabanının yeterli olmadığı belirlendi.
6. Yaptığımız tez çalışmasında farklı tekniklerin (API 50 CHL-20 STREP, MALDI-TOF MS, 16S rDNA dizi analizi) kullanması ile sonuçların doğruluğunun arttığı, farklı metotların birlikte kullanılmasının birbirinin mütemmimi olduğu görüldü.
7. 16S rDNA gen analiz sonucuna göre bazı streptokok (MK752865, MK752872, MK752873) suşların daha kesin ayrımı için 16S rDNA dizi analiz verilerinin spesifik gen bölgesi analizleriyle desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.
8. Peynir mikrobiyotasında tespit edilen *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* ve *Str. infantarius* ssp. *infantarius*'un ülkemizde peynirlerden özellikle de Mihaliç peynirinden izole edildiğine dair literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu açıdan bizim çalışmamızda taksonomide (SBSEC) *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* grubu içinde sınıflandırılan bu mikroorganizmaların endokarditis, kolon kanseri ile ilişkilendirildiği düşünüldüğünde halk sağlığı açısından önemli bir risk faktörü olabileceği değerlendirildi.
9. Mikrobiyotada yer alan enterokokların peynirlerde aromanın gelişmesine önemli katkıda bulunduğu bilinse de fırsatçı patojen olmaları ve antibiyotik dirençlilikleri sebebiyle starter kültür kombinasyonlarında yer almaları şüpheyile karşılandıkları değerlendirildi.
10. İzole edilen suşlar ile Mihaliç Peynir florasına özgü bir veri tabanı oluşturuldu. Elde edilen suşlar “Süt Ürünleri Gen Bankası” bünyesinde kayıt ve muhafaza altına alınarak ileride çalışmalar ve starter olarak kullanımlarına ilişkin ön hazırlık yapıldı.

6. KAYNAKLAR

- Abdelgadir, W., Nielsen, D., Hamad, S. & Jakobsen, M. (2008). A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 215-219. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.008>.
- Adams, M. R. & Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International journal of food microbiology*, 27(2-3), 263. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00067-t](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00067-t).
- Aday, S. (2010). *Mihaliç peynirinin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi*. [Yüksek lisans tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.
- Aday, S. & Karagul Yuceer, Y. (2014). Physicochemical and Sensory Properties of Mihalic Cheese. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2207-2227. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.790904>.
- Akoğlu, A. Yaman, H. Coşkun, H. & Sarı, K. (2016). Isolation, molecular identification and determination of some starter culter properties of lactic acid bacteria isolated from Mengen cheese. *Journal of Natural and Applied Sciences*. <https://doi.org/10.19113/sdufbed.11073>.
- Akyar, I. & Can, S. (2013). Salmonella Türlerinin Hızlı Tanısında Kromojenik Besiyeri İle Birlikte “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry” Yönteminin Phoenix Otomatize Sistemi ile Kıyaslanması. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 19 (2), 325-330. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.7822>.
- Almuzara, M., Bonofiglio, L., Cittadini, R., Ocampo, C. V., Montilla, A., Del Castillo, M., ... & Vay, C. (2013). Streptococcus lutetiensis Bacteremia. First Clindamycin Resistant Isolate Carrying lnuB Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-01774. XXX [doi:10.1128/JCM.01774-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01774-13).
- Alozie, A., Köller, K., Pose, L., Raftis, M., Steinhoff, G., Westphal, B., ... & Podbielski, A. (2015). Streptococcus bovis infectious endocarditis and occult gastrointestinal neoplasia: experience with 25 consecutive patients treated surgically. *Gut pathogens*, 7(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0074-0>.
- Altun, İ., & Akyüz, N. (1998). Kahramanmaraş Elbistan Bölgesinde Üretilen Kelle Peynirinin Bileşimi, Teknik ve Hijyenik Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. *V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Geleneksel Süt Ürünleri)*, 105-116.
- Anderson, A. C., Sanunu, M., Schneider, C., Clad, A., Karygianni, L., Hellwig, E. & Al-Ahmad, A. (2014). Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC microbiology*, 14(1), 312. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0312-5>

Anonim. (1987). Peynir İşletmeciliğinin Teknik ve Ekonomik Sorunları. Mihaliç Peyniri. Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları s: 32. 51.

Antonsson, M., Molin, G. & Ardö, Y. (2003). *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 159-169. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00536-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00536-6).

AOAC (1995/991.20) International Official Methods Official Methods of Analysis of AOAC International, (2001-6) / (1990) MD, U.S.A.

AOAC (1983.14) International Official Methods Official Methods of Analysis of AOAC International, Chloride in Cheese Potentiometric Method (1983.14) MD, U.S.A.

Arslan, S. (2017). *Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan Beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu*. [Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://earsiv.atauni.edu.tr/>.

Aşkar, M., Aslım, B., & Beyatlı, Y. (1999). Et ürünlerinden izole edilen *Pediococcus acidilactici* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. *Turk Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23(3), 467-474. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/133726>.

Awad, S., Ahmed, N. & El Soda, M. (2007). Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chemistry*, 104(3), 1192-1199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.043>.

Ayad, E. H., Verheul, A., De Jong, C., Wouters, J. T. & Smit, G. (1999). Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*, 9(10), 725-735. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00140-5).

Ayad, E. H., Verheul, A., Wouters, J. T. & Smit, G. (2000). Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*, 10(3), 169-179. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00041-8).

Bacus, J. N. & Brown, W. L. (1981). Use of Microbial Cultures-Meat-Products. *Food technology*, 35(1), 74.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5).

Bezekova, J. (2013). Phenotypic and genotypic identification of NSLAB from raw cow milk. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 46(2), 88-92. <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/93>.

Bostancı, B. (2019). *Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler İdentifikasyonu*. [Doktora tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>.

Botina, S. G., Tsygankov, Y. D. & Sukhodolets, V. V. (2006). Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing. *Russian Journal of Genetics*, 42(12), 1367-1379. <https://doi.org/10.1134/S1022795406120039>.

Bove, C.G., Angelis, M.D., Gatti, M., Calasso, M., Neviani, E., & Gobbetti, M. (2012). Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharp medium. *Proteomics*, 12(21), 3206-3218. <https://doi.org/10.1002/pmic.20120017>.

Bozoğlu, T. F., Özilgen, M. & Bakır, U. (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(9), 531-537. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90082-2).

Bracquart, P. (1981). An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. *Journal of Applied Bacteriology*, 51(2), 303-305. <https://doi.org/10.1111/j.13652672.1981.tb01246.x>.

Bulut, B. (2006). *Çiğ ve pastörize süttten işlenen Mihaliç peynirlerinin kimyasal bileşimi ve olgunlaşma sırasındaki mikrobiyal florasındaki değişimin belirlenmesi*. [Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr/>.

Bulut, Ç. (2003). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese* [Master's thesis, İzmir Institute of Technology] Erişim adresi: <http://openaccess.iyte.edu.tr/>.

Callon, C., Millet, L. & Montel, M. C. (2004). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *The Journal of dairy research*, 71(2), 231. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000159>.

Candia De, S., De Angelis, M., Dunlea, E., Minervini, F., McSweeney, P. L. H., Faccia, M. & Gobbetti, M. (2007). Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.062>.

Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3).

Centeno, J. A., Menéndez, S. & Rodríguez-Otero, J. L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International journal of food microbiology*, 33(2-3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01165-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01165-8).

Charlier, C., Cretenet, M., Even, S. & Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*, 131(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.032>.

Chebeňová-Turcovská, V., Ženišová, K., Kuchta, T., Pangallo, D. & Brežná, B. (2011). Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *International journal of food microbiology*, 150(1), 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.020>.

Chen, H. C., Wang, S. Y. & Chen, M. J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food microbiology*, 25(3), 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.003>.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83(4), 269-306. <https://doi.org/10.1051/lait:2003019>.

Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B. R. U. N. A., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., ... & Medina, M. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 409-421. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48170094/>.

Corredoira, J., Alonso, M. P., Coira, A. & Varela, J. (2008). Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/1) bacteremia and noncolonic cancer. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1570-1570. <https://doi.org/10.1128/JCM.00129-08>.

Coykendall, A. L. (1989). Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(3), 315-328. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.3.315>.

Çokal, Y., Dagdelen, A., Cenet, O. & Gunsen, U. (2012). Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. *Food Control*, 26(2), 337-340. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.058>.

Da Costa, P. M., Bica, A., Vaz-Pires, P. & Bernardo, F. (2010). Changes in antimicrobial resistance among faecal enterococci isolated from growing broilers prophylactically medicated with three commercial antimicrobials. *Preventive veterinary medicine*, 93(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.09.012>.

Daeschel, M. A., McKenney, M. C. & McDonald, L. C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food microbiology*, 7(2), 91-98. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(90\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0740-0020(90)90014-9).

Darılmaz, Ö.D. (2010). *Geleneksel Türk peynirlerinde probiyonik asit bakteri türlerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması*. [Doktora tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://docplayer.biz.tr/53276855>.

Dayıcı, R. (2000). *İnek, Koyun ve Keçi Sütleri Kullanılarak Yapılan Mihaliç Peynirlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma*. [Yüksek lisans tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr/>.

De Respini, S., Tonolla, M., Pranghofer, S., Petrini, L., Petrini, O. & Bosshard, P. P. (2013). Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Sabouraudia*, 51(5), 514-521. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.746476>.

Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R. & Wernicki, A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC microbiology*, 16(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0732-5>.

Dec, M., Urban-Chmiel, R., Gnat, S., Puchalski, A. & Wernicki, A. (2014). Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Research in microbiology*, 165(3), 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.02.003>.

Delcour, J., Ferain, T. & Hols, P. (2000). Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 11(5), 497-504. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00134-8).

Demirci, M. (1989). Taze Beyaz peynirlerimizin mineral madde miktarları ve enerji değerleri. *Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık*, 13(3b), 952-958. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/78030>.

Demirci, M., Şimşek, O. & Taşan, M. (1994). Ülkemizde Yapılan Muhtelif Tip Peynirler. *Her Yönüyle Peynir, Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları*, 125, 273-281.

Demirel, Y.N., & Gürler, Z. (2016). Günümüzde Doğal Floranın Önemi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR14 (2): s: 17-24. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702160202.pdf.

Dönmez, M., Kemal Seckin, A., Sagdic, O. & Simsek, B. (2005). Chemical characteristics, fatty acid compositions, conjugated linoleic acid contents and cholesterol levels of some traditional Turkish cheeses. *International journal of food sciences and nutrition*, 56(3),157,163.<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637480500131137>.

Durlu-Özkaya F (2001) *Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması*. [Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Dusková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z. & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International journal of food microbiology*, 159 (2), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029>.

ECCO info. (2019, 22 Eylül). European Culture Collections Organisation. Erişim adresi: <https://www.eccosite.org/>.

ECCO members. (2019, 22 Eylül). European Culture Collections Organisation. Erişim adresi: <https://www.eccosite.org/members/>.

Elkhider, I. E. A. (2017). *Effect of Adding Different Levels of Gum-Arabic on Physicochemical, Microbiological and Sensory Characteristics of Sudanese White Cheese during Storage* [Doctoral dissertation, Sudan University of Science & Technology]. Erişim adresi: <http://repository.sustech.edu/handle/123456789/18748>.

Eralp, M. (1974). *Peynir Teknolojisi*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 553, Ders Kitabı. Ankara s:178 s: 331.

Erceyes, Ö., Yıldırım, M., & Yıldırım, Z. (2018). Tulum Peynirinin Toplam Karbonil Madde İçeriği ile Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Nitelikleri. *Hayvan Bilimleri ve Ürünleri Dergisi*, 1(1),67,83. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jasp/issue/50914/663815>.

Ertürkmen, P. (2014). *Beyaz peynir üretimi için starter kültür izolasyonu ve bu kültürlerin peynirin özellikleri üzerine etkisi*. [Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Ertürkmen, P. & Öner, Z. (2015). Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 19 (3): 9-16. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sdufenbed/issue/20808/222304>.

EUROSTAT, (2020). Eurostat Milk and milk product statistics. European Commission https://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php?title=Milk_and_milk_product_statistics#Milk_products

Evrensel, SS., Yüksek, N., & Temelli, S. (2006). Bursa’da tüketime sunulan bazı gıdalarda *Yersinia enterocolitica*’nın varlığının araştırılması. *Gıda* 2006 31 (1): 59-63. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/gida/issue/6780/91301>.

Evrensel, SS., & Yıldız, İ. (1997). Bazı peynirlerimizin üretim teknolojileri. *Süt Teknoloji Dergisi* 1 (4): 26-32.

FAO, (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dairy Market Review. Dairy Market Review 2020. <http://www.fao.org/3/cb2322en/CB2322EN.pdf>.

Fguiri, I., Ziadi, M., Atigui, M., Ayeb, N., Arroum, S., Assadi, M. & Khorchani, T. (2016). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria strains from raw camel milk for potential use in the production of fermented Tunisian dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 103-113. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12226>.

Fontán, M. C. G., Lorenzo, J. M., Parada, A., Franco, I. & Carballo, J. (2007). Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*, 24(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.007>.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. & Manachini, P. L. (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20(4), 397-404. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00149-1).

Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12(4), 457-509. <https://doi.org/10.1080/87559/129609541091>.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. & Lynch, C. M. (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(2), 83. Erişim adresi: <https://search.proquest.com/openview/250c57d8b9bf90d5af42db9ae9d44098/1?pq-origsite=gscholar&cbl=36914>

Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. & Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International dairy journal*, 19(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.008>.

Franz, C. M., Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International journal of food microbiology*, 47(1-2), 1-24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00007-0).

Freitas, A. C., Pais, C., Malcata, F. X. & Hogg, T. A. (1996). Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*, 59(2), 155-160. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.155>.

Ghahremani, E., Mardani, M. & Rezapour, S. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria from traditional cheese in khorramabad city of iran with probiotic potential. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(5), 2516-2527. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1434-9>.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1).

Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A. & Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 57-69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.013>.

Gölge, Ö. (2009). Kelle Peynirlerinin Özellikleri Üzerine Starter Kültür Kullanımın Etkileri. [Doktora tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Gölge, Ö., & Şahan, N. (2008). Geleneksel Yöntemle Üretilen Kelle Peynirlerinin Bazı Kalite Özellikleri. Türkiye10. Gıda Kongresi Mayıs 21-23. Erzurum. Erişim adresi: <http://www.gidadernegi.org/TR/Genel/240934826361f.pdf?DIL=1&BELGEANAH=1612&DOSYASIM=240934826.pdf>.

Guo, L., Ye, L., Zhao, Q., Ma, Y., Yang, J. & Luo, Y. (2014). Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *Journal of thoracic disease*, 6(5), 534. Erişim adresi: <http://jtd.amegroups.com/article/view/2351/html>.

Gümüştas, A. (2015). Laktik asit bakterileri ve bakteriyofajların çeşitli kaynaklardan izolasyonu ve karakterizasyonu. [Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. Erişim adresi: <https://studylibtr.com/doc/880528>.

Gündüz, A. (2010). Model sistemlerde laktik asit bakterileri (*Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactococcus lactis*) üzerine stres faktörlerin etkisinin belirlenmesi. [Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Gürsoy O., & Kesenkaş, H. (2011). Peynir mikrobiyolojisi: Peynir Biliminin Temelleri. Editörler: AA Hayaloğlu, & B Özer. Sidas Medya Ltd. Şti. Çankaya İzmir. s: 79-110.

Gürsoy, O., & Kınık, O. (2006). Peynir üretiminde probiyotik bakterilerin kullanımı: Probiyotik peynir. Pamukkale Mühendislik Bilimleri Dergisi 12 (1):105-116. https://www.journalagent.com/pajes/pdfs/PAJES_12_1_105_116.pdf.

Hansen, B. V., Houlberg, U., & Ardö, Y. (2001). Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 225-233. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00052-8).

Hayaloglu, A. A., Guven, M., & Fox, P. F. (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'. *International Dairy Journal*, 12(8), 635-648. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00055-9).

Hayaloğlu, A.A., & Özer, B. (2011). Peynir biliminin temelleri. *Sidas Medya Ltd*, 643. s: 79-110.

HAYGEM, (2020). Tarım ve Orman Bakanlığı Hayvancılık Genel Müdürlüğü Ocak 2021 <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf>.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2) 365-373. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>.

IDF (2019). International Dairy Federation. Erişim adresi: <https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2021/01/DDOR-Global-Dairy-Facts-2019.pdf>.

IFCN (2019). International Farm Comparison Network. Dairy Data products. Erişim adresi: <https://ifcndairy.org/wp-content/uploads/2019/10/IFCN-Dairy-Report-Article-2019.pdf>.

IFCN, (2020). International Farm Comparison Network. IFCN methods. Erişim adresi: <https://ifcndairy.org/about-ifcn-neu/ifcn-dairy-research-center-method/>

ITC, (2020) International Trade Centre. Trade Map. List of importers for selected product in 2019. Erişim adresi: https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx?nvpm.

İrkin, R. (2017). Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Beyaz Peynirlerdeki Starter Kültür Bakterilerinin Canlılıklarına Etkisi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 15(3). <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.345276>.

İşleroğlu, H., Yıldırım Z., & Yıldırım, M. (2008) Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2008 25(1): 1-6. Erişim adresi: http://ziraatdergi.gop.edu.tr/Makaleler/997433135_1-6.pdf.

İşleyici, Ö., & Akyüz, N. (2009) Van ilinde satışa sunulan peynirlerde mikrofloranın ve laktik asit bakterilerinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 20 (2): 59-64. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/146516>.

- Jans, C., Kaindi, D.W.M, Böck, D., Njage, P.M.K., Kauame-Sina, S.M., Bonfoh, B. Lacroix, C. & Meile, L. (2013) Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2):186-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.008>.
- Jany, J. L. & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25(7), 839-848. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.003>.
- Jay, J. M. (2000). Fermentation and fermented dairy products. In *Modern food microbiology* (pp. 113-130). Springer US.
- Jurkovič, D., Križková, L., Dušinský, R., Belicová, A., Sojka, M., Krajčovič, J. & Ebringer, L. (2006). Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 42(6), 553-559. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01918.x>.
- Kacaniova, M., Terentjeva, M., Godočiková, L., Puchalski, C., Kunová, S., Kluz, M., ... & Haščík, P. (2017). Identification of lactic acid bacteria in milk and milk products with MALDI-TOF mass spectrometry. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies*, 50(1), 115-120. Erişim adresi: <http://www.spasb.ro/index.php/spasb/article/view/2324/pdf>.
- Kaleli, D., & Durlu-Özkaya, F. (2000). Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Yayını, Sim Matbaası, Ankara.
- Kamber, U. (2005). Traditional Anatolian Cheeses. Miki Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti. İvedik Ankara.s: 20-203.
- Kamber, U. (2008). The traditional cheeses of Turkey: cheeses common to all regions. *Food reviews international*, 24(1), 1-38. <https://doi.org/10.1018/875559120701791833>.
- Kamber, U. (2015). Traditional Turkey cheeses and their classification. *Van Veterinary Journal*, 26(3), 161-171. Erişim adresi : <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/217591>.
- Kanak, E. K., & Yılmaz, S. Ö. (2018). Sakarya’da geleneksel olarak üretilen bazı yöresel peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF MS Yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3), 1055-1062. <https://doi.org/10.16984/saufenbilder.346212>.
- Kang, O. J., Vézin, L. P., Laberge, S. & Simard, R. E. (1998). Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 639-646. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75618-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75618-8)

Karaduman, A., Ozaslan, M., H Kilic, I., Bayil-Oguzkan, S., Kurt, B. S. & Erdogan, N. (2017). Identification by using MALDI-TOF mass spectrometry of lactic acid bacteria isolated from non-commercial yogurts in southern Anatolia, Turkey. *International Microbiology*, 20(1), 25, 30. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.282>.

Karasu-Yalcin, S., Senses-Ergul, S. & Ozbas, Z. Y. (2017). Enzymatic characterization of yeast strains originated from traditional Mihalic cheese. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 6 (5) : 1152-1156. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.5.1152-1156>.

Kılıç, S. (2011). Peynir starter kültürleri: Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: AA Hayaloğlu ve B Özer. s: 79-110.

Kıran, F. & Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 27(1), 62-74. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/erciyesfen/issue/25571/269744>.

Kırma, İ. (2016). Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Ekzopolisakkarit Üretimi. [Doktora tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://polen.itu.edu.tr/handle/11527/13602>.

Kırmacı, H.A. (2010). Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları. [Doktora tezi. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Kırmacı, H.A., Hayaloglu, A.A., Ozer, B., Akcelik, M. & Akkoc, N. (2011). Proteolytic properties of Turkish white-brined cheese (Beyaz peynir) made by using wild-type Lactococcal strains. *International journal of dairy technology*, 64(3), 394-401. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00673.x>.

Kırmacı, H.A, Özer, B.H., Akçelik, M. & Akçellik, N. (2016). Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 301-307. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12260>.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 41(2), 103-125. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X).

Klijn, N., Weerkamp, A. H. & De Vos, W. M. (1995). Detection and characterization of lactose-utilizing Lactococcus spp. in natural ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 788-792. Erişim adresi: <https://aem.asm.org/content/aem/61/2/788.full.pdf>.

Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., ... & Stark, K. (2010). Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006–2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12), 1581-1584. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0631>.

Korucu, D. (2012). Tomas peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması [Yüksek lisans tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://acikerisim.nku.edu.tr:8080/xmlui/handle/20.500.11776/940>.

Kumar, N., Marotta, F., Bharadwaj, A. & Mishra, V. (2017). Isolation and identification of lactobacilli from traditional dairy products of selected regions of India. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 12 (3): 123-130. Erişim adresi: <http://0212vvv4w.y.http.eds.b.ebscohost.com.proxy.uludag.deepknowledge.net/eds/pdfviewer/>.

Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.

LPSN, (2019, 11 Eylül). List of prokaryotic names with standing in nomenclature <http://www.bacterio.net/lactobacillales.html>.

Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C. & Giraffa, G. (2004). Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. *International dairy journal*, 14(11), 967-976. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.005>.

Mahajan, B., Sohuche, Y., Hayes, J., Marotta, F., Yadav, H. & Singh, V. (2017) MALDI-TOF MS spectrophotometric and 16S rRNA gene sequencing identification of Probiotic lactic acid bacteria isolated from dairy food products. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 12 (4). Erişim adresi: <http://0212vvv4w.y.http.eds.b.ebscohost.com.proxy.uludag.deepknowledge.net/eds/pdfviewer/>.

Maikhan, H. K. & Amin, S.M.M. (2017). Isolation, Biochemical Identification and Antioxidant Activity of Locally Isolated *Lactobacillus* spp in Garmian Area. *Eurasian Journal of Science and Engineering*, 3(1), 128-136. <https://doi.org/10.23918/eajse.v3i1sip128>.

Mani-López, E., García, H. S. & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.

Mannu, L., Paba, A., Pes, M. & Scintu, M. F. (2000). Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of applied microbiology*, 89(2), 191-197. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01109.x>.

McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le lait*, 77(1), 41-76. <https://doi.org/10.1051/lait:199713>.

MEGEP, (2011). Mihaliç peyniri. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Gıda Teknolojisi, 541GI0028, s: 26.

Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmases, N. & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, 177, 136-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.

Nasrollahi, S., Nasrollahi, A., Esmaeili, P., Kaviani, M. & Shariati, M. A. (2016). A Short Review on Cheese Starters Cultures. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci*, 5(1), 18-20. <https://ijpras.com/storage/models/article/Mc4oajV6AHw2rnC8psQ1LgadTuMJzJEffaFtWQeG2NJPOc4LakluD2dVgydJ/a-short-review-on-cheese-starters-cultures.pdf>.

Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N. & Topisirovic, L. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International journal of food microbiology*, 122(1-2), 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.075>.

Norris, J. R., Berkeley, R. C. W., Logan, N. A. & O'donnell, A. G. (1981). The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. *The prokaryotes*, 2, 1711-1742.

OECD-FAO, (2020). Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029 https://stats.oecd.org/Index.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2020.

Ogden, L. V. (1992). Affecting Testing. *Dairy Science and Technology Handbook*, 1, 168-171.

Omemu, A. M. & Faniran, O. W. (2011). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from two fermented maize products-ogi and kunnu-zaki. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(3), 124-128. Erişim adresi: <http://wprim.whocc.org.cn/admin/article/downloadAppendix?article=/upload/articleFile/P020160923495875350141.pdf&articleId=626830>.

Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. & Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS microbiology letters*, 251(2), 267-271. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.012>.

Öksüztepe, G., Patır, B. & Çalıcıoğlu, M. (2005). Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak Tulum Cheese. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 29 (3): 873-879. Erişim adresi: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-05-29-3/vet-29-3-43-0405-24.pdf>.

Öner, Z. & Aloglu, H. (2004). Some characteristics of Mihalic, a traditional Turkish cheese. *Milchwissenschaft*, 59 (11-12): 628–631.

Öner, Z. & Şanlıdere, H.A. (2003). Keçi sütü kullanılarak yapılan mihaliç peynirinin özelliklerinin belirlenmesi. *Süt Endüstrisinde yeni eğilimler sempozyumu Mayıs*, 141.

Özcan, T. (2000). Starter, proteaz ve lipaz kullanımının Mihaliç peynirinin olgunlaşma süresine etkisi. [Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://acikerisim.uludag.edu.tr/handle/11452/6285>.

Özcan, T. & Kurdal, E. (2012). The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. *International journal of dairy technology*, 65(4), 585-593. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00868.x>.

Özdemir, C., Özdemir, S., Demirci, M., Çelik, Ş. & Sönmez, İ. (2004). The microbiological and physicochemical properties of Mihaliç cheeses. In *Proceedings of International Dairy Symposium May 24-28* (pp. 243-246).

Özer, E. (2015). Mihaliç peyniri üretiminde farklı starter kültür kombinasyonları kullanımı üzerine bir araştırma. [Doktora tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://www.gidamo.org.tr/>.

Özer, E. & Kesenkaş, H. (2019). The effect of using different starter culture combinations on ripening parameters, microbiological and sensory properties of Mihaliç cheese. *Journal of food science and technology*, 56(3), 1202-1211. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03583-2>.

Özlu, H. (2015). Bazı peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneği. [Doktora tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://earsiv.atauni.edu.tr/>.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*, 65(2), 859-867. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00292-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00292-9).

Parente, E., Rota, M. A., Ricciardi, A. & Clementi, F. (1997). Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). *International Dairy Journal*, 7(12), 775-783. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00093-9).

Parente, E., Rota, M.A. & Ricciardi, A. (2014). A meta-analysis of host-phage interaction matrices in *Streptococcus thermophilus*. 11th international symposium on lactic acid bacteria. August 31st-September 4th. Netherlands.

Patır, B. & Ateş, G. (2003). Tulum peynirinin olgunlaşması sırasında laktik asit bakteri florasının değişimi üzerine araştırmalar. *Gıda*, 28(3), 241-250. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/79222>.

Psoni, L., Tzanetakis, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006). Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Foodcontrol*, 17(7),533,539.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.03.001>.

Pulido, R. P., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Cañamero, M. M., Guyot, J. P. & Gálvez, A. (2007). Characterization of lactobacilli isolated from caper berry fermentations. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 583-590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03067.x>.

Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4),1882,1892.<https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1882-1892.2002>.

Rodríguez-Sánchez, B., Alcalá, L., Marín, M., Ruiz, A., Alonso, E. & Bouza, E. (2016). Evaluation of MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 42, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.09.009>.

Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K. & Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures--probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2),71. Erişim adresi:<https://search.proquest.com/docview/347209189/fulltextPDF/919437E64A54EE2PQ/1?accountid=17219>.

Ruoff, K. L., Miller, S. I., Garner, C. V., Ferraro, M. J. & Calderwood, S. B. (1989). Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 305-308. Eişim adresi: <https://jcm.asm.org/content/jcm/27/2/305.full.pdf>.

Samelis, J., Bleicher, A., Delbès-Paus, C., Kakouri, A., Neuhaus, K. & Montel, M. C. (2011). FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food microbiology*, 28(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.009>.

Sanchez, I., Palop, L. & Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro'eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), 9-17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00256-7).

Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P. A. & Bouvet, A. (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 631-645. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02361-0>.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551. <https://doi.org/10.1086/600885>.

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.

Singh, P. & Prakash, A. (2009). Screening of lactic acid bacteria for antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes* isolated from milk products at Agra region. *Internet Journal of Food Safety*, 11, 81-87. Erişim adresi: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.550.5828&rep=rep1&type=pdf>.

Singh, T. K., Drake, M. A. & Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(4), 166-189. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x>.

Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0).

Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., ... & Lanorte, M. T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal goat's cheese (Semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* 89: 267- 274. <http://hdl.handle.net/11575/6396>.

şen M.K.C. (1991). Mihaliç Peynirinin Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi Üzerine Araştırmalar. [Dokrota Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Bursa. Erişim adresi: <https://tarama.uludag.edu.tr/>.

şen, M.K.C., Temelli, S. & Evrensel, S.S. (2000). Bursa'da satışa sunulan Mihaliç peynirlerinden izole edilen koliform gurubu mikroorganizmaların tiplendirilmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 11 (1): 71-73. <https://dergipark.org.tr/en/pub/yyuvfd/issue/13752/166587>.

şen, M.K.C., Temelli, S. & Evrensel, S.S. (2003). Mihaliç peynirinin Yapımı ve Olgunlaşması Sırasında *Yersinia enterocolitica*'nın canlı kalabilme yeteneğinin incelenmesi. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 27: 1029-1034. <https://web.a.ebscohost.com/>.

şengün, İ. Y. (2011). Lactic acid bacteria used in the production of fermented foods. *Biological Diversity and Conservation*, 4, 1-42. www.biodicon.com. ISSN 1308-8084 Online.

Şenocak Soran, G. (2018). Geleneksel peynirlerin üretimine uygun doğal starter kültürlerin üretimi ile bu kültürlerin laktik asit bakteri floralarının tanımlanması ve karakterizasyonu. [Doktora Tezi. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>.

Tamime, A.Y. & Deeth, H.C. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of food protection*, 43(12), 939-977. XXX [doi: 10.4315/0362-028X-43.12.939](https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.12.939).

Tamime, A. Y., & Marshall, V.M.E. (1997). Microbiology and technology of fermented milks. In *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (Ed.) Law, B.A. Blackie Academic and Professional. (pp. 57-72). Springer, Boston, MA.

Tekinşen, C. (1997). Süt Ürünleri Teknolojisi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Konya, s: 326.

Tekinşen, O.C. (2000). Süt Ürünleri Teknolojisi. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s: 135-140.

Temiz, A. (2008). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınları: 96 Yükseköğretim Dizisi, Ankara, 29: 90-93.

Terin, M, (2014). Avrupa Birliği'ne Tam Üyeliğin Türkiye Sütçülük Sektörüne Muhtemel Bölgesel Etkilerinin Analizi. [Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <http://earsiv.atauni.edu.tr/>.

Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M., & Topisirovic, L. (2007). Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlutar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.038>.

Tigu, F., Assefa, F., Mehari, T., & Ashenafi, M. (2016). Probiotic property of lactic acid bacteria from traditional fermented condiments: Datta and Awaze. *International Food Research Journal*, 23(2), 770. <http://www.ifrj.upm.edu.my>.

Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., & Badosa, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11(4), 231. XXX [doi: 10.2436/20.1501.01.66](https://doi.org/10.2436/20.1501.01.66).

Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L. A., ... & Kersters, K. (1998). Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 519-527. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-519>.

Tsvetkov, T., & Shishkova, I. (1982). Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. *Cryobiology*, 19(2), 211-214. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(82\)90143-2](https://doi.org/10.1016/0011-2240(82)90143-2).

Turgut, T., Erdogan, A., & Atasever, M. (2012a). Identification of nonstarter indigenous Lactobacilli from Kars Gravier Cheese. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(5) 781-784. XXX [doi:10.9775/kvfd.2012.6386](https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.6386).

Turgut, T., Erdoğan, A., & Atasever, M. (2012b). Karın Kaymağı peynirinden izole edilen laktobasillerin tanımlanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2). 209-213. XXX [doi:10.9775/kvfd.2011.5272](https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5272).

Turhan, İ. & Öner, Z. (2014). Determination of starter culture properties of lactic acid bacteria isolated from cheese. *The Journal of Food* 39 (1): 9-15. XXX [doi:10.5505/gida.02486](https://doi.org/10.5505/gida.02486)

TÜİK, (2020a). Temel İstatistikler. Tarım. Süt ve Süt Ürünü İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=85&locale=tr>

TÜİK, (2020b). Dış Ticaret İstatistikleri. Diğer Mikroorganizma Kültürleri (300290509000). <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=140&locale=tr>.

TÜİK, (2020c). Temel İstatistikler. Tarım. Hayvansal Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2020-37207>

TÜİK, (2020d). Temel İstatistikler. Tarım. Sağılan Hayvan Sayısı ve Süt Üretim Miktarı İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>.

Türk Standardı TS 591, (2006). Beyaz peynir TS 591 :2006 Ankara, Türkiye.

Türk Standardı TS 5311, (2006). Peynir ve eritme peynir. Toplam kuru madde muhtevası tayini (referans metot). TS 5311 ISO 5534. Ankara, Türkiye.

Türk Standardı TS ISO 3433, (2008). Peynir Yağ muhtevası tayini. Van Gulik yöntemi. TS ISO 3433 Ankara, Türkiye.

USK, (2019). Ulusal Süt Konseyi. Dünya ve Türkiye’de Süt Sektör İstatistikleri Süt Raporu. <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/ulusal-sut-konseyi-sut-raporu-2019-2903/>

USK, (2020). Ulusal Süt Konseyi. Dış Ticaret Süt Sektör İstatistikleri <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/disticaret/>.

Ünal, A. & Çalışkan, M. (2014). Mikrobiyal biyoteknoloji ve mikroorganizma genetik kaynaklarının biyoekonomideki önemi. Tagem tarımsal araştırmalardan bakış. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü. Erişim adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/>.

Ünsal, A. (1997). Süt uyuyunca “Türkiye Peynirleri”. Yapı Kredi Yayınları, İstanbul.s: 151-153.

Vernile, A., Giammanco, G., Spano, G., Beresford, T. P., Fox, P. F. & Massa, S. (2008). Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano cheese. *Dairy Science and Technology*, 88(6), 619-629. <https://doi.org/10.1051/dst:2008009>.

Wattal, C. & Oberoi, J. K. (2016). Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(1), 75-82. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2510-y>.

WFCC Country, (2019, 22 Eylül). World Federation for Culture Collections Erişim adresi: http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/t/90/.

WFCC info, (2019, 22 Eylül). World Federation for Culture Collections Erişim adresi: <http://www.wfcc.info/ccinfo/>.

WFCC statistics (2019, 22 Eylül) World Federation for Culture Collections Erişim adresi: <http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/>.

Wilkinson, M. G. & Kilcawley, K. N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 817-830. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.021>.

Williams, A. G. & Banks, J. M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal*, 7(12), 763-774. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00092-7).

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/>.

World to Exports (2020) Cheese Exports by Country
<http://www.worldstopexports.com/cheese-exports-country/>

Wormser, G. P., & Reid, G. (2005). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd Revised and Expanded Seppo Salminen, Atte von Wright, and Arthur Ouwehand (Eds.) (pp.633). New York: Marcel Dekker. Erişim adresi: <https://0211sy6en-y-https-doi-org.proxy.uludag.deep-knowledge.net/10.1086/428129>

Wyszyńska, A., Kobińska, P., Bardowski, J. & Jagusztyn-Krynica, E. K. (2015). Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(7), 2967-2977. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6569-2>.

Yalman, M., Tepeli, S. Ö. & Zorba, N. N. D. (2016). Mold Flora of Traditional Cheeses Produced in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4(11), 926-933. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i11.926-933.732>.

Yaygın, H., Gahun, H., & Karagülle, M.Ş. (1984). İnek, Koyun, Keçi Sütünden yapılan Mihaliç peynirinin bazı özellikleri üzerinde yapılan araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 21 (3): 19-26.

Yaygın, H. & Kılıç, S. (1993). Süt endüstrisinde saf kültür. *Altındağ Matbaacılık*, 107. Yıldız, H. (2011). Turşu ve Zeytinlerden laktik asit bakterileri ile mayaların izolasyonu identifikasyonu ve elde edilen izolatların bazı özelliklerinin belirlenmesi. [Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Youssef, A. M., Assem, F. M., Abdel-Aziz, M. E., Elaaser, M., Ibrahim, O. A., Mahmoud, M., & Abd El-Salam, M. H. (2019). Development of bionanocomposite materials and its use in coating of Ras cheese. *Food chemistry*, 270, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.114>.

Yumuşak, D. Öncül, Ö., & Esen, B. (2005). Kültür koleksiyonu genel tanımı ve Türkiye'deki kültür koleksiyonları. *Deneyisel Biyoloji Dergisi* 62 (1,2,3): 67 - 72. Erişim adresi: <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/thdbd12.pdf#page=74>.

Yüce, S. (2017). Peynir ve yoğurtlardan izole edilmiş olan laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özelliklerinin araştırılması. [Yüksek Lisans Tezi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>.

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B. & De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and applied microbiology*, 29(6), 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.10.002>.

Zarate, V., Belda, F., Pérez, C. & Cardell, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7(10), 635-641. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00065-4).

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BPW	: Buffered Peptone Water
DNAz	: Deoksiribonukleaz
EC	: European Commision
EFSA	: European Food Safety Authority
EU	: European Union
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAOSTAT	: The FAO Statistical Programme of Work
g	: Gram
ISO	: International Organization for Standardization
Kg	: Kilogram
kob	: Koloni Oluşturan Birim
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MRD	: Maximum Recovery Diluent
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
RNA	: Ribo Nükleik Asit
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
µl	: Mikrolitre
ACTINOCC	: Ege Üniversitesi Actinomycetes Kültür Koleksiyonu
ATCC	: American Type Culture Collection
CLAL	: Cheese Production European Union Information
ECCO	: European Culture Collections Organisation
ECM	: Energy Corrected Milk
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas
EMS	: En Muhtemel Sayı
Ent.	: <i>Enterococcus</i>
EUROSTAT	: Eurostat Statistics
HMP	: Heksoz monofosfat
HUKUK	: Hayvan Hücrelerinin Kültür Koleksiyonu
IDF	: International Dairy Federation
IFCN	: International Farm Comparison Network
KÜKENS	: Kültür Koleksiyonları Enstitüsü
L.	: <i>Lactococcus</i>
LAB	: Laktik asit Bakterileri
Lb.	: <i>Lactobacillus</i>
Leu.	: <i>Leuconostoc</i>
M.Ö.	: Milattan Önce
MEGEP	: Mesleki Eğitim ve Öğretim Sistemini Güçlendirme Projesi
NSLAB	: Non Starter Laktik asit Bakterileri
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
P.	: <i>Propionibacterium</i>

Str.	: <i>Streptococcus</i>
TAGEM	: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel M¼d¼rl¼ğ¼
TEPGE	: Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstit¼s¼
USK	: Ulusal S¼t Konseyi
MRSA	: de Man Rogosa Sharpe Agar
KAA	: Kanamycin Esculin Azide Agar
PIA	: Propionibacter Isolation Agar
API	: Analytical Profile Index
TSGB	: T¼rkiye Starter K¼lt¼r Gen Bankası
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
RUO	: Research Use Only
IVD	: In-Vitro Diagnosis
WFCC	: Word Federation for Culture Collection



8.EKLER

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** Dünya ve Türkiye süt üretim
- Tablo 2.** Sanayiye aktarılan inek sütü miktarları
- Tablo 3.** Dünya peynir ve tereyağı üretim verileri
- Tablo 4.** 2013-2019 yılları arası hayvan türlerine göre çiğ süt üretimi
- Tablo 5.** Süt kategorisine göre 2020 yılı peynir üretim miktarı
- Tablo 6.** Peynir sertlik derecelerine göre 2019 yılı üretim miktarı
- Tablo 7.** Mihaliç peynirinin bazı kimyasal özellikleri
- Tablo 8.** Homofermantatif ve heterofermantatik laktik asit bakteri türleri
- Tablo 9.** Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması
- Tablo 10.** Çeşitli fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri
- Tablo 11.** Fermente peynir çeşitlerinden izole edilen laktik asit bakterileri
- Tablo 12.** Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri
- Tablo 13.** Bazı Peynirlerde Kullanılan Starter Bakteriler
- Tablo 14.** WFCC organizasyonuna kayıtlı bazı ülkeler ve koleksiyon sayıları
- Tablo 15.** Türkiyede WFCC'ye kayıtlı kültür koleksiyonları ve sayıları
- Tablo 16.** Toplanan Mihaliç peynir örneklerine ait bilgiler
- Tablo 17.** Çalışmada kullanılan besiyeri ve kimyasallar
- Tablo 18 :** PZR Bileşen ve Miktarları
- Tablo 19 :** 16S Geninin PZR Koşulları
- Tablo 20.** Mihaliç peynir örneklerinde gelişen laktik asit bakteri sayıları
- Tablo 21.** API, MALDI-TOF MS, 16S rDNA dizi analiz sonuçlarının karşılaştırılması
- Tablo 22.** Laktobasiller için karşılaştırmalı MALDI-TOF MS ve 16S rDNA dizi analiz sonuçları
- Tablo 23.** Streptokoklar için karşılaştırmalı MALDI-TOF MS ve 16S rDNA dizi analiz sonuçları
- Tablo 24.** Mihaliç peynirlerinin % tuz analiz sonucu
- Tablo 25.** Mihaliç peynir örneklerinin duyu analiz sonuçları
- Tablo 26.** Mihaliç peynirleri kimyasal analiz sonuçları
- Tablo 27.** Mihaliç peynirlerinin laktik asit bakteri sayımları
- Tablo 28.** Tuzlu ve az tuzlu peynirlerin LAB florası
- Tablo 29.** Peynirlerin kabuk ve iç kısımlarında mikrobiyal dağılımı
- Tablo 30.** Tanımlanan ve kültür koleksiyonuna alınan mikroorganizmaların list

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Avrupa Birliği Ülkeleri peynir üretimi

Şekil 2. Peynir ihracatçı ülkelerin pazar payları (ihracat dolar eşdeğeri olarak)

Şekil 3. Ülkemizde 2015-2020 yılları arası sığır-koyun-keçi sayıları

Şekil 4. Toplam inek sütü üretimi ve ticari süt işletmeleri tarafından toplanan inek sütü miktarı

Şekil 5. 2015-2020 yılları toplam peynir üretim miktarı

Şekil 6. Laktik asit bakterilerinin genel glikoz fermentasyon şeması

Şekil 7. Laktik asit bakterilerinin 16S rRNA sekans analizine dayalı başlıca filogenetik grupları

Şekil 8: İyonize edilmiş izolatların MS analizinin genel şeması

Şekil 9. MALDI'nin laser atışı ile desorpsiyonu ve iyonizasyonu

Şekil 10. İzole kültürlerden MALD-TOF MS ile identifikasyon yöntemi şeması.

Şekil 11. MALDI-TOF MS ile tanımlanan laktik asit bakterilerinin cins seviyesinde yüzdelik dağılımı.

Şekil 12. MALDI-TOF MS ile tanımlanan laktik asit bakterilerinin tür seviyelerinde dağılımı

Şekil 13. MRS besiyerinden izole edilip, tanımlanan laktobasil izolatlarının dağılımı

Şekil 14. M17 besiyerinden izole edilip, tanımlanan streptokok izolatlarının dağılımı

Şekil 15. KAA besiyerinden izole edilip, tanımlanan enterokok izolatlarının dağılımı

Şekil 16. MALDI-TOF MS laktobasillerden alınan spectralar m/z (da). A. *Lb. fermentum* B. *Lb. paracasei/casei/rhamnosus* C. *Lb. delbrueckii*

Şekil 17. MALDI-TOF MS ile enterekoklardan alınan spektrumlar m/z (da). A. *Ent. faecium* B. *Ent. faecalis* C. *Ent. durans*

Şekil 18. MALDI-TOF MS streptekoklardan alınan spektrumlar m/z (da). A. *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* B. *Str. infantarius* ssp. *infantarius* C. *L. lactis*.

Şekil 19. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatların dendrogram görüntüleri. A. *Lb. paracasei* B. *Lb. rhamnosus* C. *Lb. fermentum*

Şekil 20. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatların dendrogram görüntüleri. A. *Str. gallolyticus* ssp. *macedonicus* B. *Str. infantarius* ssp. *infantarius* C. *L. lactis*

Şekil 21. MALDI-TOF MS ile tanımlanan izolatların dendrogram görüntüleri. A. *Ent. faecium* B. *Ent. faecalis*

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, değerli danışman hocam Prof. Dr. Recep ÇIBİK'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim için sağladığı destekten ötürü Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Her türlü desteği benden esirgemeyen sevgili aileme de teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

2002 yılında Sedat Karan Anadolu Lisesi'nden mezun olmuştur. Lisans eğitimini 2002-2007 yılları arasında Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamlamıştır. 2015 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. Halen Tarım ve Orman Bakanlığı Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nde çalışmakta olup, evli ve bir kız çocuğu babasıdır.