



**AĞRI YÖRESEL BEYAZ PEYNİRLERDEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU**

Elif COŞKUN DEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Furkan ORHAN

**AĞRI-2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Elif COŞKUN DEMİR

**AĞRI YÖRESEL BEYAZ PEYNİRLERDEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Furkan ORHAN

AĞRI-2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AĞRI YÖRESEL BEYAZ PEYNİRLERDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Furkan ORHAN

2022, 76 Sayfa

Jüri: Doç. Dr. Furkan ORHAN

Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ

Doç. Dr. Derya EFE

Laktik asit bakterileri genelde besin değeri yüksek olan et, sebze ve süt ürünlerinde bulunan ve çevrelerin mevcut karbohidratları kullanarak fermente ürünlerin oluşmasını sağlayan önemli mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar laktik, asetik ve sitrik asit gibi özel bileşikler üreterek hem fermente ürünleri korur hem de daha sağlıklı ve uzun ömürlü olmasını sağlar. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada Ağrı İli'ni temsil eden 7 farklı bölgeden toplanan 14 yerel beyaz peynir örneğinden 55 bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların tanımlanması için morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin yanı sıra, safra tuzu toleransı, antibiyotik duyarlılık ve antagonistik aktivite parametreleri de yapılmıştır. Moleküler testler kapsamında 55 izolatın DNA izolasyonu, 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu ve 16S rDNA gen bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. 16S rDNA gen bölgesinin dizi analizine göre beş farklı cinse (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus*) ait izolatlar LAB olarak tanımlandı. Ayrıca peynir yapım süreçlerinden geçebilecek on farklı bakteri cinsi de (*Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Phyllobacterium*, *Micrococcus*, *Hafnia*, *Shigella*, *Serratia*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* ve *Paenibacillus*) belirlenmiştir.

2022, 76 sayfa

Anahtar sözcükler: Beyaz peynir, LAB, izolasyon, 16S rRNA, biyokimyasal testler, Antibiyotik direnç testleri, antagonistik aktivite

SUMMARY

MASTER THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM AĞIR REGIONAL WHITE CHEESE

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Furkan ORHAN

2022, Page: 76

Jury: Assoc. Prof. Dr. Furkan ORHAN

Assoc. Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ

Assoc. Prof. Doç. Dr. Derya EFE

Lactic acid bacteria (LAB), an important group of microorganisms, are generally found in high nutritional products as meat, vegetables and milk products and enable the formation of fermented products by using the carbohydrates present in their environment. These microorganisms both protect fermented products and make them healthier and longer-lasting by producing special compounds such as lactic, acetic and citric acid. In light of this information, in the current study, 55 bacterial isolates were obtained from 14 local white cheese samples collected from 7 different regions representing Ağrı Province. In addition to morphological, physiological and biochemical tests for the identification of these isolates; bile salt tolerance, antibiotic susceptibility and antagonistic activity parameters were also performed. Within the scope of molecular tests, DNA isolation of 55 isolates, amplification of 16S rDNA gene region and sequence analysis of 16S rDNA gene region were performed.

According to the sequence analysis of 16S rDNA gene region, isolates were belonging to five different genera (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus*) were identified as LAB. In addition, ten different bacterial genera (*Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Phyllobacterium*, *Micrococcus*, *Hafnia*, *Shigella*, *Serratia*, *Leifsonia*, *Stenotrophomonas* and *Paenibacillus*) were determined which could be through cheese making processes.

2022, Page: 76

Key words: White cheese, LAB, isolation, 16S rRNA, biochemical tests, antibiotic susceptibility, antagonistic activity

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Furkan ORHAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Abdullah DEMİRCİ'ye tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca manevi olarak beni hiç yalnız bırakmayan eşime ve aileme katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Elif COŞKUN DEMİR

Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
SUMMARY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Beyaz Peynir	4
2.2. Beyaz Peynir Mikroflorası.....	4
2.3. Beyaz Peynirde Bulunan Patojen Mikroorganizmalar	9
2.3.1. Koliform grubu bakteriler.....	10
2.3.2. <i>Salmonella</i>	10
2.3.3. <i>Staphylococcus</i>	11
2.3.3. <i>Listeria</i>	12
2.4. Laktik Asit Bakterileri	13
2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması	14
2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Karakterizasyonunda Kullanılan Özellikler	15
2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri	17
2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Cinsleri	20
2.8.1. <i>Lactobasillus spp.</i>	20
2.8.2. <i>Lactococcus spp.</i>	21
2.8.3. <i>Enterococcus spp.</i>	21
2.8.4. <i>Leuconostoc spp.</i>	21
2.8.5. <i>Pediococcus</i> , <i>Aerococcus</i> ve <i>Tetragenococcus spp.</i>	22
2.8.6. <i>Streptococcus</i> , <i>Vagococcus</i> ve <i>Weisella spp.</i>	22
2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Starter Kültür Olarak Kullanılması	22
3. MATERYAL VE METHOD	26
3.1. Araştırmada Kullanılan Beyaz Peynir Örnekleri.....	26
3.2. Besiyerleri ve Çözeltiler	26
3.2.1. MRS Agar (Merck 1.10660).....	26
3.2.2. MRS Broht (Merck 1.10661).....	26
3.2.3. TSA Agar (Merck 1.05458).....	27

3.2.4. TSB Broth (Merck 1.05459).....	27
3.2.5. Nutrient Broht (Merck 1.05443).....	27
3.2.6 Brom timol mavisi	27
3.2.7. 10X TBE hazırlama	27
3.2.8. Agaroj jel hazırlama.....	28
3.2.9. %3'lük KOH çözeltisi hazırlama.....	28
3.2.10 Tetrasiklin antibiyotiği.....	28
3.2.11. Neomisin antibiyotiği	28
3.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	28
3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Stoğa Alınması	28
3.5. Laktik Asit Bakterilerine Uygulanan Testler.....	29
3.5.1. Morfoloji ve hareketlilik testi	29
3.5.2. Farklı pH'da gelişim (4.0-7.20-9.0).....	29
3.5.3. Katalaz testi	29
3.5.4. Glukozdan gaz üretimi.....	29
3.5.3. Eskulin analizi	30
3.5.4. Nişasta hidrolizi	30
3.5.5. Kazein hidrolizi	30
3.5.6. Şeker fermentasyon testleri.....	31
3.5.8. Antibiyotik direnç testleri	31
3.5.9. Antagonistik aktivite testleri.....	32
3.5.10. Genomik DNA izolasyonu	32
3.5.11. Bakteri izolatlarının 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplikasyonu	33
3.5.12. Bakteri izolatlarının kolony PCR'ı.....	34
3.5.13. 16s rDNA sekans analizi	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması.....	36
4.1.1. Gram boyama.....	36
4.1.2. Bakterilerin farklı pH'lardaki gelişimi	37
4.2. Biyokimyasal Testler	39
4.3. Şeker Fermente Testleri.....	42
4.4. Safra tuzuna direnç testi.....	43
4.5. Antibiyotik Direnç Testleri.....	45
4.6. Antagonistik Aktivite Testleri	47

4.7. İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu ve PCR.....	50
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	76



SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
μ	Mikro
μ l	Mikrolitre
b	baz
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
Dr	Doktor
EC	ELİF COŞKUN, bakteri kodu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	Ekstraselüler polisakkarit
g	Gram
Gr	Gram pozitif, negatif
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
Kg	kilogram
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Leu</i>	<i>Leuconostoc</i>
mg	miligram
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
mm	milimetre
MnSO ₄	Manganez (II) sülfat
MRS	Man Rogosa and Sharpe
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
°C	santigrat derece
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA	Ribonükleik asit
RPLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
s	saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Trise base EDTA
TE	Trise EDTA
TSA	Triptic soye aga
TSB	Triptic soye broht



ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Ağrı İl ve ilçeleri haritası	3
Şekil 3.1: Yöresel beyaz peynir.....	26
Şekil 4.1: EC49'un 3 farklı pH'ta geliştikten sonraki görüntüsü.....	38
Şekil 4.2: Glikozdan gaz üreten ve gaz üretmeyen izolatların görüntüsü	39
Şekil 4.3: Şeker fermente testi sonuçlarına göre EC2 ve EC4	42
Şekil 4.4: Patojen üzerinde zon oluşturan EC10 görüntüsü	47
Şekil 4.5: Patojen üzerinde zon oluşturan EC32 görüntüsü	47

TABLolar

Tablo 2.1: Lab'ların temel farklı özellikleri	15
Tablo 2.2: Beyaz peynirde kullanılan starter bakteriler.....	23
Tablo 2.3: Bazı süt ürünlerinde kullanılan mezofilik kültürler	24
Tablo 2.4: Bazı süt ürünlerinde kullanılan termofilik kültürler.....	25
Tablo 3.1: Reaksiyon için gerekli miktarlar	33
Tablo 3.2: Kolony PCR için gerekli miktarlar.....	35
Tablo 4.1: İzolatların gram özellikleri	37
Tablo 4.2: İzolatların farklı pH'larda gelişimleri.....	38
Tablo 4.3: Biyokimyasal test sonuçları.....	40
Tablo 4.4: Biyokimyasal test sonuçları.....	41
Tablo 4.5: Şeker fermene test sonuçları.....	43
Tablo 4.6: Safra tuzuna direnç testi sonuçları.....	44
Tablo 4.7: Antibiyotik direnç test sonuçları	46
Tablo 4.8: Patojenler üzerinde zon oluşturan izolatlar	48

Tablo 4.9: Patojenler üzerinde zon oluşturan izolatlar	49
Tablo 4.10: İzolatların BLAST sonuçları	50



1.GİRİŞ

Gerek gıda üretimi gerekse gıda koruması için uygulanan yöntemlerden biri olan fermantasyon, uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Genellikle gıdaların korunması için tuzlama, kurutma tütsüleme gibi yöntemler kullanılarak gıdaların bozulmadan daha uzun süre saklanması sağlanmıştır (Farnworth, 2008). Fermantasyon yöntemi ilk olarak gıdaları muhafaza etmek için kullanılmaya başlanmış olsa da bir süre sonra gıdalarda meydana gelen farklı aromaların lezzeti arttırdığı ve gıdaların besin değerlerinin korunduğu ortaya çıkmıştır. Fermantasyon daha sonraları et, süt ve sebze gibi gıdaların korunması için de sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Hem bitkisel hem de hayvansal ürünlerde kullanılan fermantasyonun farklı birçok ürünün üretimi için (turşu, kaşar, yoğurt, sirke vb.) ortaya çıkmıştır (Tamang and Kailasopaty, 2010).

Laktik asit bakterileri özellikle süt ve süt ürünleri başta olmak üzere doğada oldukça yaygın bulunan mikroorganizmalardır. Gıda fermantasyonunda önemli bir yeri vardır. Bu mikroorganizmaların en önemli özellikleri laktozu parçalayarak ürettikleri laktik asit sayesinde sütün asitliğini buna bağlı olarak yükseltmeleridir. Böylece bu bakteriler, rennin aktivitesini arttırarak peynir üretiminde kullanılacak sütte pıhtı oluşmasını sağlamaktadır. Oluşan laktik asit yalnız pıhtılaşma için değil, üretilen ürünün tat, yapı ve aromasına katkıda bulunmakla raf ömrünü uzatarak peynir kalitesi üzerinde etkili olmaktadır. Ayrıca bakterilerin metabolik faaliyetleri sonucu üretilen çeşitli asitler (asetik, formik, süksinik gibi) sayesinde patojenlere karşı koruyucu bir ortam oluşmaktadır. (Vuyst *et al.* 2003).

Laktik asit mikroflorasının çiğ süt ile üretilen peynirler üzerine olumlu etkileri olmasına rağmen, hijyen açısından sütün ısıtılma işlem görmesi oldukça önemlidir. Isıl işlem sonrası doğal laktik asit florasının etkinliği ve dolayısıyla asitlik azaldığından süte gerekli laktik asit bakterilerini katmak oldukça önemlidir. Laktik asit bakterilerinin fermantasyonu ile üretilen peynir, yoğurt, kefir, krema ve tereyağı fermente süt ürünlerine örnek olarak gösterilebilir.

Üretim başlangıcı en az sütün keşfedilmesi kadar eski olan peynir, ülkemizde sıkça tüketilen gıdalardan birisi olması nedeniyle Türk mutfağında önemli bir yeri vardır. Birçok çeşidi bulunan peynir genellikle üretim şekillerine bağlı olarak protein,

yağ ve bakteri içeriği bakımından farklılıklar göstermektedir. Peynire özgün tat ve aromayı veren etken, pastörizasyon ile yok olan laktik asit bakterilerinin saf kültür olarak katılmasıdır (Bulut, 2003; Hayaloğlu vd. 2005). Peynir çeşitleri peynirin ham maddesi olan sütün manda, koyun, inek ve keçi sütü gibi farklılık göstermesine bağlı olarak da değişmektedir. Tüm bu özellikler göz önüne alındığında, ülkemizde ve tüm dünyada birçok peynir çeşidi ortaya çıkmıştır. En çok bilinen peynirlerden beyaz peynir, otlu peynir, tulum peyniri, kaşar peynir, ülkemizde sevilerek tüketilen peynirler arasındadır (Dağdemir, 2006).

Türkiye’de ekonomik olarak değerli, önemli bir gıda olan peynir; sütün uygun enzim ya da organik asit yardımıyla pıhtılaştırıp, oluşan pıhtının süzülerek uygun koşullarda olgunlaştırılmasıyla elde edilir. Üretimi için her türlü süt cinsi kullanılabilir. Kalsiyum ve fosfor bakımından zengin olan peynirin 100 gramı günlük kalsiyum ve fosfor ihtiyacımızın %10-40’ını karşılamaktadır (Süt ve Süt Ürünlerinin Kalite Kontrolü, 2010). Ülkemizde üretilen yaklaşık 25 peynir çeşidinden en çok değer gören ve tüketilen peynir çeşidi beyaz peynirdir ve ekonomik değeri yüksektir. Yumuşak yapıda, hafif ekşimsi ve tuzlu bir tada sahip olan beyaz peynir tüketim tercihi açısından birinci sıradadır (Erkmen, 2010). Birçok ülkede üretilen beyaz peynire farklı üretim prosesleri sonucu oluşan özellikleri nedeniyle farklı isimler verilmiştir (Dağdemir, 2006). Önemli bir fermente süt ürünü olan beyaz peynir bileşimindeki süt yağı, protein, laktoz, mineraller ve vitaminler gibi besin öğelerini içermektedir. Kullanılan sütte bulunan yağ oranına bağlı olarak değişse de tam yağlı peynir dışında genel olarak peynirlerde %20-30 oranında yağ bulunurken, %10-30 oranında kazeinden elde edilen protein bulundurur. Peynirde bulunan sütler genellikle %4-5 oranında şeker bulundururlar, süt şekeri olan laktoz çoğunlukla peynir yapımı sırasında laktik aside çevrilir.

Starter kültürler, ticari olarak üretilen hemen hemen tüm fermente gıdaların önemli bir bileşenidir. Tanım olarak starter kültürler, bitmiş üründe istenen ve öngörülebilir değişiklikleri meydana getirmek için doğrudan gıda malzemelerine inoküle edilen/aşıl原因 mikroorganizmalardır. Starter kültürler, gelişmiş koruma, geliştirilmiş besin değeri, değiştirilmiş duysal nitelikler ve ürünün ekonomik değerinin atması gibi olgulara katkıda bulunur. Fermente gıdaların çoğu starter kültür olmadan yapılabilsede, starter kültür formunda konsantre mikroorganizmaların

eklenmesi, ürünlerin tutarlı bir programa göre ve belirli kalite standartlarında üretilmesini sağlamak için bir temel sağlar. Starter kültür için kullanılan bir diğer bir tanım ise; peynir ve fermente süt ürünleri üretiminde gerekli olan fermentasyon sürecini yürüten mikroorganizmalardır (bakteriler, mayalar ve küfler veya bunların kombinasyonları) (Blandino *et al.* 2003; Suroño and Hosono, 2011; Zarzecka *et al.* 2020).

Geleneksel olarak üretilen peynirlerin çoğunda inek, keçi ve koyun sütü çiğ olarak kullanıldığından, bu durum üretilen peynirin hijyenden yoksun olmasına neden olmakta ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır. Günümüzde peynir çeşitleri genellikle mandıralarda ya da fabrikalarda üretilir. Fakat aile işletmelerinde geleneksel olarak üretilen peynirlerde yaygındır. Bu sebepten yöresel olarak üretilen peynirlerin mikroflorasının kaliteli olması beklenmemektedir (Hayaloğlu vd. 2005).

Bu çalışmada; Ağrı ilini temsil edecek şekilde önceden belirlenen 7 farklı bölgeden (Hamur, Tutak, Patnos, Eleşkirt, Doğubeyazıt, Diyadin, Taşlıçay) geleneksel olarak üretilen beyaz peynir örnekleri toplanmıştır. Toplanan bu peynirlerde 67 farklı bakteri straini izole edilmiştir. Daha sonra izole edilen bu bakterileri tanılamak ve karakterize etme için çeşitli testler (fiziksel kimyasal, mikrobiyolojik) yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu, 12 farklı cins tespit edilmiştir. PCR yöntemi ile 16S RNA bölgeleri çoğaltılarak sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar NCBI veri tabanındaki diğer bakteriler ile eşleştirilerek peynir örneklerinde bulunan bakteriler tanılanmıştır.



Şekil 1.1: Ağrı İl ve ilçeleri haritası

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Beyaz Peynir

Hem besin içeriği, hem de ekonomik getirisi bakımından süt endüstrisinin en önemli ürünlerinden biri peynirdir. Birçok uzman tarafından günlük en az 30 gr beyaz peynir tüketilmesi önerilmektedir. Peynir yağ, mineral, kalsiyum, fosfor ve vitamin bakımından oldukça zengin olması nedeniyle çocukların ve yetişkinlerin beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye’de tüketilen peynir çeşitlerinin büyük bir kısmını beyaz peynirler oluşturmaktadır (Demirci, 1988; Tarakçı vd. 2015).

2.2. Beyaz Peynir Mikroflorası

Peynir üretimde kullanılan çiğ sütün mikroflorası, peynir kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Peynirin ana maddesi olan süt, insanların sağlıklı beslenebilmesi için yararlı bir kaynaktır. Bunun yanında bir çok mikroorganizmanın gelişmesine de imkan sağlayan çok iyi bir besin ortamıdır. Süt yeterince ısıtılma işlemi görmediğinde içerdiği mikrofloranın büyük bir bölümünü korur.

Geleneksel ve yöresel peynirler, üretilen küçük işletmelerde temizliğe yeteri kadar hassasiyet gösterilmediğinden, bu tür peynirlerdeki mikroorganizmalar ürünün bozulmasına neden olurlar. Peynirlerde bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar özellikle süt sağma, sağılan sütün taşınması ve depolanma sırasında hijyenik koşullara yeterince uyulmaması sonucunda süte kontamine olabilmektedir. Bu sebepten ötürü, kontamine olmuş sütlerle üretilen peynirlerin olgunlaşması beklenmeden satılması ve tüketilmesi, patojen mikroorganizmaların canlı kalma olasılığı olduğundan tüketicinin sağlığı açısından büyük risk olarak görülmektedir. Ülkemizde peynirlerin belirli aşamalarda tüketilmesi ve mikrobiyolojik kaliteleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmaların sonucunda, bu peynirlerin mikroflorasının kaliteli olmadığı ve halk sağlığı açısından risk oluşturdukları tespit edilmiştir (Çelik ve Uysal, 2009; Kaynar, 2011).

Peynirde bozulmaya neden olan cinsten biri olan *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar peynir yapısını bozarak, gaz, kötü tat ve koku oluşumuna neden olmaktadır (Cinbaş ve Kılıç 2005).

Peynirlere çeşitli kaynaklardan bulaşan mikroorganizmalardan peynir için en tehlikeli olanı koliform grubu bakterilerdir. Koliform grubu bakteriler, süt şekerini asit ve gazla çevirmektedir. Oluşan bu gaz peynirin iç kısmında birikerek gözenekler oluşmasına sebep olmaktadır. Buda peynirlerde görüntü kirliliğinin yanında peynirin aroma ve tadını değiştirmektedir. Peynirde koliform grubu bakterilerinin varlığı insan veya sıcakkanlı hayvanlardan kaynaklanmaktadır (Yaygın ve Demiryol, 1982; Pelczar *et al.* 1993).

Beyaz peynir mikroflorasını temel olarak oluşturan bakteriler laktik asit bakterileridir.

Beyaz peynir mikroflorasını inceleyen Karakuş vd. (1992) peynir üretildikten sonra olgunlaşma başlangıcında *Lactococcus lactis ssp. lactis* baskın tür olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum* *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* türlerinin de varlığını tespit etmişlerdir (Karakuş vd. 1992).

Yapılan araştırmalarda beyaz peynir florasında *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Staphylococcus aureus* *Pediococcus* ve koliform grubu bakterilerin olduğu, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* gibi türlerin ise olgunlaşma boyunca baskın mikroorganizmalar olduğu görülmüştür (Uraz ve Gündoğan, 1998). Yapılan bir başka araştırmada ise yine beyaz peynir mikroflorasının *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* gibi bakterilerden oluştuğu bildirilmiştir (Uraz ve Gündoğan, 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

Yukarıda beyaz peynir mikroflorasında bulunan bakterilere ilave olarak, süt ürünlerinde *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Phyllobacterium*, *Micrococcus*, *Burkholderia*, *Hafnia*, *Sphingobium*, *Serratia*, *Leifsonia*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* ve *Paenibacillus* gibi bakteri cinslerinin de bulunduğu literatürde gösterilmiştir (Collins *et al.* 1986; Gotuzzo and Cellillo, 1992; Ramos and Damasio, 2000; Hayes *et al.* 2001; HP. Doddamani *et al.* 2001; Patır vd. 2001; Serial *et al.* 2001; Chuayana *et al.* 2003; Kagkli *et al.* 2007; Madhaiyan *et al.* 2010; Elizabeth *et*

al. 2015; Gopal *et al.* 2015; Trmčić *et al.* 2015; Sattin *et al.* 2016; Guzzon *et al.* 2017; Okuno *et al.* 2018; Kamilari *et al.* 2020).

Beyaz peynir mikroflorasında bulunan *Microbacterium* cinsi bakteriler gram pozitif, katalaz pozitif olup basil şeklindedirler (McLean and Sulzbacher, 1953). Süt, su ve toprak örneklerinde bulunup bazı türlerinin patojen olduğu gösterilmiştir (Collins *et al.* 1983, Collins *et al.* 1986, Bellassi *et al.* 2021). Bu cinsin süt ürünlerinde (Erzincan Tulum Peyniri) bulunduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Patır vd. 2001).

Beyaz peynir mikroflorasında bulunan bir diğer bakteri grubu da *Micrococcus* cinsi bakteriler olup kok şeklindedirler. Bu bakteriler su, toprak gibi ortamlarda bulunabilir. *Micrococcus* cinsi mikroorganizmalar gram pozitif olup yaklaşık 0.5-3 µm arasında değişen küresel hücrelerdir ve tipik olarak tetrad görünümündedirler. Bu mikroorganizmalar katalaz pozitif, oksidaz pozitif, indol negatif ve sitrat negatiftirler (Kocur *et al.* 1992)

Microoccus cinsi mikroorganizmaların insanda hastalık yaptığı bilinmektedir. 19. yy'da bilinmeyen bir hastalıktan ölen askerlerin dalaklarından *Microcoocus* cinsine ait mikroorganizmalar tespit edilmiştir. "Malta humması ve dalgalı humma" olarak adlandırılan bu hastalıktan korunma yolunun çiğ süt kullanımının önlenmesi olduğu tespit edilmiştir (Gotuzzo and Cellillo, 1992). Bu mikroorganizmanın süt ürünlerinde bozulmaya da neden olduğu da bildirilmiştir (HP. Doddamani, *et al.* 2001). Memeli hayvan derileri *Microoccus* cinsi mikroorganizmaların birincil yaşam alanı olarak kabul edilmektedir. İnsan ve hayvan derilerinin yanı sıra sıçan, rakun, at, domuz, sığır, köpek gibi birçok hayvan derisinden bu bakteriler izole edilmiştir (Kloos *et al.* 1974). *Micrococcus* cinsine ait mikroorganizmalara ait bazı türler zatüre, menenjit gibi hastalıklara yol açabilmektedir. 2004 yılında İngiltere Tehlikeli Patojenler Danışma Komitesi, *Micrococcus* cinsini biyolojik maddeler listesinde 1.Sınıf risk grubuna eklemiştir (Mukamolova *et al.* 2002; Mukamolova *et al.* 2006; Miltiadous and Elisaf, 2011)

Sankarankutty ve Damani, (2018)'de yaptıkları bir çalışmada süt tozundan *Micrococcus aloeverae* izole etmişlerdir.

Beyaz peynir mikroflorasında bulunan mikroorganizma gruplarından birisi de *Burkholderia* cinsi mikroorganizmalardır. *Burkholderia* cinsi bakteriler Walter

Burkholder tarafından bitki köklerinde bulunmuş ve bitkide çürümeye sebep olduğundan bitki patojeni olarak tanımlanmıştır (Burkholder, 1950; Nijhuis *et al.* 1993).

Süt ve süt ürünleri mikroflorasında olan bir başka mikroorganizma olan *Hafnia* cinsi, genellikle gram negatif, zorunlu anaerob ve basil şeklinde mikroorganizmalardır. Bu cinsin üyeleri sağlıklı bireylerin dışkısından, memelilerden, kuşlardan, sürüngenlerden ve balıklardan, gıda, toprak, sudan izole edilmişlerdir (Farmer *et al.* 1985; Ridell *et al.* 1995; Farmer, 2003; Kagkli *et al.* 2007; Padilla *et al.* 2012). *Hafnia* cinsine ait *H. alvei* türü toprakta, kanalizasyonda, suda ve sütte bulunabilmektedir (Farmer *et al.* 1985; Ridell *et al.* 1995; Farmer, 2003). *H. alvei* insanlarda gastroenterit, sepsis ve idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Albert *et al.* 1991; Albert *et al.* 1992; Delbès-Paus *et al.* 2013). Bu bakteriler klinik izolasyonlarda *Serratia* ve *Enterobacter* cinsleriyle benzerlik göstermektedir (Holt *et al.* 1994).

Yapılan çalışmalarda *Serratia marcescens* türlerinin sütü kontamine ettiği görülmüştür (Hayes *et al.* 2001; Ramos and Damasio, 2000; Serial *et al.* 2001). Beyaz peynir mikroflorasında bulunan *Serratia* cinsi mikroorganizmalar *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesidir. *Serratia* cinsinin habitatı ile ilgili kesin bir bilgiye sahip olunmamakla beraber bazı türleri su, toprak, bitki, memeli ve hasta insan örneklerinden izole edilmişlerdir (Farmer *et al.* 1985). İnsanda hastalık yapan türleri bulunmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen türler olmasına rağmen *S. marcescens* insanda patojen özelliği bilinen tek türüdür (Farmer *et al.* 1985; Gill *et al.* 1981).

Serpil BOLAT tarafından 2006 yılında yapılan bir tez çalışmasında beyaz peynir örneklerinde 1 izolatın *Serratia plymuthica*, 5 izolatın *Serratia grimesii* ve 6 izolatın *H. alvei* olduğu tespit edilmiştir.

Beyaz peynir mikroflorasında bulunan *Sphingobium* cinsi mikroorganizmalar gram negatif, aerobik, hareketsiz, spor oluşturmeyen mikroorganizmalardır, genellikle topraktan izole edilmişlerdir ve bu cinse ait bakteriler, aromatik bileşikleri katabolize etme yeteneğine sahiptirler (Lee *et al.* 2015). *Sphingobium* cinsi mikroorganizmalar aslında *Sphingomonas* cinsi mikroorganizmaların 4 ana alt türünden biridir. *Sphingomonas sensu stricto*, *Sphingopyxis* ve *Novosphingobium*

diğer 3 alt türüdür (Takeuchi *et al.* 2001). Kamileri ve arkadaşlarının 2020 yılında keçi sütü üzerine yaptığı bir çalışmada süten *Sphingobium* cinsine ait türleri izole etmiştir (Kamileri *et al.* 2020)

Süt ürünlerinde bulunabilen bir diğer bakteri cinsi ise *Phyllobacterium*'dir. Bu cinsin üyeleri gram negatif, aerobik solunum yapan, oksidaz ve katalaz aktivitesi olan mikroorganizmalardır (Lambert *et al.* 1990). Elizabeth ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada keçi sütünde *Phyllobacterium* cinsi mikroorganizmalara rastlamıştır (Elizabeth *et al.* 2015). *Leifsonia* cinsi de süt ürünlerinde bulunabilen bir bakteri türüdür (Schirmer *et al.* 2013). Bu cinse ait türler sarı renkli, gram pozitif, aerobik, hareketli, kısa çubuk şeklindedirler. Bu cinsin üyeleri süt ve toprak örneklerinden izole edilmişlerdir (Madhaiyan *et al.* 2010).

Beyaz peynir mikroflorasında bulunan bir başka mikroorganizma *Stenotrophomonas* cinsidir. Hugh *et al.* tarafından (1958) tanımlanan *Stenotrophomonas* cinsi, gram negatif, non-fermantatif, aerobik, basil şeklinde, katalaz üretebilen, genellikle oksidaz negatif mikroorganizmalardır. Bu cinsin tek üyesi *Stenotrophomonas maltophilia* türüdür (Dülger ve Berktaş 2007). 1961 yılında *Pseudomonas maltophilia*, 1983 yılında, *Xanthomonas maltophilia*, 1993 yılında ise *Stenotrophomonas maltophilia* olarak olarak adlandırılmıştır (Suilen and Pittet, 1999) Sularda, toprakta, bitkiler ve hayvanların yanı sıra insan dışkısında da sıkça rastlanan bakterilerdir ve hastanelerin yoğun bakımlarından en çok izole edilen gram negatif mikroorganizmalardır. İnek ve koyun sütünde, pastörize sütte, dondurulmuş gıdalarda bulunabilir. *Stenotrophomonas maltophilia* ayrıca balık, tavşan, kertenkele ve kurbağa dışkısında, yılanların barsaklarında, laboratuvar deney hayvanlarının bağırsaklarından da izole edilmiştir (Aydingöz vd. 2006; Kandemir, 2007). Süt örneklerinde, peynirde, pastörize sütte *Stenotrophomonas* cinsi mikroorganizmalara rastlanmıştır (Okuno *et al.* 2018).

Beyaz peynir mikroflorasında bulunan bir diğer bakteri olan *Paenibacillus* cinsine ait türler gram pozitif mikroorganizmalardır. Çeşitli kaynaklardan (insanlardan, hayvanlardan ve bitkilerden) izole edilebilirler. Genellikle toprakta bulunan bu mikroorganizmalar bitki kökleriyle ilişkilendirilmiştir (Ohkuma *et al.* 2003) Bazı türleri omurgasız hayvanlar ve bal arıları için patojenken insanlar için fırsatçı patojenler olarak değerlendirilirler (Morrissey *et al.* 2015). *Paenibacillus* cinsi

mikroorganizmlar, ürettikleri enzimler nedeniyle süt ve süt ürünlerinde bozulmaya yol açmaktadır. Birçok *Paenibacillus* suşu + 4 °C’de iyi gelişmekte ve 10 gün bekledikten sonra çiğ sütteki bakterilerin %95’ini oluşturabilmektedir (Gopal *et al.* 2015). *Paenibacillus* tarafından üretilen enzimler farklı birçok endüstriyel alanda biyoteknolojik olarak kullanılırken; lipazlar, fosfolipazlar ve proteazlar, süt ürünlerinin dokusunu ve lezzetini olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak, süt ürünlerinden izole edilmiş tüm suşların bu enzim aktivitelerine sahip olmadıkları gözlenmiştir. *Paenibacillus stellif*, *Paenibacillus lucanolyticus*, *Paenibacillus amylolyticus*, *Paenibacillus lactis*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Paenibacillus peoriae*, ve *Paenibacillus odorifer*, süttten izole edilen *Paenibacillus* türleridir (Trmčić *et al.* 2015; Sattin *et al.* 2016).

2.3. Beyaz Peynirde Bulunan Patojen Mikroorganizmalar

Beyaz peynir, üretimi sırasında ya da üretim sonrası olgunlaşma sürecinde patojen bakteriler ile kontamine olabilmektedirler. Özellikle çiğ süttten üretilen beyaz peynirlerde patojen bakterilere daha çok rastlanılmaktadır (Leuschner and Boughtflower, 2002).

Karakuş ve Alperden’in (1992) beyaz peynir mikroflorası üzerine yaptığı bir araştırmada *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* cinsine ait mikroorganizmalara rastlanmıştır.

Yapılan başka bir araştırmada ise peynir üretimi sırasında *Shigella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia sp.*, *Aeromonas sp.*, gibi patojenlerle kontamine olabildiği ve *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella spp.*’in üretim sırasında canlı kalabileceği rapor edilmiştir (Freitas-Almeida *et al.* 2002).

Patojen mikroorganizmaların peyniri kontamine etmesi sonucu, peynir yapısal özelliklerinin bir kısmını kaybedebilmektedir. Ayrıca bu mikroorganizmalar tarafından kontamine edilen peynirler tüketildiğinde, gıda zehirlenmeleri görülebilmektedir. Görülen bu gıda zehirlenmelerinin ana kaynağının *E. coli* olduğu bilinmektedir, bunun yanı sıra *Stafilokok*, *Salmonella*, *Streptokok* türleri ile *Bacillus cereus* suşlarının da etkisi olduğu bildirilmiştir (Karakuş ve Alperden, 1992). Ayrıca *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Shigella*, *Brucella spp.*,

Staphylococcus aureus ve enteropatojenik bir mikroorganizma olan *E. coli*, peynirde rastlanan önemli patojenlerin arasındadır (Keskin vd. 2006).

2.3.1. Koliform grubu bakteriler

Enterobacteriaceae ailesi içinde olan koliform grubu bakteriler genellikle, Gram negatif fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, laktozdan asit ve gaz oluşturan basillerdendir. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* ve *E. coli* koliform grubunda yer almaktadır. Gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan bu mikroorganizmaların gıdalarda bulunması pek tercih edilmemektedir. Koliform grubunda yer alan bu mikroorganizmalara çoğu gıda hammaddesinde rastlanmaktadır ve koliform mikroorganizmaların gıda maddelerinde bulunması; kötü hijyen koşullarının, yetersiz pastörize işlemlerinin bir sonucudur (Çakır, 2000a). İnsanların ve bazı hayvanların alt sindirim sistemlerinde bulunan koliformlar ‘fokal koliform’ olarak tanımlanmaktadır ve dışkı kökenli olup genellikle *E. coli*’yi kapsamaktadır. *Enterobacter aerogenes* ve *Klebsiella pneumoniae*’nin de fokal olanları bilinmektedir. Koliform grubunun kalan diğer üyelerinin kökeni toprak ve bitkiler de olabilmektedir. Herhangi bir örnekte fokal koliform veya *E. coli* bakterilerine rastlanması, bu örneğe herhangi bir şekilde dışkı bulaştığı anlamına gelmektedir. Bağırsak kökenli olan *Shigella* ve *Salmonella* gibi patojenlerin de bulunabileceğinin bir göstergesidir. *E. coli* fokal kontaminasyonun olduğunun önemli bir göstergesi olmasının yanı sıra, genetik yapısı en iyi bilinen canlı olmasıyla da bilinmektedir. Suşlarının tümü zararlı olmayan bu mikroorganizmanın, patojen olan türleri insanlarda ve hayvanlarda ishale, menenjitte, enfeksiyonlu yaralara ve birçok immünolojik hastalıklara neden olabilmektedir (Uraz- Gündoğan, 1998). *E. coli*’nin O157:H7 suşu, bu hastalıklardan en sık izole edilen suş olarak bilinmektedir (Çakır, 2000b). *E. coli*’nin inaktif suşları hareketsizdirler, glukozdan gaz oluşturmazlar, laktozu fermente edemezler. Bu özellikleri ile inaktif suşlar *Shigella* cinsine daha yakındırlar (Töreci, 2002).

2.3.2. *Salmonella*

Enterobacteriaceae familyasına üye olan *Salmonella* gram negatif, kapsülsüz, fakültatif anaerob, oksidatif ve fermentatif metabolizmaya sahip, glukoz

ve diğerkarbonhidratlardan asit oluşturabilen, nitrati nitrite redükte eden, üreaz, indol, ornitin ve lizin dekarboksilasyon testleri negatif sitrattan karbon kaynağı olarak yararlanan basillerdir (Carmo *et al.* 2002).

Mikrobiyal gıda zehirlenmelerinde dünyada en sık rastlanan hastalıklardan biri olan salmonelloz, *Salmonella* cinsi bakteriler neden olmaktadır. Salmonellalar insanlarda gastroenterite sebep olabilmektedir. Bu patojenlerin sebep olduğu gastroenterit ölümle bile sonuçlanabilmektedir. Literatüre göre *Salmonella*, ABD’de bir yılda 2-4 milyon kadar vakaya sebep olabilmektedir. *Salmonella*’nın en çok izole edildiğı gıda maddeleri, kıyma, yumurta, süt ve ürünleri, kümes hayvanlarından elde edilen etler ve sosis gibi hayvansal ürünler gelir (Usta Çelebi, 1999). Süt ve süt ürünlerinden *Salmonella*’yı bertaraf etmek için en çok kullanılan yöntem pastörizasyondur. Pastörizasyon işlemi sonucu, çiğ sütte bulunabilecek *Salmonella* bakterileri yok olabilmektedir (Jay, 1992). *Salmonella*, istisnai durumlar dışında pastörizasyon işlemi ile kolayca öldürülebilmesine rağmen, kurumaya, donmaya, kuru ve soğuk ortama dayanabilen en güçlü patojenlerden biridir. Bu sebepten ötürü yetersiz ve doğru yapılmayan pastörizasyon uygulamaları sırasında *Salmonella*, peynir yapımı sırasında gelişebilmekte ve olgunlaşma sırasında 60 günden daha uzun süre canlı kalabilmektedir. *Salmonella*’nın yaşam süresini kısaltan unsurlar olgunlaşma ve depolamada sıcaklığın yükseltilmesidir. pH ve starter kültür aktivitesi de *Salmonella*’nın peynirde yaşam süresini etkileyen unsurlardandır (Ünlütürk, 1998).

2.3.3. *Staphylococcus*

Micrococcaceae familyasına ait *Staphylococcus* cinsi mikroorganizmalar, Gram pozitif, hareketsiz, kapsülsüz, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan ve katalaz pozitif bakterilerdir. *Staphylococcus* türleri tekli hücreler, ikili hücreler, dörtlü hücreler veya kısa zincirler oluşturarak isimlerini bu hücrelerin dizilimlerinden almaktadırlar (Tükel ve Doğan, 2000).

Staphylococcus cinsine ait *S. aureus* türü yapısında bol miktarda tirozin, glutamik asit, lisinaspartik asit bulunduran ve ısıl işlemlere karşı oldukça dayanıklı bir enterotoksin üretebilmektedir (Holeckova *et al.* 2002). Stafilokokal enterotoksinler’lerin (SE) 100 °C’de 10 dakika ısıl işlem gördükten sonra aktiviteleri

%50 oranında korunurken, 121 °C’de 1-2 dakika gördüğü ısı işleminden sonra inaktif hale geldikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Yaygın, 1998). *Staphylococcus*’un 32 tane alt türünün olduğu bilinmektedir. Bunlardan *Staphylococcus epidermis* hastanelerin kliniksel uygulamalarda kullanılan ekipmanlarla dolaşım ve boşaltım sistemini enfekte etmektedir (Mack *et al.* 2013). *Staphylococcus* cinsinin bir diğer üyesi olan *S. aureus* et ve süt ürünleri, balık ve patates gibi protein ve nişasta bakımından zengin gıdalarda gelişebilmektedir. Hijyenik şartlarda üretilmeyen ve saklanmayan gıdaların tüketilmesi, stafilokokal zehirlenmeye sebep olabilmektedir (Holeckova *et al.* 2002). Süt ürünlerinden peynir *S. aureus* zehirlenmelerinin en sık rastlandığı gıda ürünüdür (Demirel ve Karapınar, 2000). Pastörize edilmeyen çiğ sütlerin işlenmesi veya pastörize edilmiş sütün kontaminasyonu, yetersiz starter kültür aktivitesi veya starter kültürün aktivite gösterememesi, bu tür sütlerin işlenmesi ve depolanması sırasında uygun olmayan şartlar sebebiyle peynir tüketiminden kaynaklı stafilokokal gıda zehirlenmeleri dünya üzerinde sıkça karşılaşılan önemli bir problemidir (Rodrigues *et al.* 2017)

2.3.3. *Listeria*

Listeria türleri Gram pozitif, yuvarlak kapsülsüz, spor oluşturmeyen ve fakültatif anaerob olan basillerdir. 6 tane flagellası olan *Listeria*’nın hareketliliği gelişme sıcaklığına bağlı değişebilmektedir. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37 °C olan bakteri 30 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda hareketsizdir (Rocourt, 1994). 7 türü bulunan *Listeria*’nın sadece *L. monocytogenes* türü patojen özellik göstermektedir. *L. grayi*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi* ve *L. ivanovii* türleri insan patojeni değildir (Pintado *et al.* 2005). Doğada oldukça yaygın olarak bulunan *Listeria* cinsi mikroorganizmalara, özellikle toprak, su, çürümüş sebze ve meyvelerde, taze ve işlenmiş et ürünleri, mezbaha artıkları yumuşak peynirler, silaj, lağım, hayvan yemi, çiğ süt gibi örneklerde sıkça rastlanılmaktadır. Patojen olan *L. monocytogenes* bilinen en önemli gıda kaynaklı patojenlerdendir. *L. monocytogenes*, bağışık yanıt oluşturmamayan hastalar başta olmak üzere, hamile kadınlar, yaşlılar ve çocuklarda ölüme kadar gidebilen hastalıklara sebep olabilir. Bu enfeksiyona listeriosis adı verilir. Bu enfeksiyon diğer gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklardan farklı olarak ishal şeklinde değil de menenjit veya hamile kadınlarda

erken doğum gibi atipik şekillerde görülür (Rocourt, 1994; Sarı Mehmetoğlu, 1995; Jayaro and Henning, 2001)

2.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri ilk olarak Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından, 20. yy sonlarında sütte pıhtılaşmaya yol açan bakteriler olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakterileri (LAB) olarak isimlendirilmişlerdir. Daha sonra bu bilim adamı süt ürünleriyle yaptığı bir çalışma ile Nobel Ödülü almıştır (Tamime *et al.* 1980). Daha önceleri ‘süt ekşitici organizmalar’ olarak bilinen laktik asit bakterilerinin ilk saf kültürü, Joseph Lister tarafından 1873’te elde edilen ‘*Bacterium lactis* olmakla birlikte elde edilen bakterinin *Lactococcus lactis* olduğu düşünülmektedir (Salminen and Von Wright, 2004). LAB’leri gelişimleri için mutlaka karbohidrat, amino asit, peptid, nükleik asit türevleri ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar (Kıvanç ve Erikçi, 2018).

Laktik asit bakterileri karbonhidrat fermentasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit üreten çok önemli mikroorganizmalardır. Genel olarak laktik asit bakterileri gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, çubuk ya da kok şeklinde hareketsiz ve *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, düşük pH (3.0-4.0) ve tuz konsantrasyonlarında yaşamlarını sürdürebilen bir mikroorganizma grubudur. Fermentasyon sonucu laktik asit üreten bu bakteriler sitokromları olmadığı için sadece substrat düzeyinde fosforilasyon yaparak enerji elde edebilmektedirler (Burgain vd. 2014). Laktik asit bakterilerine toprakta ve suda hemen hemen hiç rastlanılmazken; süt ve süt ürünleri başta olmak üzere, et ve sebzeler gibi gıda maddelerinde, ağızda, insan ve hayvanların bağırsak sisteminde rastlanılmaktadır. Sindirim sisteminde önemli rol oynayan laktobasiller, gastrointestinal sistemde kolonileşmektedirler (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Laktik asit bakterileri gıdalara ve yemlere eklenerek insan ve hayvan tüketimi için probiyotik olarak ta kullanılmaktadırlar (Gerritse *et al.* 1990). Bu mikroorganizmalar düşük (G+C) guanin, sitozin içeriklerine sahiptirler. Genom büyüklükleri (*Oenococcus oeni*) 1.8Mb ile 3.3Mb (*Lactobacillus plantarum*) arasında değişmektedirler (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Laktik asit bakterileri geleneksel olarak bazı gıdaların ve içeceklerin fermentasyonu için starter kültürler olarak kullanılmaktadırlar. Bu mikroorganizmalar lezzet ve aromaya katkıda bulunurken aynı zamanda içinde bulundukları ürünlerin bozulmasını da geciktirirler. Yiyeceklerde bulunan starter kültürler ürettikleri laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal sayesinde gıdaların korunmasına katkıda bulunmaktadırlar (Holzapfel *et al.* 2001).

Genel olarak fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterilerinin cinsleri; *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* olduğu ifade edilmektedir (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Mikrobiyolojinin henüz bir bilim dalı olarak öne çıktığı zamanlarda mikroorganizmalarla ilgili çalışmaların çoğunluğunun laktik asit bakterilerinin üzerinde yapıldığı bilinmektedir (Holzapfel and Wood, 2014).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması da diğer mikroorganizmaların sınıflandırılması gibi morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre yapılmıştır (Stiles and Holzapfel, 1997). Fermentasyonla oluşturdıkları son ürünlerin cinsi ve miktarına göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılmışlardır (Pot *et al.* 1994; Klein *et al.* 1998). Homofermantatif yolla fermentasyon yapan laktik asit bakterileri Fruktöz Di Fosfat yolu ile glukozu parçalayarak %95-100 oranında laktik asit üretmektedir. Heterofermantatif yolla laktik asit üreten laktik asit bakterileri ise glukozu heksoz mono fosfat yoluyla parçalayarak, etanol, gliserol, asetik asit, CO₂, fruktoz, mannitol ve % 50 laktik asit üretmektedir (Wood and Holzapfel, 1995; Klein *et al.* 1998). Karbonhidrat kaynağını pürivat üzerinden enerji sağlamak ve redoks dengesini kurmak için laktik aside dönüştüren homofermantatif laktik asit bakterileri tereyağı, kefir, yoğurt vb. gıdaların kendilerine has tatlarının oluşmasını sağlamaktadır (Kleerebezem *et al.* 2000).

Eskiden Laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırmasının temeli fizyolojik ve morfolojik özelliklerinin incelenmesine dayanılarak yapılmaktaydı.

Fizyolojik ve morfolojik özelliklerine ek olarak, farklı sıcaklıklarda, tuz konsantrasyonlarında, pH değerlerinde gelişimleri ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özellikler gibi, fenotipik özellikleri de LAB'ların sınıflandırılması için kullanılmaktaydı (Mohanía *et al.* 2008). Fakat geleneksel olarak kullanılan bu methodların günümüzde LAB'ların sınıflandırılmasında yeterli olmayacağı görülmüştür. LAB'lerinin fenotipik özelliklerinden yararlanılarak yapılan sınıflandırmada tür ayrımı yapılamadığından moleküler biyoloji tekniklerine dayanan metotlar kullanılmıştır. Türler arası sınıflandırma için en uygun olan moleküler temelli yöntemler çoğu zaman yalnız nükleik asit seviyesindeki analizler, sınıflandırma sorunlarını çözmektedir (Salminen and Von Wright, 2004).

Tablo2. 1: Lab'ların temel farklı özellikleri (Axelsson, 2004).

CİNS	FERMENTASYON	TEK HÜCRE
<i>Streptococcus</i>	Homofermantatif	Kok
<i>Lactococcus</i>	Homofermantatif	Kok
<i>Leucoostoc</i>	Heterofermantatif	Kok
<i>Enterococcus</i>	Homofermantatif	Kok
<i>Pediococcus</i>	Homofermantatif	Kok
<i>Vagococcus</i>	Homofermantatif	Kok-basil
<i>Lactobacillus</i>	Hem homofermantatif, hem heterofermantatif	Basil
<i>Carnobacterium</i>	Heterofermantatif	Basil
<i>Aerococcus</i>	Homofermantatif	Kok

2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Karakterizasyonunda Kullanılan Özellikler

Laktik asit bakterilerinin karakterizasyonu için yıllardır çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri genel hatlarıyla genotipik, fenotipik ve moleküler olarak farklı yöntemlerle karakterize edilebilirler. Geçmiş yıllarda teknolojinin fazla gelişmiş olmamasından dolayı sadece morfolojik veya fiziksel

yöntemler kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin karakterizasyonunda kullanılan morfolojik yöntemler; gram boyama, endospor boyama, hareketlilik testi, fizyolojik yöntemler; mikroorganizmanın gelişebildiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi, optimum sıcaklığın belirlenmesi, pH aralığının belirlenmesi, gelişebildiği biyokimyasal yöntemler; glukozdan gaz üretimi, oksidaz testi, katalaz testi, arjininden amonyak üretimidir. Laktik asit bakterilerinin tanılanmasında BIOLOG, API (BioMérieux), Enterotube (Roche), MicroScan (Dade Behring), Phoenix (BD) veya CRYSTAL Api (BBL) gibi tanılama kitleri ile fenotipik analizler de yapılabilmektedir.

Fenotipik analiz yöntemleri laktik asit bakterilerini tanılanmasında çok kullanışlı olsa da farklı bakteri grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi öğrenmede benzer genotip gösteren türler arasında hatalı sonuçlar alındığı bilinmektedir. Bu nedenle moleküler yöntemler, fenotipik yöntemlere göre daha doğru sınıflandırma ve ayırım yapma kapasitesine sahiptir (Mc Cartney, 2002). Yaygın kullanılan genotipik yöntemlerden bazıları PCR-RFLP (PCR ürünü restiriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) 16S rRNA analizi, genomik parmak izi analizi, filogenetik analizidir (Kolbert and Persing, 1999). Kullanılan genotipik yöntemler içerisinde sağladığı avantajlar nedeniyle uzun yıllardan beri en sık kullanılan yöntem 16 S rRNA gen bölgesinin analizidir. Bu analizde kullanılan hedef genin fonksiyonu evrim boyunca değişmemiş veya çok az değişikliğe uğramıştır. 16S ribozomal RNA (rRNA) dizileri, mikrobiyoloji ve moleküler evrimde, mikroorganizmaların taksonomik sınıflandırması ve filogenetik analizi için güvenilir bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 16S geninin büyüklüğü yaklaşık olarak 1550 bp'dir. Bu gen bakteriyel ribozomun 30S alt biriminin RNA tamamlayıcısını kodlar. Tüm bakterilerde ortak olarak bulunan 16S rRNA, mikroorganizmaların türünü belirlemek için 9 değişken bölge bulundurur. Değişken bu bölgeler korunmuş bölgelerle çevrelenmiştir. Bu korunmuş bölgeler evrensel primerler kullanılarak, hedef dizilerin PCR'ı yapılmaktadır. Fakat bakterilerin türünü belirlemek için en uygun primerleri belirlemek oldukça önemlidir (Srinivasan *et al.* 2015).

16S rRNA gen dizisi ilk kez 1985 yılında kullanılmıştır (Baker *et al.* 2003; Wang and Qian, 2009) Bu gen dizisinin kullanımı sadece tür tanımlama için değil, türler arası filogenetik ilişkiyi belirlemek için de oldukça önemlidir. 16S

geninin kullanımındaki avantajlar; genin yeterince korunmuş olması, analiz için yeterli kadar bilgiye sahip olması bu genin bütün bakterilerde olması, sekanslanmasının nispeten kolay olması, hızlı ve güvenilir tanımlama sağlamasıdır (Clarridge, 2004)

2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Laktik asit bakterileri doğada yaygın olarak bulunduğundan dolayı, çoğu gıda maddesinde bulunabilmektedir. Özellikle fermente gıdalarda bulunan Laktik asit bakterileri gıdaların korunması için oldukça önemlidir. Fermente gıdaların bu yöntemle korunması en eski gıda muhafaza yöntemlerinden birisidir. Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen farklı sebzelerden üretilen turşular ve fermente et ürünleri laktik asit fermentasyonu ile üretilmekte ve muhafaza edilmektedir. Genellikle süt, laktik asit bakterileri ile ekşi süt, yoğurt, peynir, tereyağı gibi fermente süt ürünlerine işlenmektedir. (Andersson, 1989; Kıvanç ve Erikçi, 2018). Laktik asit bakterileri karbonhidratı fermente ederek bulundukları ortamda pH düşüşüne neden olan laktik asiti üretmektedirler. pH düşmesiyle, ortamın asitliğinin arttırdığı için peynir altı suyunun kolay bir şekilde salınmasını ve gıdaların raf ömrünün uzatarak gıda güvenliğini sağlamaktadır (Ross *et al.* 2000). Peynir mayası olarak kullanılan preparat süt pıhtılaştırıcı enzim kaynağıdır ve kazeinin yıkımından sorumludur. Starter kültür olarak tanımlanan bu preparat peynir ve diğer fermente gıdaların kalitesi, lezzeti ve aromasına peynirde bulunan proteinler ve aminoasitler kadar katkıda bulunur (Wouters *et al.* 2002). Çeşitli gıdaların doğal mikroflorasında bulunan veya starter kültür olarak kullanılan çoğu laktik asit bakterisinin, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara veya gıdaların yapısında ve tadında bozulmaya neden olan mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterebildikleri bulunmuştur (Schillinger and Lücke 1989; Davidson and Hoover 1993).

Laktik asit bakterileri karbonhidrat kaynaklarını fermente ettikten sonra bazı organik asitler (laktik asit ve asetik asit) üretebilmektedir. Gıda mikroflorasında bulunan çoğu mikroorganizma üretilen bu organik asitlere ve asitlik sonucu düşen pH'ya karşı oldukça hassastır. Aerobik gelişme sırasında Laktik asit bakterileri tarafından üretilen Hidrojen peroksit (H_2O_2) çoğu mikroorganizma üzerinde inhibitör bir etki göstermektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal

özellikli proteinler olan bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler de Laktik asit bakterileri ile yakın ilişkili mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki göstermektedir. Alkol, karbondioksit ve diasetil gibi metabolitlerde Laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolitlerden olup bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir. Laktik asit bakterileri bu mekanizmalarla diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite göstermektedir (Andersson 1989; Kıvanç ve Erikçi, 2018).

Laktik asit bakterileri laktik asit ve asetik asit dışında inhibitör maddeler üretme yeteneğine de sahiptirler. Bu maddeler organik asitler, serbest yağ asitleri, formik asit, hidrojen peroksit, diasetil, 2-3 bütandiol, etanol, amonyak, asetoin, asetaldehit, bakteriyolitik enzimler, benzoat, bakteriyosinler, antibiyotikler, ketoglutarik ve melonik asit geniş bir mikroorganizma grubu üzerine antagonistik olduklarından gıda kaynaklı birçok patojene karşı korucu aktivite gösterirler (Schillinger and Lücke 1989; Jay 1992; Juven *et al.* 1992). Laktik asit bakterilerinin karakteristik fermentasyon ürünü olan asetik asit ve laktik asit ortamın pH'sını düşürerek bozulmaya sebep olan ve patojen mikroorganizmaları inaktive etmektedir. Asetik asit çözünürlüğünün yüksek olması sebebiyle laktik asitten daha fazla etki etmektedir. Laktik asit bakterilerinde laktik asit üretimi, aldolaz ve triozfosfat izomeraz enzimlerine sahip olmayanlar yani heterofermentatif ve aldolaz enzimine sahip olanlar yani homofermentatif yolla olmak suretiyle iki farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Laktik asit oluşumu süt ürünlerinin antimikrobiyal özelliğe sahip olmasını ve mikrobiyal kaynaklı gıda bozulmalara karşı sütün ve süt ürünlerinin daha dirençli olmasını sağlamaktadır (Holzapfel *et al.* 1995; Kılıç, 2001). Ayrıca, birçok mikroorganizmanın sporları ve vejetatif hücrelerine karşı öldürücü bir etkiye sahip olan H₂O₂ LAB tarafından laktat, pürivat, oksijen ve NADH varlığında sentezlenmektedir. Yüksüz olan H₂O₂ hücre içine kolayca girebilmektedir. Bu nedenle, H₂O₂'nin bakteriler, bakteri sporları, küfler, mayalar ve virüsler üzerinde antagonistik aktivitesi olduğu bilinmektedir (Russel *et al.* 1992; Holzapfel *et al.* 1995). Diasetil ve asetaldehit Streptokoklar, Laktobasiller, Leukonostoklar ve Pediokok cinsi laktik asit bakterileri tarafından pirüvattan sentezlenen bir diğer antimikrobiyal maddedir. Tereyağı için bilinen en iyi aroma maddesi diasetildir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen diasetil ve asetaldehit gram pozitif

bakterilerin çoğunun üzerinde antibakteriyal etki göstermektedir (Jay, 1982; Daeschel, 1989; Yerlikaya ve Kesentaş, 2009). Yine gliserolden üretilen reuterin gıda patojenlerinden *Salmonella*, *Shigella*, *Trypanosoma*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* gibi mikroorganizmalara, *Candida* türü mayalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Daeschel, 1989). Heterofermantatif laktik asit bakterilerinin hekzосу fermente etmeleri sonucu üretilen Karbondioksit (CO₂) zorunlu aerobik mikroorganizmaların üremelerini engellemektedir (Eom *et al.* 2007; Kılıç, 2008). Ekstraselüler polisakkarit (EPS) zaman zaman gıda teknolojilerinde de önemli avantajlar sağlayan özellikle *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri tarafından üretilen bir diğer maddedir. LAB tarafından üretilen polisakkaritler bulundukları yerlere göre iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grup CPS olarak adlandırılan, patojenite bağlantısı olduğu düşünülen ve hücre yüzeyi ile ilişkili olan kapsüler polisakkaritlerdir. İkinci grup ise hücrelerin çevrelerine salgıladıkları ekstraselüler polisakkaritlerdir (EPS). Bunlar mikrobiyal hücrelerin kurumasını, fagositozunu, faj saldırılarını, hücrelerin antibiyotiklere, osmotik strese ve toksik bileşiklerine karşı koruma sağlamaktadır. Ayrıca hücrelerin biyofilm oluşturabilme ve katı yüzeylere tutunabilmesini sağlamaktadır. Sindirim sisteminden sindirilmeden geçtiği için prebiyotik özellik gösteren EPS'lerin immün sistemi güçlendirici, kolesterolü düşürücü, antitümör ve antiülser etkisinin olduğu bilinmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin gıda endüstrisinde, peynirlerde pıhtılaşma riskini azaltması, yoğurtlarda yapısının gelişmesini sağlaması ve genel olarak gıdalarda güvenli olmalarından dolayı (GRAS) gıda endüstrisinde oldukça ilgi çekmektedirler. Bu sebepten ötürü termofilik türlerden *L. helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* ve mezofilik türlerden *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* tarafından üretilen EPS'lere olan ilgi oldukça artmıştır (Broadbent *et al.* 2001; Koraklı, 2002; Tallon *et al.* 2003; Madieto and Reyes-Gavilan, 2005). Son yapılan araştırmalarla LAB'ların antimikrobiyal özelliğini arttıran en önemli bileşiklerden birinin bakteriyosinler olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyosinler, bakteriler küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Bakteriler tarafından sentezlenen antimikrobiyal etkiye, katyonik peptid ve hidrofobik özellikleri bulunmaktadır. Gram (-) bakterilere, küflere ve mayalara etki etmezken genellikle Gram (+) bakteriler üzerine etki etmektedir. Bakteriyosinler

antibiyotiklerle karıştırılmamalıdır. Çünkü antibiyotikler enzimatik işlemlerden sonra aktif forma sahip olurken bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenmektedir. Nisin, bulgarikan, diplokokin, laktasin asidofilin, helvetisin, ve plantarisin bilinen önemli bakteriyosinlerdendir. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin, *Clostridium sporogenes* üzerine antagonist etkiye sahiptir ve gıdalarda biyokoruyucu olarak bilinen bir bakteriyosindir (Nes *et al.* 2002).

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, Nes vd. (1996) tarafından kimyasal yapısı, ısı stabilitesi, etki mekanizması ve molekül büyüklüğü gibi birçok faktör göz önüne alınarak şu şekilde sınıflandırılmıştır;

- i. Post-translasyonel modifiye bakteriyosinler (lantibiyotikler),
- ii. Küçük (<10 kDa) ısıya dayanıklı membran aktif bakteriyosinler,
- iii. Büyük (>30 kDa) ısıya duyarlı bakteriyosinler,
- iv. Protein kısmına lipit ve karbonhidrat ilaveli kompleks bakteriyosinleri olmak üzere 4 sınıf altında toplanmıştır.

2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Cinsleri

2.8.1. *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus cinsi bakteriler laktik asit bakterilerinin en önemli cinslerindendir. *Lactobacillus* cinsi bakteriler Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyan, çubuk şeklinde mikroorganizmalardır. Karbon kaynağı olarak glukozu kullanan bu mikroorganizmalar, pH 5.50-5.80 arasında, 5-53 °C’de gelişim gösterebilmektedirler (Hasan, 2001). Homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki çeşidi olan bu cinsin homofermentatif olanları %80’den fazla laktik asit üretirken, heterofermentatif olanlar ise etanol, asetik asit ve karbondioksidin yanında bir miktar da laktik asit üretebilmektedirler. Bu cinsin üyeleri genel olarak süt ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. 80 farklı türü olduğu bilinen bu cinsin yaklaşık 20 türünün süt ürünleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Coeuret *et al.* 2003). Ayrıca bitkilerde, hayvanlarda ve insanlar sindirim sisteminin doğal mikroflorasında da *Lactobacillus* cinsi bakteriler bulunmaktadır (Adams and Moss 2004).

2.8.2. *Lactococcus spp.*

Lactococcus cinsi bakteriler Gram pozitif, kok şeklinde, hareketsiz, sporsuz bakterilerdir. 10-45 °C arasında gelişim göstermekle birlikte, optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C' dir. Bu cinsin üyeleri yoğurt, süt, kefir, tereyağı ve krema gibi süt ürünlerinin teknolojisinde kullanılmaktadırlar (Teuber and Geis, 2006). Bitkiler, hayvan ve insanlarda yaygın olarak bulunan *Lactococcus*lar glukozdan sadece L (+) laktik asit üreten LAB cinsidir. *Lactococcus lactis*, *L. piscium*, *L. garvieae*, *L. raffinolactis* ve *L. plantarum* *Lactococcus* cinsine ait türlerdir (Stiles and Holzapfel 1997; Chen *et al.* 2013)

2.8.3. *Enterococcus spp.*

Gram pozitif, oksidaz ve katalaz negatif, aerobik ve fakültatif anaerobik olan bu bakterilerin çoğunun gelişme gösterdikleri pH (4.0-9.60) aralığı oldukça geniştir. %6,0-6.50 arasındaki tuz konsantrasyonlarda, 10-50 °C sıcaklık aralığında gelişim göstermektedirler. Enterokoklar fruktoz, maltoz, galaktoz, sellebiyoz, melibiyoz ve laktozdan asit üretme yeteneğine sahiptirler (Kılıç, 2008). 1899 yılında Thiercelin tarafından bağırsak mikroorganizması olarak tanımlanan *Enterococcus*lar insanların ve hayvanların bağırsaklarında doğal olarak bulunmaktadır. *Enterococcus*ların *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans*, cinslerinin olduğu bilinmektedir (Franz ve ark. 1999). *Enterococcus* cinsi mikroorganizmaların bazı türleri bakteriyosin üretme yeteneklerinden ve ayrıca probiyotik olarak kullanılmalarından dolayı gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler (Franz *et al.* 1999, Abriouel *et al.* 2005).

2.8.4. *Leuconostoc spp.*

Leuconostoc cinsi bakteriler genellikle kok şeklinde yuvarlak, Gram pozitif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen mikroorganizmalardır. Heterofermantatif yolla glukozu D (-) laktik aside, etanole ve karbondioksit dönüştürürler, *Lactococcus*lardan D(-) laktat oluşturmaları sebebiyle ayrılırlar. Bu cinsin etil alkol yerine asetik asit oluşturabilen türleri de bulunmaktadır. 20-30 °C'de gelişim gösterebilirler ve süt ve süt ürünlerinin kültürlerinde bu mikroorganizmaların türlerine rastlanmaktadır (Tekinşen, 1994; Eom *et al.* 2007)

2.8.5. *Pediococcus*, *Aerococcus* ve *Tetragenococcus* spp.

Bu bakteriler Gram pozitif, kok şeklinde, oksidaz ve katalaz negatiftirler. *Pediococcus* cinsine ait türler genellikle tuza karşı oldukça dayanıklıdır. Optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C'dir. Pastörizasyon sonrasında da varlıklarını sürdürebilmektedirler (Stiles and Holzapfel, 1997). Gıda teknolojisi alanında pek fazla ilgi görmeyen *Aerococcus* cinsi mikroorganizmaların *Aerococcus urinae*, *A. viridans*, *A. sanguinicola* cinsleri bulunmaktadır (Salminen and Von Wright, 2004). *Tetragenococcus* cinsine ait bakteriler yüksek tuz konsantrasyonlarında (%18 NaCl) gelişme gösterdikleri için soya sosu gibi yüksek tuz içeren gıdaların laktik asit fermentasyonunda oldukça önemlidirler (Erten vd. 2014; Negm, 2018).

2.8.6. *Streptococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* spp.

Streptococcus thermophilus gıdayla ilişkili tek *Streptococcus* cinsidir ve yoğurt üretiminin yanı sıra bazı peynir türlerinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Hardie and Whiley, 1995). *Vagococcus* türleri yeni tanımlanmış bir tür olup *Lactococcus*lar ile benzerlik göstermektedir fakat içerdiği yağ asidi bileşimi sayesinde birbirilerinden ayrılabilirler (Pot *et al.* 1994). Bu türün bazı üyeleri tavuk dışkısı ve nehir sularından da izole edilmişlerdir (Stiles and Holzapfel, 1997).

Fermente sucuklardan izole edilip taksonomik tanımlanması yapılamamış olan *Weisella* ilk olarak *Leuconostoc* cinsi bakterilere benzetilmiş, yapılan genetik çalışmalardan sonra farklı bir cins olduğu belirlenmiş ve 13 tür tespit edilmiştir (Stiles and Holzapfel 1997; Tangüler ve Erten, 2006).

2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Starter Kültür Olarak Kullanılması

Fermentasyon yüz yıllar önce peynir üretiminde kullanılmıştır. Daha sonraları alkol fermentasyonu ile şarap üretilmiştir. Fakat o zamanlar gerçekleşen fermentasyon olayında mikroorganizmaların rolü henüz keşfedilmemiştir. Pastörizasyonun keşfinden sonra fermentasyon olayını gerçekleştiren mikroorganizmaların olabileceği düşünülmüştür ve araştırmalar yapılmıştır (Ross *et al.* 2002).

Beyaz peynirin endüstriyel olarak üretilmesinde genellikle pastörize süt kullanılmaktadır. Bu sebepten dolayı üretilen peynirde kullanılan starter kültür oldukça önemlidir. Starter kültür, fermente gıdalarda, hammadde de arzu edilen aromanın, yapının, görünüşün olabilmesi için dışardan eklenen mikroorganizmalardır. İnsan sağlığına zararı yoktur aksine faydalı olmaktadır. Kullanılan starter kültür; olgunlaşma sürecinde olan biyokimyasal değişiklikler, asit üretimi, peynirin tadı gibi birçok faktör üzerinde etki göstermektedir. Ayrıca peynirde bulunabilecek patojen ve koliform grubu bakterilerin inhibisyonu açısından olumlu etkileri de olmaktadır (Pappas *et al.* 1996a; Dağdemir, 2006;).

Beyaz peynirin üretiminde her ne kadar kullanılan sütün çeşidi, kullanılan endüstriyel yöntem, sıcaklığı, olgunlaşma süresi, pH gibi faktörler etkili olsa da peynirin kendine özgü tat, koku ve yapısı üzerine starter kültür olarak eklenen mikroorganizmaların rolleri oldukça önem taşımaktadır (Şengül, 2001).

Tablo 2. 2: Beyaz peynirde kullanılan starter bakteriler (Alperden ve Karakuş 1995, Akgün 1995; Gürsoy vd. 2001)

Beyaz peynirde kullanılan starter bakteriler	
<i>Lactococcus lactis ssp. Cremoris</i>	<i>L. lactis ssp. lactis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus. sake</i>
<i>L. lactis ssp. lactis biovar</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus casei 30R7</i>

Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanılan başlıca grupları mezofilik starter kültürler ve termofilik starter kültürlerdir. Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileriden oluşan, 18-30 °C arasında optimum gelişme gösteren bu mezofilik starter kültürler 45 °C'nin üzerinde gelişemezler. Bu starter kültürler genel olarak taze peynir çeşitlerinin üretiminde kullanılır. Genel olarak *Lactococcus* cinsi bakterilerdir. Fakat bazı peynir çeşitlerinin üretiminde mezofil *Lactobacillus* cinsi bakteriler de kullanılabilmektedir (Üçüncü, 2010).

Tablo 2. 3: Bazı süt ürünlerinde kullanılan mezofilik kültürler (Wegner, 1981; Spreer,1988).

Süt rnleri	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)	Mikroorganizma
Tereyağı	22-30	<i>Lactococcus lactitis subsp. lactis</i>
	28-32	<i>Lactococcus lactitis subsp. cremoris</i>
Peynir	25	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>
Yayık altı süt ürünü	28-32	<i>Lactococcus lactitis subsp. diacetylactis</i>

Bir diğer grup olan termofilik starter kültürler ise genellikle kaar peyniri gibi telemesi işlem gören sert peynir çeşitlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Termofilik kültürler pH'yı drmeleri ve antimikrobiyal maddeler üretmelerinden dolayı bakterisit özellik gösterirler. Proteinleri aminoasitlere kadar parçalayabilen termofilik starter kültürlerin proteolitik aktiviteleri de yüksektir (nc, 2010).

Tablo2. 4: Bazı süt ürünlerinde kullanılan termofilik kültürler (Wegner, 1981; Spreer,1988).

Süt rnleri	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)	Mikroorganizma
Yoğurt	38-40	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
	28-32	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Peynir	42°	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	37	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Pıhtısı halanan	40-45	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>

3. MATERYAL VE METHOD

3.1. Araştırmada Kullanılan Beyaz Peynir Örnekleri

Ağrı İli'ni temsil edecek şekilde 8 farklı bölgeye has olan yöresel beyaz peynir örnekleri toplandı. Toplanan örnekler steril numune torbalarına alınarak laboratuvara getirilmiştir ve analiz sürecine kadar +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1: Yöresel beyaz peynir

3.2. Besiyerleri ve Çözeltiler

Tez çalışması boyunca kullanılan besiyerleri; M17 broth ve agar, Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve agar, TSA broth ve agar, Nutrient broth. Çalışmamızda kullanılan bu besiyerleri Merck Türkiye'den sağlanmıştır.

3.2.1. MRS Agar (Merck 1.10660)

Kazein peptonu 10,0 g/L; maya ekstratı 4,0 g/L; tween 80 1,0 g/L; et ekstratı 10,0 g/L K_2HPO_4 2,0 g/L; di-amonyum hidrojen sitrat 2,0 g/L; sodyum asetat 5,0 g/L; $MgSO_4$ 0,2 g/L; D (+) glukoz 20,0 g/L; $MnSO_4$ 0,04 g/L; dehidre besiyeri 68,2 g/L; agar-agar 14,0 g/L olacak şekilde saf su içinde çözdürüldükten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Soğuyan besiyeri steril petri kutularına dökülmüştür.

3.2.2. MRS Broht (Merck 1.10661)

Kazein peptonu 10,0 g/L; sodyum asetat 5,0 g/L; et ekstratı 8,0 g/L; $MgSO_4$ 0,2 g/L; maya ekstratı 4,0 g/L; K_2HPO_4 2,0 g/L; tween 80 1,0 g/L; di-amonyum hidrojen sitrat 2,0 g/L; D (+) glukoz 20,0 g/L; $MnSO_4$ 0,04 g/L dehidre besiyeri 52,2

g/L olacak şekilde saf su içinde eritilip tüplere uygun miktarda dağıtıldıktan sonra 121 °C de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.2.3. TSA Agar (Merck 1.05458)

Kazein peptonu 15,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; agar-agar 15,0 g/L. dehidre besiyeri, 40,0 g/L; pepton from soymeal 5,0 g/L; olacak şekilde saf su içinde ısıtılarak çözdürülüp, 121 °C’de 15 dk Otoklavda steril edildikten sonra steril petri kutularına dökülmüştür.

3.2.4. TSB Broth (Merck 1.05459)

Kazein peptonu 17,0 g/L; D (+) glukoz 2,5 g/L; K₂HPO₄ 2,5 g/L; dehidre besiyeri, NaCl 5,0 g/L; 30,0 g/L; pepton from soymeal 3,0 g/L; olacak şekilde saf su içinde ısıtılarak çözdürülüp, uygun miktarlarda tüplere bölüştürülüp otoklavda 121 ° C’de 15 dk steril edilmiştir.

3.2.5. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Et peptonu 5,0 g/L; dehidre besiyeri, 8,0 g/L; et ekstratı 3,0 g/L olacak şekilde saf su içinde ısıtılarak çözdürülüp, uygun miktarlarda tüplere dağıtılıp otoklavda 12 ° C’de 15 dk steril edilmiştir.

3.2.6. Brom timol mavisi

Bir pH indikatörü olan brom timol mavisi pH 6.0’da sarı ve pH 7.6’da maviye renk değişimi sağladığından, glikozdan asit üretimi testinde kullanıldı. 100 mg brom timol mavisi, %50’lik 100 ml etanolde çözünerek hazırlanmıştır ve 100 ml besiyerine 0.1 gr eklenmesi şeklinde kullanılmıştır.

3.2.7. 10X TBE hazırlama

Trise base 121.1 gr borik asit 61.8 gr, EDTA 7.4 gr ve üzerine 1 L distile suda çözerek hazırlanmıştır. Çalışma sırasında solüsyona ihtiyaç duyulduğunda bu çözeltiden seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2.8. Agaroz jel hazırlama

Agaroz jel genelde %0,9-1'lik olarak kullanılmaktadır. 1 gr agaroz üzerine 100 ml %1'lik TBE ilave edilerek mikro dalga fırında 1 dk eritildikten sonra 1 µl etidyum bromit karıştırılarak hazırlanan jel elektroforez tankına dökülüp, hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra donması beklenmiştir.

3.2.9. %3'lük KOH çözeltisi hazırlama

100 ml steril saf su içerisine 3 gr KOH eklendikten sonra karıştırıcıda çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.10 Tetrasiklin antibiyotiği

100 µg/ml için 1 mg tetrasiklin hassas terazide tartılarak 1 ml DMSO içinde çözdürüldükten sonra 10 ml ddH₂O eklenerek çözelti hazır hale getirilmiştir.

3.2.11 Neomisin antibiyotiği

100 µg/ml için 1 mg neomisin hassas terazide tartılarak 1 ml DMSO içinde çözdürüldükten sonra 10 ml ddH₂O eklenerek çözelti hazır hale getirilmiştir.

3.3. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Aseptik şartlarda steril torbalara alınan peynir örnekleri hassas terazide 1 gr tartıldıktan sonra 10^{-10} - 10^{-15} oranlarında %2'lik NaCl ile dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu dilüsyonlardan MRS ve M17 agara yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra 30 °C 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda gelişmiş olan koloniler gözlemlenerek farklı morfolojide olduğu düşünülen izolatlar seçilerek yeni petrilere ekim yapılmıştır. Koloniler saf olarak elde edilene kadar bu işlem tekrarlanmıştır (Batdorj *et al.* 2006; İşleroğlu vd. 2008).

3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Stoğa Alınması

Saf kültür olduğuna emin olunan kolonilerden 100 ml'lik stok besiyerine (4g/L nutrient broth ve 15 ml gliserol) bir öze dolusu eklenmiştir. Daha sonra koloniler EC şeklinde kodlanarak önce -20 °C'de 1-2 saat bekletildikten sonra -80

°C konularak, daha sonra yapılacak olan çalışmalar için muhafaza edilmiştir. (Batdorj *et al.* 2006; İşleroğlu vd. 2008).

3.5. Laktik Asit Bakterilerine Uygulanan Testler

3.5.1. Morfoloji ve hareketlilik testi

Saf kültürlerden alınan bakteriler bir damla steril su ile lam üzerine iyice yayılarak hava kabarcığı olmadan lamel ile kapatılarak mikroskopta bakteri morfolojisini öğrenmek amacıyla incelemeler yapılmıştır.

3.5.2. Farklı pH’da gelişim (4.0-7.20-9.0)

M17 ve MRS broth besiyerleri NaOH ve HCl kullanılarak pH’ları 4.0, 7.20, 9.0 olarak ayarlanmıştır ve tüplere 5 ml eklenerek 121 °C de 15 dakika otoklavlanmıştır. Daha önceden stok kültürlerden MRS ve M17 broth besiyerinde ekilip 24 saat inkübasyona bırakılmış bakterilerden 50 µl eklenmiştir. 30 °C 24 saat bekletildikten sonra spektrofotometrede 600 nm’de ölçüm yapılmıştır (Tunail *et al.* 2001; Fortina *et al.* 2003; Halkman 2005).

3.5.3. Katalaz testi

Aerobik solunum yapan mikroorganizmalarda katalaz enzimi bulunmaktadır. Bakteri üzerine H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatıldığında gaz kabarcığı oluşuyorsa bu hidrojen peroksit ayrışması sonucu gözlemlenen serbest oksijenlerin varlığını göstermektedir. MRS ve M17 agarda gelişen saf koloniler üzerine 1 ml %3’lük H₂O₂ damlatılarak gaz kabarcıkları oluşup oluşmadığına göre değerlendirilmiştir. Eğer gaz kabarcığı varsa mikroorganizma katalaz pozitif (+), yoksa katalaz negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Pichhardt, 2004, Kıran, 2006).

3.5.4. Glukozdan gaz üretimi

Laktik asit bakterilerinin glukozdan gaz üretimini (CO₂) anlamak için yapılmıştır. Laktik asit bakterilerinin geliştiği MRS ya da M17 besiyerine 1 gr glukoz eklenerek pH:7.2’ye ayarlanmıştır. İçinde durham tüpü bulunan tüplere konularak, otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiştir. Steril edildikten sonra MRS ve M17 agarda gelişen bakteriler iğne öze yardımı ile alınarak tüplere ekilmiş ve 30 °C de 48

saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra tüplerde gaz oluşturan izolatlar pozitif (heterofermentatif), oluşturmayanlar negatif (homofermentatif) olarak sınıflandırılmıştır (Müller *et al.* 1990; Fortina *et al.* 2003).

3.5.3. Eskulin analizi

Hazırlanan eskulin agar 121 °C' de 15 dk steril edildikten sonra petrilere dökülmüş ve MRS-M17 agarda gelişen izolatlardan öze ile ekim yapılarak bu ekimler 30 °C' de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sarı renkte olan besiyerlerini siyaha çeviren izolatlar eskulin pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5.4. Nişasta hidrolizi

Çoğu laktik asit bakterisi, amilolitik aktivitenin eksikliğinden dolayı nişastayı parçalayamamaktadır. Parçalayabilen LAB'lar ise amilolitik laktik asit bakterileri (ALAB) olarak tanımlanmaktadır (Asoodeh *et al.* 2010).

Nişasta hidroliz testi, izolatlarda amilaz varlığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Daha önceden MRS-M17 agarda gelişen izolatlar, nişasta eklenmiş besiyerine ekildi. 30 °C'de 24-72 saat inkübasyon sonrası gelişen koloniler üzerine lügol çözeltisi damlatılmıştır. 5 dk bekledikten sonra lügol rengini açan izolatlar pozitif, açmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.5.5. Kazein hidrolizi

Laktik asit bakterilerinin gelişmesi için gerekli olan bazı aminoasitler ve peptitler vardır. LAB'ların sahip olduğu proteolitik aktiviteler sayesinde, gelişmeleri için gerekli olan amino asit ve peptitleri, proteoliz ürünlerinden elde edebilmektedir. Sütün temel proteini olan kazein bu bileşiklerin başında gelmektedir (Mc sweeney, 2004).

Kazein hidroliz testi, çalışmada izole edilen mikroorganizmaların proteolitik aktivitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Daha önceden MRS-M17 agarda gelişen izolatlar, kazein içeren besiyerine iğne uçlu öze yardımıyla ekilmiş ve 30 °C'de 24-72 saat inkübasyondan sonra çökme durumuna göre değerlendirilmiştir. Besiyerinde çökme olan izolatlar pozitif, olmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.5.6. Şeker fermantasyon testleri

Şeker fermantasyon testi için MRS- M17 fermantasyon besiyeri kullanılmıştır (Harrigan and Mc Cance, 1966). Daha önceden MRS-M17 agarda gelişen izolatlar, iğne uçlu öze ile besiyerine ekilmiş ve 30 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde tüplerdeki renk değişimi incelenmiştir (Tunail *et al.* 2001). Şeker fermantasyon testinde, maltoz, ksiloz, galaktoz, monnitol şekerleri kullanılmıştır

3.5.7. Safra tuzuna direnç testi

Bağırsak sisteminde uygun bir ortam sağlayabilmek için gastrointestinal sistem boyunca belirli stres zorluklarıyla başa çıkılmalıdır. Safra tuzu ince bağırsak ortamı için en önemli bileşiklerden biridir. Kolesterolün suda çözünebilen son ürünü olan safra tuzu karaciğerdeki amino asitler glisin veya taurin, konjuge safra tuzlarını oluşturur. Safra depolanarak sindirim sırasında safra kesesine geçer ve oradan on iki parmak bağırsağına akar (500-700 mL/gün) böylece diyet yağlarının sindirimini ve emilimini kolaylaştırır. Safra tuzu aynı zamanda bağırsak ortamına adapte olmayan mikroorganizmalar için oldukça toksiktir. Bu sebeple probiyotik olan laktik asit bakterileri için en önemli özelliklerden biri safra toleransıdır. Bu bakteriler sahip oldukları spesifik savunma sistemleri safra tuzu içeren ortamlarda da hayatta kalabilirler (Başyigit, 2004; Lara- Flores, 2011).

Bağırsaktaki safra konsantrasyonu % 0,3 (w/v) olup besinlerin ince bağırsakta kalma süreleri yaklaşık 4 saattir. Bakteri suşları % 0,05-0,3-0,5 safra tuzuyla zenginleştirilmiş MRS-M17 broth ortamına inoküle edilerek 30 °C’de inkübe edilmiştir. 24-48 saat inkübasyon sonunda izolatların gelişip gelişmediğine göre safra tuzu toleransları değerlendirilmiştir.

3.5.8. Antibiyotik direnç testleri

İzolatları antibiyotik duyarlılığı disk difüzyon testiyle değerlendirilmiştir. İzolatlar stoktan canlandırılmak üzere petrilere ekildikten sonra ortasına antibiyotik diskleri (neomisin ve terasiklin) yerleştirilmiştir. Daha sonra 30 °C ‘de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda büyüme inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır (Sanchez *et al.* 2011).

3.5.9. Antagonistik aktivite testleri

İzole edilen tüm izolatların *Escherichia coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *K. pnömoni*, *A. baumannii* üzerine antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Patojen bakteriler NA agarda 34 °C’de 24 saat inoküle edilmiştir. Aynı zamanda laktik asit bakterileri de stok kültürlerden 30° C’de 24 saat canlandırıldıktan sonra uygun sıvı besiyerinde, 24 saat yeniden inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 14000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra hücresiz solüsyon elde edilmiştir. Elde edilen supernatant steril disklerle emdirilerek patojen bakterileri içeren petrilere yerleştirilmiş petriler 22 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu oluşan, inhibisyon zonları ölçülerek kaydedilmiştir (Allameh *et al.* 2012; Kherraz *et al.* 2012).

3.5.10. Genomik DNA izolasyonu

İzolatların genomik DNA izolasyonu Dr. Kunte (2005) tarafından uyarlanan metoda göre yapılmıştır. Protokol sırasında sırasıyla izlenen işlemler aşağıda verilmiştir;

- 30 °C’de MRS ve M17 broth da gelişen izolatlar 2 ml ependorflara alınıp santrifüjlendi.
- Santrifüjlenen besiyerinden süpernatant uzaklaştırıldı.
- Eppendorfa 1 ml TES tamponu koyularak süspanse edildi.
- 14000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant tekrar uzaklaştırıldı.
- Hücreler tekrar 800 µl TES buffer ile süspanse edildi. Bu işlem üst faz berraklaşana kadar tekrar edildi.
- Hazırlanan süspansiyona 20 µl % 20’lik SDS eklenerek tekrardan süspanse edildi ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
- 300 µl (1:1) fenol:kloroform eklenerek süspanse edildi.
- 300 µl fenal kloroform izoamiloalkol eklenerek süspanse edildi ve 14000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice farklı bir ependorfa alındı.

- Süpernatant (500-600 µl olacak şekilde) hacminin 1/10'u kadar Na-asetat, süpernatant hacmi kadar da 2-izopropanol eklenerek -20 °C'de 30 dk bekletildi.
- Solusyon 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Kalan hücrelere %70'lik 500 µl etanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Tüplerin ağzı açık şekilde, ısıtıcı blokta 10 dk 60 °C'de bekletilerek kalan etanolün uçması beklendi.
- Süre sonunda pelete 50 µl TE Buffer'da süspanse edildi ve çok kısa vortekslendi, 10 dk 70° C'de inkübasyona bırakıldı ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.
- Çalışmalarda kullanılmak üzere örnekler +4 C'ye alındı (Kunte, 2005).

3.5.11. Bakteri izolatlarının 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Test izolatlarından elde edilen genomik DNA PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda MacroGen primerleri **149R ve 27F (1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')** kullanılmıştır. Reaksiyon için gerekli mix **Tablo.3.1**'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Reaksiyon için gerekli miktarlar

50 µL mix için kullanılan oranlar	
ddH ₂ O	28.9 µL
DMSO	5 µL
Buffer	6 µL
dNTP	1 µL
MgCl ₂	3.6 µL
R-primer	2 µL
F-primer	2 µL
Tag DNA polimeraz	1 µL
DNA	0.5 µL

PCR reaksiyonu için hazırlanan bakterinin 16S gen bölgesi, ilk olarak 5 dk 95 °C’de tutulduktan sonra iki DNA ipliğinin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından 60 s 94°C’de 35 döngü ile DNA’nın denatürasyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından primerlerin DNA’ya bağlanması için 60 s 54 °C’de tutulmuştur. Bir sonraki basamakta örnekler 120 s 72 °C’de tutularak DNA’nın uzaması sağlanmıştır. En son basamakta 5 dk 72 °C’de tutulan örnekler PCR cihazından alınarak +4°C’de buzdolabında bekletilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde analiz edilmiştir. 100 ml 0,5X TBE (%1’lik agaroz jel) tamponuna 1 gr agaroz eklenerek karışım mikrodalga fırında 2 dk eritilmiştir. 50 °C’ye soğutularak içerisine 3 µl ethidium bromür ilave edilerek içerine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez küvetine kabarcık oluşmadan dökülmüştür. 30-35 dk. sonra tarak dikkatlice çıkarılarak kuyucuklardan ilk başta olana 10 kb DNA markırı (50-10 000 baz) 10 µl olarak yüklenmiştir, diğer kuyucuklara da her bir örnek için 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılan 10 µl örnek yüklenerek 90 volta ayarlanan elektroforez cihazında 1.5 saat yürütülmüştür. Etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel görüntüleme cihazı (Quantum ST4 VILBER LOURMAT) ile bilgisayar ortamında görüntülenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda bazı bakteri izolatlarının genomik DNA izolasyonları yapılmış ve agaroz jelde DNA görüntülenmiş fakat 16S rRNA gen bölgesi pcr sonucu çıkmadığından çıkmayan bu bakteri örneklerinin 16S rRNA gen bölgelerini pcr ile çoğaltmak için kloni pcr yöntemi ile bu bölge çoğaltılmıştır.

3.5.12. Bakteri izolatlarının kolony PCR’ı

- 24 saat geliştirilmiş bakteri kültürlerinden iğne uçlu öze ile çok az bakteri alınarak PCR tüplerinin dip cidarına bırakılmıştır.
- PCR tüplerine 10 µl steril saf su eklenerek bakteriler iyice süspanse edilmiştir.
- Ardından 2 dk sonikatörde, 5 dk -80’de bekletilmiştir. Bu döngü 3 defa tekrarlanmıştır.
- PCR tüplerine **Çizelge.3.5** ‘de yazan master mixten 35 µl eklenerek 96 °C’de 10 dk tutulmuştur.

- Süre sonunda her tüp için 4,5 µL steril saf suya 0,5 µl taq polimeraz enzimi eklenerek PCR tüplerine dağıtılmıştır. Daha sonra normal PCR döngüsü başlatılmıştır.
- Çoğaltılmak istenen 16S bölgesi PCR reaksiyonu için belirlenen örnekler, PCR termal döngü cihazında, ilk olarak 95 °C’de 5 dk ön denetürasyonda tutulduktan sonra, 94°C’de 60 sn 30 döngü olacak şekilde denatürasyonu gerçekleşti. Primerlerin bağlanması için 54 °C’de 60 sn’de tutuldu ve 72 °C’de 120 sn uzama basamağı gerçekleşti. Son olarak örnekler 72 °C’de 5 dk daha bekletildi. Kurulan programla istenilen bölgelerin çoğaltılması yapılmıştır.

Tablo3.2: Kolony PCR için gerekli miktarlar

35 µL mix için oranlar	
ddH₂O	15,4 µL
DMSO	5 µL
Buffer	6 µL
dNTP	1 µL
MgCl₂	3.6 µL
R-primer	2 µL
F-primer	2 µL

3.5.13. 16s rDNA sekans analizi

Sekans analizi Ankara’da bulunan BM LAB firmasına gönderilerek hizmet alımı ile yapılmıştır ve elde edilen sekanslar değerlendirilerek bakteri izolatları için Genbank numaraları alınmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Ağrı yöresini temsil edecek şekilde 8 farklı ilçeden alınan peynir örnekleri, aseptik şartlarda laboratuvara getirildi. 1 gr peynir tartılıp parçalandıktan sonra % 2 fizyolojik suda 10^{-12} - 10^{-15} oranında dilüsyon yapıldı. Hazırlanan dilüsyonlardan steril edilen MRS ve M17 agara ekim yapıldı. M17 ve MRS agara yapılan ekimlerde birbirinden farklı olarak gözlemlenen koloniler seçilip saf kültürleri elde edilene kadar ekimi yapıldı.

Aynı morfolojiye sahip olan koloniler Elif COŞKUN (EC) şeklinde kodlanarak stok çözelti içine alındı ve çalışmalarda kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

4.1.1. Gram boyama

Stoktan canlandırılan izolatların 18-24 saatlik genç kültürleri Şimşek (2003) ve Kostinek *et al.* (2007) metoduna göre test edildi ve menekşe renkli koloniler Gram (+) olarak değerlendirildi.

Tablo4.1: İzolatların gram özellikleri

İzolat Kodu	Gram Özelliği	İzolat Kodu	Gram Özelliği
EC1	+	EC30	+
EC2	+	EC31	+
EC3	+	EC32	-
EC4	-	EC33	+
EC5	+	EC35	+
EC6	+	EC36	-
EC7	+	EC37	-
EC8	+	EC38	+
EC9	+	EC39	+
EC10	+	EC40	+
EC11	+	EC41	-
EC12	+	EC42	-
EC13	+	EC43	-
EC14	-	EC44	-
EC15	-	EC45	-
EC17	-	EC47	+
EC18	+	EC49	+
EC19	+	EC50	+
EC20	+	EC51	+
EC21	+	EC54	+
EC22	+	EC57	-
EC23	+	EC59	-
EC24	+	EC61	+
EC25	+	EC62	-
EC26	-	EC64	+
EC27	+	EC65	+
EC28	+	EC67	+
EC29	-		

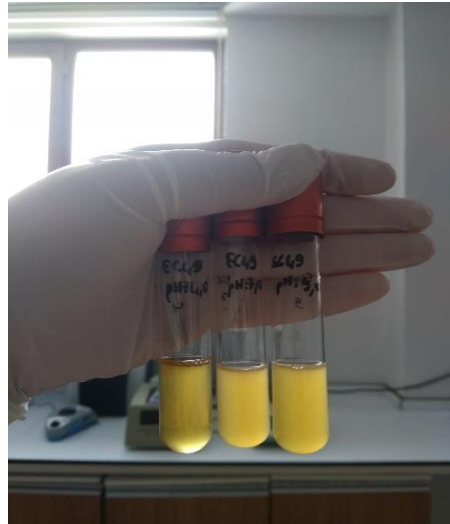
4.1.2.Bakterilerin farklı pH'lardaki gelişimi

Kültüre alınan izolatlar, 3 farklı pH'da (pH 4.0-7.20-9.0) hazırlanan MRSB ve M17B iğne öze yardımıyla ekildi. 30 °C'de 48 saat inkübe edildi.

Tablo 4.2'de gösterildiği gibi tüm izolatların geliştiği gözlemlendi. EC1, EC7, EC8, EC20, EC21, EC22, EC30, EC31, EC64'ün pH 7.20 de, EC3, EC4, EC5, EC6, EC9, EC17, EC18, EC23, EC24, EC26, EC29, EC35, EC36, EC37, EC38, EC39, EC40, EC41, EC42, EC43, EC44, EC45, EC65 pH 9.0'da, EC14, EC15, EC61 pH 4.0' da iyi geliştiği gözlemlendi.

Tablo4.2: İzolatların farklı pH'larda gelişimleri (+: gelişme az ++: gelişme iyi, +++: gelişme çok iyi)

İzolat Kodu	pH toleransı			izolat Kodu	pH toleransı		
	4.0	7.2	9.0		4.0	7.2	9.0
EC1	+	+++	++	EC30	+	+++	++
EC2	+	+++	+++	EC31	+	+++	++
EC3	+	++	+++	EC32	+++	+++	+
EC4	+	++	+++	EC33	+	++	++
EC5	+	++	+++	EC35	+	++	+++
EC6	+	++	+++	EC36	+	++	+++
EC7	+	+++	++	EC37	+	++	+++
EC8	+	+++	++	EC38	+	++	+++
EC9	+	++	+++	EC39	+	++	+++
EC10	+	+++	+++	EC40	+	++	+++
EC11	+	+++	+++	EC41	+	++	+++
EC12	+	++	++	EC42	+	++	+++
EC13	+	++	++	EC43	+	++	+++
EC14	+++	++	+	EC44	+	++	+++
EC15	+++	++	+	EC45	+	++	++
EC17	+	++	+++	EC47	+	++	+++
EC18	+	++	++	EC49	+	++	+++
EC19	+	+	+	EC50	++	+	+
EC20	+	+++	++	EC51	+	++	+++
EC21	+	+++	++	EC54	+	++	+++
EC22	+	+++	++	EC57	+	++	+++
EC23	+	++	+++	EC59	+	+++	+++
EC24	+	++	+++	EC61	+++	++	+
EC25	+	++	++	EC62	++	++	+
EC26	+	++	+++	EC64	+	+++	++
EC27	+	++	++	EC65	+	++	++
EC28	+	++	++	EC67	+	++	+++
EC29	+	++	+++				



Şekil 4.1: EC49'un 3 farklı pH'ta geliştikten sonraki görüntüsü

4.2.Biyokimyasal Testler

Yapılan eskulin testi sonuçlarına göre EC1, EC2, EC22, EC24, EC29, EC35, EC36, EC37, EC41, EC42, EC43, EC44, EC45, EC61'in izolatlarının aradaki bağı parçalayamadığı, diğer izolatların ise parçalayabildiği gözlemlendi.

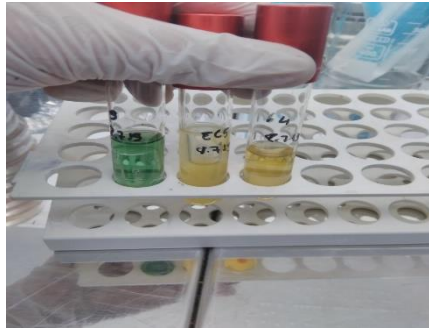
İzolatlardan EC5, EC7, EC21, EC26, EC29, EC36, EC39, EC41, EC42, EC43, EC44, EC45, EC46, EC47, EC55, EC56, EC57, EC58, EC61'in glukozdan CO₂ üretebildiği gözlemlendi.

İzolatlardan Arjinin üretimi olan mikroorganizmaya rastlanılmadı.

Katalaz enziminin varlığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada ise EC7, EC14, EC15, EC29, EC32, EC4, EC43, EC55, EC56, EC57, EC58, EC60 ta güçlü olmak üzere, EC1, EC3, EC4, EC5, EC6, EC9, E10, EC11, EC17, EC18, EC1, EC20, EC21, EC22, EC23, EC24, EC26, EC30, EC31, EC41, EC44, EC45, EC59 da katalaz enzimi bulunduğu tespit edildi.

Nişasta testi sonuçlarına göre hiçbir izolatın nişastayı parçalayamadığı tespit edildi.

İzolatların kazeini parçalama özelliklerine bakıldığında EC2, EC25, EC32, EC35, EC39, EC40, EC46, EC47, EC49, EC50, EC51, EC54, EC57 kazeini parçalarken diğer izolatların parçalamadığı gözlemlendi.



Şekil 2.2: Glikozdan gaz üreten ve gaz üretmeyen izolatların görüntüsü

İZOLAT KODU	ESKULİN ANALİZİ	GLİKOZDAN CO ₂ ÜRETİMİ	ARJİNİN KULLANIMI
EC1	-	+ gaz yok	-
EC2	-	-	-
EC3	+	-	-
EC4	+	-	-
EC5	+	+	-
EC6	+	-	-
EC7	+	+	-
EC8	+	-	-
EC9	+	-	-
EC10	+	-	-
EC11	+	-	-
EC12	+	+ gaz yok	-
EC13	+	+ gaz yok	-
EC14	+	-	-
EC15	+	-	-
EC17	+	-	-
EC18	+	-	-
EC19	+	-	-
EC20	+	-	-
EC21	+	+	-
EC22	-	-	-
EC23	+	-	-
EC24	-	-	-
EC25	+	+ gaz yok	-
EC26	+	+	-
EC27	+	+ gaz yok	-
EC28	+	-	-
EC29	-	+	-
EC30	+	-	-
EC31	+	-	-
EC32	+	-	-
EC33	+	+ gaz yok	-
EC35	-	+ gaz yok	-
EC36	-	+	-
EC37	-	+ gaz yok	-
EC38	+	-	-
EC39	+	+	-
EC40	+	+ gaz yok	-
EC41	-	+	-
EC42	-	+	-
EC43	-	+	-
EC44	-	+	-
EC45	-	+	-
EC47	+	+	-
EC49	+	-	-
EC50	+	-	-
EC51	+	+ gaz yok	-
EC54	+	-	-
EC57	+	+	-
EC59	+	-	-
EC61	+	+	-
EC62	-	-	-
EC64	+	+ gaz yok	-
EC65	+	-	-
EC67	+	-	-

Tablo4.3: Biyokimyasal test sonuçları (+: renk değişimi oldu, -: renk değişimi olmadı , +, gaz yok: renk değişimi oldu fakat CO2 yok)

Tablo4.4: Biyokimyasal test sonuçları

İZOLAT KODLARI	KATALAZ TESTİ	OKSİDAZ TESTİ	NİŞASTA HİDROLİZİ	KAZEİN HİDROLİZİ
EC1	+	-	-	-
EC2	-	-	-	+
EC3	+	-	-	-
EC4	+	+	-	-
EC5	+	-	-	-
EC6	+	-	-	-
EC7	+++	-	-	-
EC8	-	-	-	+
EC9	+	-	-	-
EC10	+	-	-	-
EC11	+	-	-	-
EC12	-	+	-	-
EC13	-	-	-	-
EC14	+++	+	-	-
EC15	+++	-	-	-
EC17	+	-	-	-
EC18	++	-	-	-
EC19	+	+	-	-
EC20	+	-	-	-
EC21	+	-	-	-
EC22	+	+	-	-
EC23	+	-	-	-
EC24	+	+	-	-
EC25	-	-	-	+
EC26	+	+	-	-
EC27	-	-	-	+
EC28	-	-	-	+
EC29	+++	-	-	-
EC30	+	-	-	-
EC31	+	-	-	-
EC32	+++	-	-	+
EC33	-	-	-	+
EC35	-	-	-	+
EC36	-	-	-	-
EC37	-	-	-	+
EC38	-	-	-	+
EC39	-	-	-	+
EC40	-	-	-	+
EC41	++	+	-	-
EC42	+++	+	-	-
EC43	+++	+	-	-
EC44	++	-	-	-
EC45	++	-	-	-
EC47	-	-	-	+
EC49	-	-	-	+
EC50	-	-	-	+
EC51	-	-	-	+
EC54	-	-	-	+
EC57	+++	-	-	+
EC59	+	-	-	-
EC61	-	-	-	+
EC62	-	-	-	-
EC64	-	-	-	+
EC65	-	-	-	+
EC67	-	-	-	-

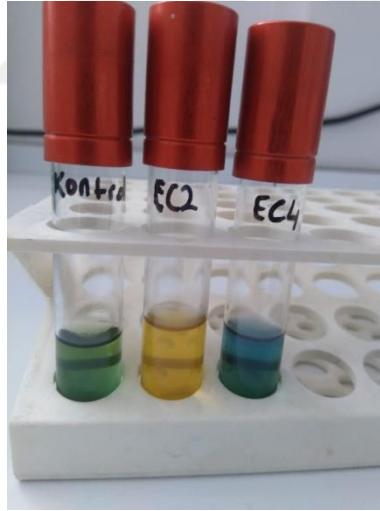
4.3. Şeker Fermantasyon Testleri

Ksiloz fermantasyon testi sonucuna göre, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC9, EC10, EC11, EC14, E15, EC17, EC18, EC19, EC20, EC21, EC23, EC24, EC26, EC29, EC30, EC31, EC32, EC41, EC42, EC43, EC44, EC67 numaralı izolatlar negatif, diğer izolatlar pozitif olarak değerlendirildi.

Galaktoz fermantasyon testi sonuçlarına göre, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7, EC9, EC10, EC11, EC14, EC15, EC17, EC19, EC20, EC21, EC24, EC30, EC32 numaralı izolatlar negatif, diğer izolatlar pozitif olarak değerlendirildi.

Monnitol fermantasyon testi sonuçlarına göre, EC1, EC2, EC3, EC4, EC14, EC15, EC17, EC22, EC23, EC24, EC32, EC33, EC35, EC47, EC49, EC50, EC54, EC61, EC64 numaralı izolatlar negatif, diğer izolatlar pozitif olarak değerlendirildi.

Maltoz fermantasyon testi sonuçlarına göre, EC4, EC15, EC17, EC23, EC24, EC26, EC29, EC42, EC43, EC44, EC60 numaralı izolatlar negatif, diğer izolatlar pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.3: Şeker fermantasyon testi sonuçlarına göre EC2 ve EC4

Tablo 4.5: Şeker fermantasyon test sonuçları

İZOLAT KODLARI	KSİLOZ	GALAKTOZ	MONNİTOL	MALTOZ
EC1	+	+	-	+
EC2	+	+	+	+
EC3	-	-	+	+
EC4	-	-	-	-
EC5	-	-	+	+
EC6	-	-	+	+
EC7	-	-	+	+
EC8	+	-	+	+
EC9	-	-	+	+
EC10	-	-	+	+
EC11	-	-	+	+
EC12	+	+	+	+
EC13	+	+	+	+
EC14	-	-	-	-
EC15	-	-	-	-
EC17	-	-	-	-
EC18	-	+	+	+
EC19	-	-	+	+
EC20	-	-	+	+
EC21	-	-	+	+
EC22	+	+	-	+
EC23	-	-	-	-
EC24	-	+	-	-
EC25	+	+	+	-
EC26	-	+	+	-
EC27	+	+	+	+
EC28	+	+	+	+
EC29	-	+	+	-
EC30	-	-	+	+
EC31	-	+	+	+
EC32	-	-	-	+
EC33	+	+	+	+
EC35	+	+	-	+
EC36	+	+	+	+
EC37	+	+	+	+
EC38	+	+	+	+
EC39	+	+	+	+
EC40	+	+	+	+
EC41	-	+	+	-
EC42	-	+	+	-
EC43	-	+	+	-
EC44	-	+	+	-
EC45	+	+	+	+
EC47	+	+	-	+
EC49	+	+	-	+
EC50	+	+	-	+
EC51	+	+	+	+
EC54	+	+	-	+
EC57	+	+	+	+
EC59	+	+	+	+
EC61	+	+	-	+
EC62	+	+	-	-
EC64	+	+	-	+
EC65	+	+	+	+
EC67	-	-	+	+

4.4. Safra tuzuna direnç testi

Safra tuzuna direnç testleri sonuçları aşağıdaki **Tablo 4.6**'da gösterildiği gibidir.

Tablo 4.6: Safra tuzuna direnç testi sonuçları

İzolant Kodları	Safra Tuzu Dayanıklılık		
	%0.05	%0.3	%0.5
EC1	++	+	-
EC2	++	+	-
EC3	++	++	-
EC4	+	++	-
EC5	+	-	-
EC6	+	-	+
EC7	+	-	-
EC8	-	+	+
EC9	+	-	-
EC10	+	-	-
EC11	+	-	-
EC12	+	-	-
EC13	+	-	-
EC14	+	+	-
EC15	+	++	-
EC17	-	++	-
EC18	+	-	-
EC19	+	-	+
EC20	++	-	+
EC21	-	-	-
EC22	++	+	-
EC23	+	+	-
EC24	++	+	-
EC25	+	+	-
EC26	++	++	++
EC27	++	+	-
EC28	++	+	++
EC29	++	++	++
EC30	+	-	+
EC31	+	++	-
EC32	++	+	-
EC33	++	++	++
EC35	++	++	-
EC36	++	++	++
EC37	+	-	-
EC38	++	+	+
EC39	++	++	+
EC40	++	++	+
EC41	++	++	++
EC42	++	++	++
EC43	++	++	++
EC44	++	++	++
EC45	++	++	++
EC47	+	+	-
EC49	+	+	-
EC50	+	+	-
EC51	++	++	+
EC54	+	+	-
EC57	++	++	++
EC59	+	-	-
EC60	++	++	+
EC61	+	-	-
EC62	++	++	+
EC64	++	-	-
EC65	++	++	++
EC67	+	-	-

4.5. Antibiyotik Direnç Testleri

İzolatların neomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençlerinin olup olmadığı test edildi. Çalışmalar sonucu EC1 ve EC25'in neomisin antibiyotiğine karşı, EC6, EC22, EC23, EC24, EC25, EC26, EC27, EC28, EC32, EC33, EC37, EC38, EC39, EC40, EC41, EC42, EC46, EC47, EC48, EC49, EC50, EC51, EC54, EC59, EC64, EC65, EC67'nin tetrasiklin antibiyotiğe karşı dirençsiz olduğu tespit edildi.



Tablo 4.7: Antibiyotik direnç test sonuçları (D: dirençli, mm: mili metre)

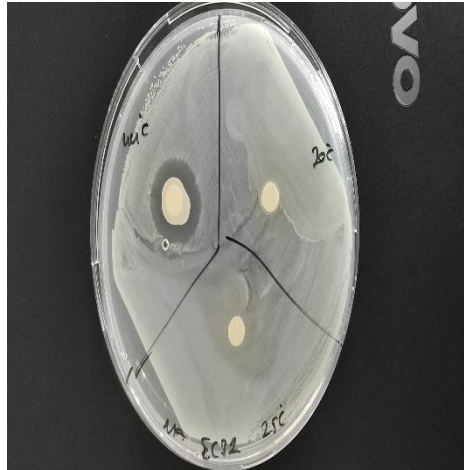
İzolat Kodları	Antibiyotik adı	Antibiyotik adı
	Neomisin	Tetrasiklin
EC1	13 mm	D
EC2	D	D
EC3	D	D
EC4	D	D
EC5	D	D
EC6	D	30 mm
EC7	D	D
EC8	D	D
EC9	D	D
EC10	D	D
EC11	D	D
EC12	D	D
EC13	D	D
EC14	D	D
EC15	D	D
EC17	D	D
EC18	D	D
EC19	D	D
EC20	D	D
EC21	D	D
EC22	D	15 mm
EC23	D	24 mm
EC24	D	13 mm
EC25	11 mm	25 mm
EC26	D	12 mm
EC27	D	14 mm
EC28	D	23 mm
EC29	D	D
EC30	D	D
EC31	D	D
EC32	D	12 mm
EC33	D	25 mm
EC35	D	D
EC36	D	D
EC37	D	20 mm
EC38	D	23 mm
EC39	D	25 mm
EC40	D	18 mm
EC41	D	8 mm
EC42	D	6 mm
EC43	D	D
EC44	D	D
EC45	D	D
EC47	D	11 mm
EC49	D	18 mm
EC50	D	24 mm
EC51	D	31 mm
EC52	D	D
EC54	D	13 mm
EC57	D	D
EC59	D	9 mm
EC61	D	D
EC62	D	D
EC64	D	13 mm
EC65	D	25 mm
EC67	D	20 mm

4.6. Antagonistik Aktivite Testleri

Yaptığımız antagonistik aktivite testleri sonucuna göre patojenler üzerinde aktivite gösteren izolatların zon çapları yazılmıştır, göstermeyenler ise boş bırakılmıştır.



Şekil 4.4: Patojen üzerinde zon oluşturan EC10 görüntüsü



Şekil 4.5: Patojen üzerinde zon oluşturan EC32 görüntüsü

Tablo 4.8: Patojenler üzerinde zon oluşturan izolatlar (mm: milimetre)

İzolat Kodu	<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	25 °C	30 °C	44 °C	25 °C	30 °C	44 °C	25 °C	30 °C	44 °C
EC1									
EC2									
EC3									
EC4									
EC5		12 mm							
EC6									
EC7									
EC8							5 mm		
EC9									
EC10	17 mm	18 mm		11 mm			24 mm		
EC11		17mm	12 mm						5 mm
EC12									
EC13									
EC14									
EC15									
EC17									
EC18	9 mm								
EC19		14 mm							
EC20									
EC21			15 mm			10 mm			15 mm
EC22		6 mm	13 mm			7 mm		12 mm	13 mm
EC23			14 mm			7 mm			13 mm
EC24		11 mm	13 mm					6 mm	
EC25									
EC26			9 mm						
EC27									
EC28									
EC29									
EC30									
EC31									
EC32			12 mm						16 mm
EC33									
EC35									
EC36									
EC37									
EC38									
EC39									
EC40									
EC41									
EC42									
EC43									
EC44			13 mm		10 mm				18 mm
EC45									
EC47									
EC49									
EC50									
EC51									
EC54									
EC57									
EC59									
EC61									
EC62									
EC64									
EC65									
EC67									

Tablo 4.9: Patojenler üzerinde zon oluşturan izolatlar (mm: milimetre)

İzolat Kodu	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Acinetobacter baumannii</i>		
	25 °C	30 °C	44 °C	25 °C	30 °C	44 °C
EC1						
EC2						
EC3						
EC4						
EC5						
EC6						
EC7						
EC8						
EC9						
EC10	6 mm					
EC11				7 mm		
EC12						
EC13						
EC14						
EC15						
EC17						
EC18						
EC19						
EC20						
EC21						
EC22						
EC23						
EC24						
EC25						
EC26	6 mm					
EC27						
EC28						
EC29		6 mm				
EC30		5 mm				
EC31						
EC32						
EC33						
EC35						
EC36						
EC37						
EC38						
EC39						
EC40						
EC41						
EC42						
EC43						
EC44						
EC45						
EC47						
EC49						
EC50						
EC51						
EC54						
EC57						
EC59						
EC61						
EC62						
EC64						
EC65						
EC67		7 mm				

4.7. İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu ve PCR

Tablo4.10: İzolatların BLAST sonuçları

İzolat Kodu	Benzerlik Oranı(%)	Nükleotit Sayısı *	GenBank accession number	En Yakın Filogenetik Grup
EC1	99.35	1228	OK021643	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
EC2	99.09	1103	OK021644	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
EC3	99.63	1084	OK021645	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC4	99.91	1083	OK033410	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>
EC5	99.17	1081	OK021646	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC6	99.64	1105	OK021647	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC7	99.28	836	OK021648	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC8	99.63	1087	OK021649	<i>Enterococcus durans</i>
EC9	99.55	1100	OK021650	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC10	99.70	1010	OK021651	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC11	99.40	1154	OK022640	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC12	99.81	1083	OK022641	<i>Microbacterium hominis</i>
EC13	99.26	1084	OK022642	<i>Microbacterium hominis</i>
EC14	99.57	1156	OK022643	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>
EC15	99.23	1046	OK022644	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>
EC17	99.35	1232	OK022645	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>
EC18	99.10	1226	OK022646	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC19	99.50	1009	OK022647	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC20	99.27	1090	OK022648	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC21	99.51	1222	OK033411	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC22	99.58	1197	OK033412	<i>Micrococcus aloeverae</i>
EC23	99.42	877	OK033413	<i>Micrococcus aloeverae</i>
EC24	99.21	1013	OK033414	<i>Micrococcus yunnanensis</i>
EC25	99.13	1159	OK033415	<i>Lactococcus lactis subsp.</i>
EC26	99.08	1085	OK033416	<i>Hafnia paralvei</i>
EC27	99.30	1160	OK033417	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
EC28	99.37	795	OK033418	<i>Enterococcus faecium</i>
EC29	98.15	1054	OK033419	<i>Hafnia paralvei</i>
EC30	99.15	1061	OK033420	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC31	99.45	1090	OK033421	<i>Microbacterium maritipicum</i>
EC32	100	1013	OK033422	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>
EC33	99.80	1022	OK033423	<i>Enterococcus durans</i>
EC35	99.16	1013	OK033424	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
EC36	99.72	1083	OK033425	<i>Shigella flexneri</i>
EC37	99.32	1025	OK033426	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
EC38	99.80	1011	OK033427	<i>Lactobacillus curvatus</i>
EC39	99.80	1006	OK033428	<i>Enterococcus faecium</i>
EC40	98.15	985	OK033429	<i>Enterococcus faecium</i>
EC41	99.22	1154	OK033430	<i>Hafnia paralvei</i>
EC42	99.08	1085	OK033431	<i>Hafnia paralvei</i>
EC43	98.43	1016	OK033432	<i>Hafnia paralvei</i>
EC44	98.62	1015	OK033433	<i>Hafnia paralvei</i>
EC45	99.74	972	OK033434	<i>Hafnia paralvei</i>
EC47	98.67	1056	OK033435	<i>Leuconostoc lactis</i>
EC49	99.40	1014	OK033436	<i>Lactococcus lactis subsp.</i>
EC50	99.01	1016	OK033437	<i>Lactococcus loudensis</i>
EC51	97.93	738	OK033438	<i>Lactococcus lactis subsp.</i>
EC54	99.16	1187	OK033439	<i>Lactococcus lactis</i>
EC57	99.05	1156	OK033440	<i>Serratia quinivorans</i>
EC59	98.04	1090	OK033441	<i>Leifsonia sp.</i>
EC61	99.78	917	OK033442	<i>Enterococcus malodoratus</i>
EC62	98.20	722	OK033443	<i>Stenotrophomonas pavani</i>
EC64	99.21	1014	OK033444	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
EC65	99.50	1005	OK033445	<i>Enterococcus faecium</i>
EC67	99.01	1213	OK033446	<i>Paenibacillus antibiotrophicola</i>

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Fermentasyon, gıdaların üretimi ve korunması açısından önemli bir yöntemdir. Fermentasyon sonucu üretilen süt ürünleri, laktik asit bakterilerinin sütü fermente etmeleri sonucu elde edilir. Fermente gıdalara örnek olarak yoğurt, kefir, peynir, turşu, sucuk, sirke, şalgam, boza ve tarhana verilebilir. Fermente gıdalardan peynir, mikroflora ve besin değeri olarak oldukça zengindir. Beyaz peynir üretimi için öncelikle çiğ sütün pastörize edilmesi (72 °C’de 15 sn ya da 65 °C’de 30 dk süre) gerekmektedir. Daha sonra soğutulurak kalsiyum klorür ve starter kültür ilavesi yapılmaktadır. Starter kültür, faydalı laktik asit bakterilerinden oluşmaktadır (Blandino *et al.* 2003; Surono and Hosono, 2011; Zarzecka *et al.* 2020).

Geleneksel olarak üretilen beyaz peynirler genellikle üretilen yörede yaşayanların bilgi ve becerisine bağlı olarak farklı şekillerde üretilmektedir. Sütün temiz sağılması, saklama koşulları, hijyen koşulları vb. sebeplere bağlı olarak geleneksel olarak üretilen beyaz peynirlerin mikroflorası yöreden yöreye farklılık gösterebilmektedir. Hijyen kurallarından uzak üretilen peynir, mikroflorasına kontamine olmuş patojen mikroorganizmalardan dolayı kötü tat ve yapıya sahip olabilmektedir. Mikroflorasında patojen barındıran peynirleri tüketen tüketiciler büyük risk altındadır (Kaynar, 2011).

Beyaz peynir mikroflorasını genel olarak laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri fermentasyon sonucu son ürün olarak laktik asit üreten mikroorganizmalardır (Karakuş vd. 1992). Peynir üretiminde kullanılacak sütte, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas* ve bazı *Streptococcus*, *Micrococcus* ve *Corynebacterium* cinslerinin olması istenmez. Bu mikroorganizmalar istenmeyen tat, koku ve yapıya sebep olmakta ve bazı koliform grubu mikroorganizmaların peynirde gelişmesine katkıda bulunarak gaz oluşturmaya sebep olmaktadır (Martinez-Cuesta *et al.* 2010; Podrzaj *et al.* 2020).

Bu bilgiler göz önüne alındığında tüketilen peynirlerin sahip olduğu mikrofloranın tespit edilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada Ağrı ili’ne ait 7 farklı bölgeden toplanan 14 beyaz peynir örneğinde LAB’ların izolasyonu, tanı ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Toplanan 7 beyaz peynir örneğinden toplamda 63 izolat elde edilmiş ve 55 izolatın 16S rDNA gen bölgesi sekans analizi ile tanılanırken 8 izolat tanılanamamıştır. Çalışmaya, tanılanan 55 izolat ile devam edilerek bu 55 bakteri izolatın karakterizasyonu yapılmıştır.

16S rRNA gen analizi sekans sonucuna göre; 1 izolat *Staphylococcus epidermidis* (EC1), 1 izolat *Streptococcus parasanguinis* (EC2), 13 izolat *Microbacterium maritopicum* (EC3, EC5, EC6, EC7, EC9, EC10, EC11, EC18, EC19, EC20, EC21, EC30, EC31), 5 izolat *Phyllobacterium myrsinacearum* (EC14, EC15, EC17, EC32), 2 izolat *Enterococcus durans* (EC8, EC33), 2 izolat *Microbacterium hominis* (EC12, EC13), 2 izolat *Micrococcus aloeverae* (EC22, EC23), 1 izolat *Micrococcus yunnanensis* (EC24), 3 izolat *Lactococcus lactis* subsp. (EC25, EC49, EC59), 7 izolat *Hafnia paralvei* (EC26, EC29, EC41, EC42, EC43, EC44, EC45), 2 izolat *Leuconostoc mesenteroides* (EC27, EC37, EC64), 3 izolat *Enterococcus faecium* (EC28, EC39, EC40), 1 izolat *Streptococcus lutetiensis* (EC35), 1 izolat *Shigella flexneri* (EC36), 1 izolat *Lactobacillus curvatus* (EC38), 1 izolat *Leuconostoc lactis* (EC47), 1 izolat *Lactococcus loudensis* (EC50), 1 izolat *Lactococcus lactis* (EC54), 1 izolat *Serratia quinivorans* (EC57), 1 izolat *Leifsonia* sp. (EC59), 2 izolat *Stenotrophomonas pavanii* (EC60, EC62), 1 izolat *Enterococcus malodoratus* (EC61), 1 izolat *Paenibacillus antibioticophila* (EC67) olarak değerlendirilmiştir. Sekans sonuçlarına göre, 19 adet laktik asit bakterisi tespit edilmiştir.

Çalışmada beyaz peynirden izole edilen 55 izolatın, bu kapsamda, Gram özellikleri, safra tuzuna dayanıklılık, glukozdan CO₂ üretimi, antagonistik aktivite, eskulin hidrolizi, arjinin kullanımı, H₂O₂ üretimi, nişasta ve kazein hidrolizi, oksidaz testi, şeker fermente testleri, antibiyotiğe direnç testleri olmak üzere toplam 12 parametre analizi gerçekleştirilmiştir.

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* *Weissella*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Carnobacterium*, fermente gıdalarda bulunan LAB cinsleridir (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

Çalışmamızda, sütün doğal mikroflorasında bulunan LAB'lardan *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* cinslerine ait türler tanımlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* cinslerine ait türlerin peynir olgunlaşması boyunca baskın türler oldukları görülmüştür ve *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, türlerinin de peynir mikroflorasında bulunduğu belirlenmiştir (Uraz ve Gündoğan, 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

Laktik asit bakterileri peynire kendine has koku, tat ve yapı kazandırmaktadır, bunun yanı sıra ürettiği metabolitler sayesinde koruyucu özelliğe sahiptirler. Geleneksel gıdalardan fermente ürünlerde bulunan mikrofloranın belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Geçmişten günümüze gerek yapısında gerekse tadında pek bir değişiklik olmayan geleneksel fermente gıdaların bu aromalarının kaybolmaması ve devamlılığı için bu mikrofloranın tanımlanmaları moleküler düzeyde (16S rRNA) belirlenmeli ve bununla alakalı araştırmalar devam etmelidir. Bu sayede geleneksel gıdaları korumak için bir adım atılmış olacaktır. Ayrıca insan sağlığı açısından yöresel ürünlerde bulunmaması gereken mikroorganizmaların tespiti yapılarak halk sağlığını korumaya yönelik önlemler alınmalı ve bu ürünleri üretenlerin daha hijyenik koşullarda ürettikleri ürünleri konusunda bilinçlendirilmeliler (Fusté-Forné, 2020).

Peynir üzerine yapılan bir çalışmada, peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA yöntemiyle tanımlanması yapılmıştır. Bu çalışmada baskın tür olarak *Lactococcus* cinsine rastlanmıştır (Lusk et al. 2012).

Çalışmamızda izole edilen izolatlardan 5 tanesi *Lactococcus* cinsine, 1 tanesi *Lactobacillus*, 4 tanesi *Leuconostoc* cinsine ait türlerdendir.

Kuikui et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada ise genotipik ve fenotipik yöntemler kullanılarak laktik asit bakterileri karakterize edilmiştir. Fenotipik analizler sonucunda izole edilen mikroorganizmaların çoğunun pH 3.0'da hiç gelişme göstermedikleri rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da izole edilen mikroorganizmaların pH 4.0'da pH 7.0 ve pH 9.0'a göre daha az gelişebildikleri görülmüştür.

Kars yöresine ait peynirlerde yapılan bir çalışmada yalnızca *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* türleri izole edilmiştir. Fakat aynı yöreden alınan peynirlerle yapılan başka çalışmalarda ise farklı laktik asit bakterilerine rastlanılmıştır (Aydemir *et al.* 2015). Bu sebepten dolayı kullanılan yöntem, çalışan kişiye ve bölgesel faktörlere (peynir üretim tekniği, alışkanlıkları) bağlı olarak yapılan tanılamalarda farklı türlere rastlanabilmektedir.

Ghahremani *et al.* (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, 16S rRNA gen analizi ve ITS PCR yöntemi kullanarak laktik asit bakterilerinin tanılamasını yapmıştır. Çalışma sonucu baskın mikroflora olarak *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinslerine rastlanılmıştır. Çalışmamızda Ghahremani *et al.* (2015) çalışmasında tespit edilen *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsleri çalışmamızda da tespit edilmiş olup bu iki cins dışında ayrıca *Enterococcus* cinsinin üyeleri de tespit edilmiştir. Çalışmamızda, ana kaynağı peynir olmayan, *Burkholderia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Leifsonia*, *Stenotrophobacter*, *Peanibacillus* cinsi mikroorganizmalara rastlanılmıştır. Patojen grubuna üye olan *Staphylococcus*, *Shigella* cinsleri de görülmüştür.

Shigella, Gram negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, laktozu fermente etmeyen, *Enterobacteriaceae* üyesi fakültatif anaerobik bir basildir. *Shigella* ile kontamine olmuş gıdaları tüketen kişilerde, bağırsak krampları, ateş gibi semptomlar görülmektedir. (Brenner *et al.*, 1973; Switaj *et al.* 2015). Çalışmamızda izole edilen *Shigella*, üretilen peynirin hijyen koşullarından uzak üretildiğinin bir kanıtıdır.

Çok uzun yıllardan beri laktik asit bakterileri gıda fermentasyonunda kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri, ürettikleri bileşiklerle (laktik asit, formik asit, asetik asit, organik asit, H₂O₂, bakteriosin, reuterin, diasetil) patojen veya patojen olmayan mikroorganizmaları inhibe etme özelliğine sahiptirler. Ayrıca laktik asit bakterilerinin, ürettikleri, asetik asit ve laktik asit, Gram negatif olan patojen mikroorganizmalar (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* vb.) üzerinde oldukça etkili olmaktadır. *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* gibi Gram pozitif bakteriler üzerine ise bakteriosin ve bakteriosin benzeri maddeler antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üreten türleri, diğer LAB türleri üzerinde inhibe edici etkiye sahip olabilmektedir (Franz *et al.* 1997; Dinçer vd. 2010).

Bakteriyosinlerin ve gıdalar üzerindeki uygulamaları için son yıllarda yapılan araştırmalar önem kazanmıştır. *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* başta olmak üzere LAB cinsleri üzerine araştırmalar moleküler seviyelere taşınmıştır. İnsan, gıda, hayvansal kaynaklı izole edilen bu türlerde bakteriyosinlere ait genlerin varlığı birçok çalışmada ortaya çıkmıştır (Dal Bello *et al.* 2010, Migaw *et al.* 2014; Stoyancheva *et al.* 2014; Algeria *et al.* 2010; Strompfová *et al.* 2008; Knoll *et al.* 2008; Foulquie Moreno *et al.* 2006)

Furtado *et al.* (2014) keçi sütü üzerine yaptığı çalışmada *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun *Listeria monocytogenes* patojeni üzerine belli bir seviyede inhibisyon sağladığı, bunun bakteriyosin üretimi sayesinde olduğunu rapor etmişlerdir. Patojenler üzerine sağlanan bu inhibisyon gıda güvenliği için oldukça önemli görülmüştür. Çalışmamızda ise buna ek olarak *Microbacterium maritypicum*, *Micrococcus aloeverae*, *Micrococcus yunnanensis*, *Hafnia paralvei*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, türlerinin de *Listeria monocytogenes* üzerinde inhibisyon sağladığı gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda patojen ve gıda bozulmalarına neden olan mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisinin, bakteriyosinler, H₂O₂, organik asitler, reuterin gibi inhibitör etkisi olan bileşiklerden kaynaklanabileceği belirlenmiştir. Bu çalışmalarda agar spot ve agar kuyu difüzyon testleri sonucu oluşan inhibisyon zonlarının bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklanmış olduğunu ortaya konmuştur (Fuller and Gibson 1997; Jacobsen *et al.* 1999; Awaisheh and Ibrahim 2009).

Agar kuyu difüzyon, agar spot ve mikrolitre plaka metodu kullanılarak yapılan bir başka çalışmada kontrol ortamı (MRS) pH:6.50'de, uygulanan testteki patojenlerde inhibisyon zonu oluşmazken MRS pH: 4.50' de patojenlerde inhibisyon zonu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuca göre patojenlerde oluşan inhibisyon zonlarının bakteriyosin etkisinden dolayı değil, düşük pH'dan dolayı üretilen organik asitten kaynaklandığını rapor etmişlerdir (Maragkoudakis *et al.* 2006).

Haghshenas *et al.* (2014) taze süten izole ettiği *Lactococcus* ve *Lactobacillus* suşlarından, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve *Lactobacillus plantarum* 'un düşük pH'da gelişebildiği, sıklıkla kullanılan antibiyotiklere ve yüksek safra tuzu konsantrasyonuna karşı toleraslı olduklarını, bu sebeplerden dolayı probiyotik

potansiyelinin olduğunu göstermişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada *Lactococcus* cinsine ait olduğu tespit edilen EC25, EC47, EC49, EC51, EC54 izolatlarının belli safra tuzu konsantrasyonlarında (% 0.05- % 0.03-% 0.5) ve pH:4.0’ da gelişim gösterdikleri belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmadaki verilere göre, beyaz peynirden izole edilen izolatların tarama testlerinde tespit edilen inhibitör yetenekleri farklı bir metotla yapılan ikinci bir taramada gözlenemeyebilir. Odeyemi *et al.*’nin (2011)’ de belirttiği gibi yapılan testleri ön ve doğrulama testleri olarak gruplamak daha anlamlı olacaktır. Ön tarama testinde muhtemel antimikrobiyal madde üretici mikroorganizmanın, patojen bakterilerin gelişimini engellemesi olasılığını belirlemek için, doğrulama testi ise ön tarama testlerini doğrulamak veya doğruluğunu kontrol etmek için oldukça önemlidir. Antimikrobiyal madde üretimi, mikroorganizmanın inkübasyon süresi, pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Bu faktörler elde edilen sonuçlara doğrudan etki edebilmektedir. Doğru ve iyi sonuçlara ulaşabilmek için bu faktörler göz önünde bulundurularak dikkatli seçimler yapılması oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Lucas, R., Omar, N. B., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. 2005. Enterocin AS-48RJ: A Variant Of Enterocin AS-48 Chromosomally Encoded By *Enterococcus Faecium* RJ16 Isolated From Food. *Systematic And Applied Microbiology*, 28(5), 383-397.
- Afshin, J., Saied, S., & Babak, A. 2011. Microbial Properties Of Hot Smoked Sausage During Shelf Life. *Global Veterinaria*, 7(5), 423-426.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, İ., Doğan, H. B., Gürgün, V., Halkman, A. K., ... & Tükel, Ç. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi Ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara, 522 S.
- Akgün, S. 1995. Beyaz Peynir Üretiminde *Lactobacillus Sake*'nin Starter Kültür Olarak Kullanilmasi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42(03).
- Alegría, Á., Delgado, S., Rocas, C., López, B., & Mayo, B. 2010. Bacteriocins Produced By Wild *Lactococcus Lactis* Strains Isolated From Traditional, Starter-Free Cheeses Made Of Raw Milk. *International Journal Of Food Microbiology*, 143(1-2), 61-66.
- Anderson, J. I. W. 1962. Studies On *Micrococci* Isolated From The North Sea. *Journal Of Applied Bacteriology*, 25(3), 362-368.
- Andersson, R. 1988. Food Processing. Lactic Acid Bacteria In The Production Of Food. *Food Laboratory Newsletter*, (14), 17-21.
- Araújo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L. P., & Freitas-Almeida, A. C. 2002. Occurrence Of *Staphylococcus* And *Enteropathogens* In Soft Cheese Commercialized In The City Of Rio De Janeiro, Brazil. *Journal Of Applied Microbiology*, 92(6), 1172-1177.
- Asoodeh, A., Chamani, J., & Lagzian, M. 2010. A Novel Thermostable, Acidophilic A-Amylase From A New Thermophilic “*Bacillus Sp. Ferdowsicus*” Isolated From Ferdows Hot Mineral Spring In Iran: Purification And Biochemical Characterization. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 46(3), 289-297.

- Awaishah, S. S., & Ibrahim, S. A. 2009. Screening Of Antibacterial Activity Of Lactic Acid Bacteria Against Different Pathogens Found In Vacuum-Packaged Meat Products. *Foodborne Pathogens And Disease*, 6(9), 1125-1132.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification And Physiology. *FOOD Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 139, 1-66.
- Aydemir, O., Harth, H., Weckx, S., Dervişoğlu, M., & De Vuyst, L. 2015. Microbial Communities Involved In Kaşar Cheese Ripening. *Food Microbiology*, 46, 587-595.
- Aydınöz, İ. E., Mansur, T., Serdar, Z. A., & Erçin, Z. Nekrotizan Yumuşak Doku Enfeksiyonu Ile Takip Edilen İki Olguda *Stenotrophomonas maltophilia* İzolasyonu. *TÜRKDERM-Deri Hastalıkları Ve Frengi Arşivi*, 40(Supp: B), 47-50.
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. 2003. Review And Re-Analysis Of Domain-Specific 16S Primers. *Journal Of Microbiological Methods*, 55(3), 541-555.
- Bannister, B. A. 1987. *Listeria Monocytogenes* Meningitis Associated With Eating Soft Cheese. *Journal Of Infection*, 15(2), 165-168.
- Bellassi, P., Fontana, A., Callegari, M. L., Cappa, F., & Morelli, L. 2021. *Microbacterium paulum* Sp. Nov., Isolated From Microfiltered Milk. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 71(11), 005119.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. 2003. Cereal-Based Fermented Foods And Beverages. *Food Research International*, 36(6), 527-543.
- Brenner, D. J., Fanning, G. R., Miklos, G. V., & Steigerwalt, A. G. 1973. Polynucleotide Sequence Relatedness Among *Shigella* Species. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 23(1), 1-7.
- Bulut, Ç. 2003. *Isolation And Molecular Characterization Of Lactic Acid Bacteria From Cheese* (Master's Thesis, İzmir Institute Of Technology).
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., Cailliez-Grimal, C., Gaiani, C. 2014. Lactic Acid Bacteria In Dairy Food:

- Surface Characterization And Interactions With Food Matrix Components. *Advances In Colloid And Interface Science*, 213, 21-35.
- Burkholder, W. H. 1950. Sour Skin, A Bacterial Rot Of Onion Bulbs. *Phytopathology*, 40(1).
- Çelik, Ş., & Uysal, Ş. 2009. Beyaz Peynirin Bileşim, Kalite, Mikroflora Ve Olgunlaşması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1), 141-151.
- Chen, Y. S., Chang, C. H., Pan, S. F., Wang, L. T., Chang, Y. C., Wu, H. C., & Yanagida, F. 2013. *Lactococcus Taiwanensis* Sp. Nov., A Lactic Acid Bacterium Isolated From Fresh Cummingcordia. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_7), 2405-2409.
- Chuayana, J. E., Ponce, C. V., Rivera, M. R. B., & Cabrera, E. C. 2003. Antimicrobial Activity Of Probiotics From Milk Products. *Phil J. Microbiol. Infect. Dis*, 32(2), 71-74.
- Cinbas, T., & Kilic, M. 2006. Proteolysis And Lipolysis In White Cheeses Manufactured By Two Different Production Methods. *International Journal Of Food Science & Technology*, 41(5), 530-537.
- Clarridge III, J. E. 2004. Impact Of 16S Rrna Gene Sequence Analysis For Identification Of Bacteria On Clinical Microbiology And Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840-862.
- 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.
- Collins, M. D., & Keddle, R. M. 1986. Genus *Microbacterium*. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, 2, 1320-1322.
- Collins, M. D., Jones, D., Keddle, R. M., Kroppenstedt, R. M., & Schleifer, K. H. 1983. Classification Of Some Coryneform Bacteria In A New Genus *Aureobacterium*. *Systematic And Applied Microbiology*, 4(2), 236-252.
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial Substances From Lactic Acid Bacteria For Use As Food Preservatives. *Food Technology (Chicago)*, 43(1), 164-167.
- Dağdemir, E., & Özdemir, S. 2006. Salamura Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması Ve Seçilen Bazı İzolatların Kültür Olarak

Kullanılabilme Olanakları. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 190s.*

- Dağdemir, E., Özdemir, S., & Çelik, Ş. 2002. Farklı Starter Kültür Kullanılarak Yapılan Salamura Beyaz Peynir Örneklerinin Bazı Mikrobiyolojik Ve Duyusal Özellikleri İle Lipoliz Değerleri. *Türkiye*, 7, 335-342.
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L. 2010. Microbial Ecology Of Artisanal Products From North West Of Italy And Antimicrobial Activity Of The Autochthonous Populations. *LWT-Food Science And Technology*, 43(7), 1151-1159.
- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adrian, T., Marshall, V. M., Degeest, B., & Vannielgem, F. 2003. Exopolysaccharide-Producing *Streptococcus Thermophilus* Strains As Functional Starter Cultures In The Production Of Fermented Milks. *International Dairy Journal*, 13(8), 707-717.
- Delbès-Paus, C., Miszczycha, S., Ganet, S., Hélinck, S., Veisseire, P., Pochet, S., Thevenot, D., Montel, M. C. 2013. Behavior Of *Escherichia Coli* O26: H11 In The Presence Of *Hafnia Alvei* In A Model Cheese Ecosystem. *International Journal Of Food Microbiology*, 160(3), 212-218.
- Demirci, M., & Anci, M. 1989. Hellim Peynirinin Fiziksel, Kimyasal Ve Mikrobiyolojik özellikleri Üzerinde Araştırmalar. *Bursa I. Uluslararası Gıda Sempozyumu*, 4-6.
- Demirel, N., & Karapınar, M. 2000. Süt Ürünlerinde *Staphylococcus Aureus*. *Süt Mikrobiyolojisi Ve Katkı Maddeleri. VI. Süt Ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, İzmir*, 78-85.
- Dib, J. R., Liebl, W., Wagenknecht, M., Farías, M. E., & Meinhardt, F. 2013. Extrachromosomal Genetic Elements In *Micrococcus*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97(1), 63-75.
- Dinçer, E., Kivanç, M., & Karaca, H. 2010. Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- Do Carmo, L. S., Dias, R. S., Linardi, V. R., De Sena, M. J., Dos Santos, D. A., De Faria, M. E., ... & Heneine, L. G. 2002. Food Poisoning Due To Enterotoxigenic Strains Of *Staphylococcus* Present In Minas Cheese And Raw Milk In Brazil. *Food Microbiology*, 19(1), 9-14.

- Doddamani, H. P., & Ninnekar, H. Z. 2001. Biodegradation Of Carbaryl By A *Micrococcus* Species. *Current Microbiology*, 43(1), 69-73.
- Doyuran, E. S. 2012. *Çeşitli Klinik Örneklerden Stenotrophomonas Maltophilia İzolasyonu Ve Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi* (Master's Thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Dülger, D., & Berktaş, M. 2007. *Stenotrophomonas Maltophilia* Suşlarının Klinik Önemi. *Van Tıp Derg*, 14(3), 90-5.
- Eom, H. J., Seo, D. M., & Han, N. S. 2007. Selection Of Psychrotrophic *Leuconostoc Spp.* Producing Highly Active Dextranucrase From Lactate Fermented Vegetables. *International Journal Of Food Microbiology*, 117(1), 61-67.
- Durlu Özkaya, F. 2001. Salamura Beyaz Peynirden İzole Edilen Bazı Laktokok, Enterekok Ve Laktobasil Suşlarının Proteolitik Aktivite, Bakteriyosin Etkenliği Ve Biyogen Amin Oluşumu Açısından Karşılaştırılması.
- Erten, H., Ağırman, B., Gündüz, C. P. B., Çarşanba, E., Sert, S., Bircan, S., & Tangüler, H. 2014. Importance Of Yeasts And Lactic Acid Bacteria In Food Processing. In *Food Processing: Strategies For Quality Assessment* (Pp. 351-378). Springer, New York, NY.
- Evtushenko, L. I., Dorofeeva, L. V., Subbotin, S. A., Cole, J. R., & Tiedje, J. M. 2000. *Leifsonia Poae* Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated From Nematode Galls On *Poa Annua*, And Reclassification Of *Corynebacterium Aquaticum* Leifson 1962 As *Leifsonia Aquatica* (Ex Leifson 1962) Gen. Nov., Nom. Rev., Comb. Nov. And *Clavibacter Xyli* Davis Et Al. 1984 With Two Subspecies As *Leifsonia Xyli* (Davis Et Al. 1984) Gen. Nov., Comb. Nov. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 50(1), 371-380.
- Farmer 3rd, J. J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., ... & Fanning, G. R. 1985. Biochemical Identification Of New Species And Biogroups Of *Enterobacteriaceae* Isolated From Clinical Specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 21(1), 46-76.
- Farmer III, J. J. 2003. *Enterobacteriaceae: Introduction And Identification. Manual Of Clinical Microbiology*.

- Foulquié Moreno, M. R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., & De Vuyst, L. 2003. Isolation And Biochemical Characterisation Of Enterocins Produced By *Enterococci* From Different Sources. *Journal Of Applied Microbiology*, 94(2), 214-229.
- Franz, C. M., Holzapel, W. H., & Stiles, M. E. 1999. Enterococci At The Crossroads Of Food Safety. *International Journal Of Food Microbiology*, 47(1-2), 1-24.
- Fuller, R., & Gibson, G. R. 1997. Modification Of The Intestinal Microflora Using Probiotics And Prebiotics. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology*, 32(Sup222), 28-31.
- Furtado, D. N., Todorov, S. D., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. 2014. Bacteriocinogenic *Lactococcus Lactis Subsp: Lactis* DF04Mi Isolated From Goat Milk: Evaluation Of The Probiotic Potential. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 45, 1047-1054.
- Fusté-Forné, F. 2020. Developing Cheese Tourism: A Local-Based Perspective From Valle De Roncal (Navarra, Spain). *Journal Of Ethnic Foods*, 7(1), 1-9.
- Garvie, E. I. 1986. Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68 AL, 66 AL In Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology; Sneath, PHA, Et Al. Eds.
- Gerritse, K., Posno, M., Schellekens, M. M., Boersma, W. J. A., & Claassen, E. 1990. Oral Administration Of TNP-*Lactobacillus* Conjugates In Mice: A Model For Evaluation Of Mucosal And Systemic Immune Responses And Memory Formation Elicited By Transformed *Lactobacilli*. *Research In Microbiology*, 141(7-8), 955-962.
- 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.
- Gilliland, S. E. 1990. Health And Nutritional Benefits From Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 175-188.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. 2015. The Prevalence And Control Of *Bacillus* And Related Spore-Forming Bacteria In The Dairy Industry. *Frontiers In Microbiology*, 6, 1418.

- Gotuzzo, E., & Celillo, E. 1992. *Brucella* In: Gorbach SI, Bartlett JG, Blacklow NR, Editors. Infectious Diseases.
- Gürsoy, A., Şenel, E., Gürsel, A., Deveci, O., Karademir, E., & Yaman, Ş. 2001. Yağ İçeriği Azaltılmış Beyaz Peynir Üretiminde Isıl İşlem Uygulanan *Lactobacillus Helveticus* Ve *Lactobacillus Bulgaricus* Kültürlerinin Kullanımı. *Gıda*, 26(5).
- Guzzon, R., Carafa, I., Tuohy, K., Cervantes, G., Verneti, L., Barmaz, A., ... & Franciosi, E. 2017. Exploring The Microbiota Of The Red-Brown Defect In Smear-Ripened Cheese By 454-Pyrosequencing And Its Prevention Using Different Cleaning Systems. *Food Microbiology*, 62, 160-168.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. 2014. Different Effects Of Two Newly-Isolated Probiotic *Lactobacillus Plantarum* 15HN And *Lactococcus Lactis Subsp. Lactis* 44Lac Strains From Traditional Dairy Products On Cancer Cell Lines. *Anaerobe*, 30, 51-59.
- Hardie, J. M., & Whiley, R. A. 1995. The Genus *Streptococcus*. In *The Genera Of Lactic Acid Bacteria* (Pp. 55-124). Springer, Boston, MA.
- Hassan, A. N., & Frank, J. F. 2001. Starter Cultures And Their Use. In *Applied Dairy Microbiology* (Pp. 171-226). CRC Press.
- 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.
- Hayaloglu, A. A., Guven, M. Fox, P. F., & Mcsweeney, P. L. H. (2005). Influence Of Starters On Chemical, Biochemical, And Sensory Changes In Turkish White-Brined Cheese During Ripening. *Journal Of Dairy Science*, 88(10), 3460-3474.
- Hayes, M. C., Ralyea, R. D., Murphy, S. C., Carey, N. R., Scarlett, J. M., & Boor, K. J. 2001. Identification And Characterization Of Elevated Microbial Counts In Bulk Tank Raw Milk. *Journal Of Dairy Science*, 84(1), 292-298.
- Holečková, B., Holoda, E., Fotta, M., Kalináčová, V., Gondol, J., & Grolmus, J. 2002. Occurrence Of Enterotoxigenic *Staphylococcus Aureus* In Food. *Annals Of Agricultural And Environmental Medicine*, 9, 179-182.

- Holt, J. G. 1994. Group 5, Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*, 175-289.
- Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. (Eds.). 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity And Taxonomy*. John Wiley & Sons.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. 1995. Biological Preservation Of Foods With Reference To Protective Cultures, Bacteriocins And Food-Grade Enzymes. *International Journal Of Food Microbiology*, 24(3), 343-362.
- 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), 365s-373s.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & In't Veld, J. H. H. 1998. Overview Of Gut Flora And Probiotics. *International Journal Of Food Microbiology*, 41(2), 85-101.
- Hugo, W. B., Ayliffe, G. A. J., & Russell, A. D. (Eds.). 1999. *Principles And Practice Of Disinfection, Preservation, And Sterilisation*. Blackwell Science.
- Ibrahim, S., Shukor, M. Y., Syed, M. A., Johari, W. L. W., & Ahmad, S. A. 2016. Characterisation And Growth Kinetics Studies Of Caffeine-Degrading Bacterium *Leifsonia Sp.* Strain SIU. *Annals Of Microbiology*, 66(1), 289-298.
- Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., ... & Jakobsen, M. 1999. Screening Of Probiotic Activities Of Forty-Seven Strains Of *Lactobacillus Spp.* By In Vitro Techniques And Evaluation Of The Colonization Ability Of Five Selected Strains In Humans. *Applied And Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial Properties Of Diacetyl. *Applied And Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532. Jay, J. M. 1992. Modern Food Microbiology, Pp.(1-701).
- Jayarao, B. M., & Henning, D. R. 2001. Prevalence Of Foodborne Pathogens In Bulk Tank Milk. *Journal Of Dairy Science*, 84(10), 2157-2162.

- Juven, B. J., Schved, F., & Lindner, P. 1992. Antagonistic Compounds Produced By A Chicken Intestinal Strain Of *Lactobacillus Acidophilus*. *Journal Of Food Protection*, 55(3), 157-161.
- Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C., & Cogan, T. M. 2007. Contamination Of Milk By Enterococci And Coliforms From Bovine Faeces. *Journal Of Applied Microbiology*, 103(5), 1393-1405.
- Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C., & Cogan, T. M. 2007. Contamination Of Milk By *Enterococci* And Coliforms From Bovine Faeces. *Journal Of Applied Microbiology*, 103(5), 1393-1405.
- Kamilari, E., Anagnostopoulos, D. A., Papademas, P., Efthymiou, M., Tretiak, S., & Tsaltas, D. 2020. Snapshot Of Cyprus Raw Goat Milk Bacterial Diversity Via 16S Rdna High-Throughput Sequencing; Impact Of Cold Storage Conditions. *Fermentation*, 6(4), 100.
- Karakuş, M., & Alperden, I. 1995. Effect Of Starter Composed Of Various Species Of Lactic Bacteria On Quality And Ripening Of Turkish White Pickled Cheese. *LWT-Food Science And Technology*, 28(4), 404-409.
- Karakuş, M., Borcaklı, M., & Alperden, İ. 1992. Beyaz Peynirin Olgunlaşma Sürecinde Laktik Asit Bakterileri. *Gıda*, 17(6).
- Kaynar, P. 2011. Ülkemiz Peynirleri Üzerine Mikrobiyolojik Araştırmalar. *Türk Mikrobiyol. Cemiy. Derg.*, 41(1), 1-8.
- Keskin, Y., Özyaral, O., Başkaya, R., & Susur, M. A. 2006. Semt Pazarlarında Satılan Beyaz Peynirlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 36(1), 9-19.
- Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri.
- Kılıç, S. 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- Kiran, F. Y., & Osmanağaoğlu, Ö. T. D. 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri Ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı (Doctoral Dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı).

- Kıvanç, M., & Erikçi, Y. Ş. 2018. Sofralık Fermente Zeytinlerden (*Olea Europaea* L.) İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics Of Bacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Kleerebezemab, M., Hols, P., & Hugenholtz, J. 2000. Lactic Acid Bacteria As A Cell Factory: Rerouting Of Carbon Metabolism In *Lactococcus Lactis* By Metabolic Engineering. *Enzyme And Microbial Technology*, 26(9-10), 840-848.
- 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.
- Kloos, W. E., Tornabene, T. G., & Schleifer, K. H. 1974. Isolation And Characterization Of Micrococci From Human Skin, Including Two New Species: *Micrococcus Lylae* And *Micrococcus Kristinae*¹. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 24(1), 79-101.
- Kloos, W. E., Zimmerman, R. J., & Smith, R. F. 1976. Preliminary Studies On The Characterization And Distribution Of *Staphylococcus* And *Micrococcus* Species On Animal Skin. *Applied And Environmental Microbiology*, 31(1), 53-59.
- Knoll, C., Divol, B., & Du Toit, M. 2008. Genetic Screening Of Lactic Acid Bacteria Of Oenological Origin For Bacteriocin-Encoding Genes. *Food Microbiology*, 25(8), 983-991.
- Kocur, M., & Kloos, W. E. 1992. The Genus *Micrococcus*. Balows, A., HG Trüper, M. Dworkin., W. Harder And K.-H. Schleifer. The Prokaryotes.
- Kolbert, C. P., & Persing, D. H. 1999. Ribosomal DNA Sequencing As A Tool For Identification Of Bacterial Pathogens. *Current Opinion In Microbiology*, 2(3), 299-305.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V. A., Pinto, C., Egounlety, M., Sossa, C., ... & Holzapfel, W. H. 2007. Characterisation And Biochemical Properties Of Predominant Lactic Acid Bacteria From Fermenting Cassava For Selection

- As Starter Cultures. *International Journal Of Food Microbiology*, 114(3), 342-351.
- Lambert, B., Joos, H., Dierickx, S., Vantomme, R., Swings, J., Kersters, K., & Van Montagu, M. 1990. Identification And Plant Interaction Of A *Phyllobacterium* Sp., A Predominant Rhizobacterium Of Young Sugar Beet Plants. *Applied And Environmental Microbiology*, 56(4), 1093-1102.
- Lee, J. C., Kim, S. G., & Whang, K. S. 2015. *Sphingobium Subterraneum* Sp. Nov., Isolated From Ground Water. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_2), 393-398.
- Leuschner, R. G., & Boughtflower, M. P. 2002. Laboratory-Scale Preparation Of Soft Cheese Artificially Contaminated With Low Levels Of *Escherichia Coli* O157, *Listeria Monocytogenes*, And *Salmonella* Enterica Serovars Typhimurium, Enteritidis, And Dublin. *Journal Of Food Protection*, 65(3), 508-514.
- Lusk, T. S., Ottesen, A. R., White, J. R., Allard, M. W., Brown, E. W., & Kase, J. A. 2012. Characterization Of Microflora In Latin-Style Cheeses By Next-Generation Sequencing Technology. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-10.
- Mack, D., Davies, A. P., Harris, L. G., Jeeves, R., Pascoe, B., Knobloch, J. K. M., ... & Wilkinson, T. S. 2013. *Staphylococcus Epidermidis* In Biomaterial-Associated Infections. In *Biomaterials Associated Infection* (Pp. 25-56). Springer, New York, NY.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. 2006. Probiotic Potential Of *Lactobacillus* Strains Isolated From Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Martínez-Cuesta, M. C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T., & Peláez, C. 2010. Control Of Late Blowing In Cheese By Adding Lacticin 3147-Producing *Lactococcus Lactis* IFPL 3593 To The Starter. *International Dairy Journal*, 20(1), 18-24.
- Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., ... & Vallejo-Córdoba, B. 2020. Cheese Whey Fermentation By Its Native

- Microbiota: Proteolysis And Bioactive Peptides Release With ACE-Inhibitory Activity. *Fermentation*, 6(1), 19.
- Mccartney, A. L. 2002. Application Of Molecular Biological Methods For Studying Probiotics And The Gut Flora. *British Journal Of Nutrition*, 88(S1), S29-S37.
- Mcfarland, L. V. 1998. Epidemiology, Risk Factors And Treatments For Antibiotic-Associated Diarrhea. *Digestive Diseases*, 16(5), 292-307.
- Mclean, R. A., & Sulzbacher, W. L. 1953. *Microbacterium Thermosphactum*, Spec Nov; A Nonheat Resistant Bacterium From Fresh Pork Sausage. *Journal Of Bacteriology*, 65(4), 428-433.
- Mcsweeney, P. L. H. 2004. Biochemistry Of Cheese Ripening: Introduction And Overview. *Cheese: Chemistry, Physics And Microbiology*, 1, 347-360.
- Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J. M., Chobert, J. M., ... & Haertlé, T. 2014. Diversity Of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Isolated From Mediterranean Fish Viscera. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 30(4), 1207-1217.
- Miltiadous, G., & Elisaf, M. 2011. Native Valve Endocarditis Due To *Micrococcus Luteus*: A Case Report And Review Of The Literature. *Journal Of Medical Case Reports*, 5(1), 1-3.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., ... & Yadav, H. 2008. Molecular Approaches For Identification And Characterization Of Lactic Acid Bacteria. *Journal Of Digestive Diseases*, 9(4), 190-198.
- Morrissey, B. J., Helgason, T., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Genersch, E., & Budge, G. E. 2015. Biogeography Of *P. Aenibacillus* Larvae, The Causative Agent Of American Foulbrood, Using A New Multilocus Sequence Typing Scheme. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1414-1424.
- Mukamolova, G. V., Murzin, A. G., Salina, E. G., Demina, G. R., Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., & Young, M. 2006. Muralytic Activity Of *Micrococcus Luteus* Rpf And Its Relationship To Physiological Activity In Promoting Bacterial Growth And Resuscitation. *Molecular Microbiology*, 59(1), 84-98.
- Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., & Young, M. 2002. The Rpf Gene Of *Micrococcus Luteus*

- Encodes An Essential Secreted Growth Factor. *Molecular Microbiology*, 46(3), 611-621.
- Negm, G. E. S. 2018. Classification, Antimicrobial Potential, Industrial Applications And Probiotic Capability Of Lactic Acid Bacteria: A Review Article. *Research Journal Of Applied Sciences*, 13(12), 742-757.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. 1996. Biosynthesis Of Bacteriocins In Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2), 113-128.
- Nes, I. F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H. H., & Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified Peptidebacteriocins Produced By Lactic Acid Bacteria. *Peptide Antibiotics: Discovery, Mode Of Actions, And Applications*. New York: Marcel Dekker, 81-117.
- Nijhuis, E. H., Maat, M. J., Zeegers, I. W. E., Waalwijk, C., & Van Veen, J. A. 1993. Selection Of Bacteria Suitable For Introduction Into The Rhizosphere Of Grass. *Soil Biology And Biochemistry*, 25(7), 885-895.
- Odeyemi, O. A., Ahmad, A., & Usup, G. 2012. In-Vitro Antimicrobial Activity Of *Aeromonas Spp* Isolated From Estuary Using Different Screening Protocols. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 3(2), 428.
- Ohkuma, M., Shimizu, H., Thongaram, T., Kosono, S., Moriya, K., Trakulnaleamsai, S., ... & Kudo, T. 2003. An Alkaliphilic And Xylanolytic *Paenibacillus* Species Isolated From The Gut Of A Soil-Feeding Termite. *Microbes And Environments*, 18(3), 145-151.
- Okuno, N. T., Freire, I. R., Segundo, R. T., Silva, C. R., & Marin, V. A. 2018. Polymerase Chain Reaction Assay For Detection Of *Stenotrophomonas Maltophilia* In Cheese Samples Based On The Smet Gene. *Current Microbiology*, 75(12), 1555-1559.
- Olson, N. F. 1990. The Impact Of Lactic Acid Bacteria On Cheese Flavor. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 131-147.
- Orla-Jensen, S. 1919. *The Lactic Acid Bacteria* (Vol. 3, No. 2). Høst.

- Padilla, D., Remuzgo-Martínez, S., Acosta, F., & Ramos-Vivas, J. 2012. Hafnia Alvei And Hafnia Paralvei. Taxonomy Defined But Still Far From Virulence And Pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 163(1-2), 200-201.
- Pappas, C. P., Kondyli, E., Voutsinas, L. P., & Mallatou, H. 1996. Effects Of Starter Level, Draining Time And Aging On The Physicochemical, Organoleptic And Rheological Properties Of Feta Cheese. *International Journal Of Dairy Technology*, 49(3), 73-78.
- Patir, B., Ates, G., & Dinçoğlu, A. H. 2001. Geleneksel Yöntemle Üretilen Tulum Peynirinin Olgunlaşması Sırasında Meydana Gelen Mikrobiyolojik Ve Kimyasal Değişimler Üzerine Araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15(1), 1-8.
- Pelczar, J.M., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. 1993. Microbiology: Concepts And Applications, *Mcgraw-Hill Inc.*, USA
- Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T. R. 2007. The Genomics Of Lactic Acid Bacteria. *Trends In Microbiology*, 15(12), 546-553.
- Pichhardt, K. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi Ve Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar Ve Uygulamalar. *Literatür Yayınları*, Manisa, 176-178s
- Pintado, C. M. B. S., Oliveira, A., Pampulha, M. E., & Ferreira, M. A. S. S. 2005. Prevalence And Characterization Of *Listeria Monocytogenes* Isolated From Soft Cheese. *Food Microbiology*, 22(1), 79-85.
- Podrzaj, L., Burtscher, J., Küller, F., & Domig, K. J. 2020. Strain-Dependent Cheese Spoilage Potential Of *Clostridium Tyrobutyricum*. *Microorganisms*, 8(11), 1836.
- Pot, B., Devriese, L. A., Hommez, J., Miry, C., Vandemeulebroecke, K., Kersters, K., & Haesebrouck, F. 1994. Characterization And Identification Of *Vagococcus Fluvialis* Strains Isolated From Domestic Animals. *Journal Of Applied Bacteriology*, 77(4), 362-369.
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., & Schleifer, K. H. 1994. Taxonomy Of Lactic Acid Bacteria. In *Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria* (Pp. 13-90). Springer, Boston, MA.

- Ramos, A., & Dámaso, D. 2000. Extraintestinal Infection Due To *Hafnia Alvei*. *European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*, 19(9), 708-710.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. 2010. Lactic Acid Bacteria: Their Antimicrobial Compounds And Their Uses In Food Production. *Annals Of Biological Research*, 1(4), 218-228.
- Reddy, G. S. N., Prakash, J. S. S., Srinivas, R., Matsumoto, G. I., & Shivaji, S. 2003. *Leifsonia Rubra* Sp. Nov. And *Leifsonia Aurea* Sp. Nov., Psychrophiles From A Pond In Antarctica. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 53(4), 977-984.
- Ridell, J., Siitonen, A., Paulin, L., Lindroos, O., Korkeala, H., & Albert, M. J. 1995. Characterization Of *Hafnia Alvei* By Biochemical Tests, Random Amplified Polymorphic DNA PCR, And Partial Sequencing Of 16S Rna Gene. *Journal Of Clinical Microbiology*, 33(9), 2372-2376.
- Ridell, J., Siitonen, A., Paulin, L., Lindroos, O., Korkeala, H., & Albert, M. J. 1995. Characterization Of *Hafnia Alvei* By Biochemical Tests, Random Amplified Polymorphic DNA PCR, And Partial Sequencing Of 16S Rna Gene. *Journal Of Clinical Microbiology*, 33(9), 2372-2376.
- Rilla, N., Martinez, B., & Rodriguez, A. 2004. Inhibition Of A Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strain In Afuega'l Pitu Cheese By The Nisin Z–Producing Strain *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* IPLA 729. *Journal Of Food Protection*, 67(5), 928-933.
- Ringø, E., Bendiksen, H. R., Gausen, S. J., Sundsfjord, A., & Olsen, R. E. 1998. The Effect Of Dietary Fatty Acids On Lactic Acid Bacteria Associated With The Epithelial Mucosa And From Faecalia Of Arctic Charr, *Salvelinus Alpinus* (L.). *Journal Of Applied Microbiology*, 85(5), 855-864.
- Rocourt, J. 1994. *Listeria Monocytogenes*: The State Of The Science. *Dairy Food Environ. Sanitation*, 14, 70-82.
- Rodrigues, M. X., Silva, N. C. C., Trevilin, J. H., Cruzado, M. M. B., Mui, T. S., Duarte, F. R. S., ... & Porto, E. 2017. Molecular Characterization And Antibiotic Resistance Of *Staphylococcus Spp.* Isolated From Cheese Processing Plants. *Journal Of Dairy Science*, 100(7), 5167-5175.

- Ruas-Madiedo, P., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. 2005. Invited Review: Methods For The Screening, Isolation, And Characterization Of Exopolysaccharides Produced By Lactic Acid Bacteria. *Journal Of Dairy Science*, 88(3), 843-856.
- Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.). 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological And Functional Aspects* (Vol. 139). CRC Press.
- Salminen, S., Deighton, M., & Gorbach, S. 1993. *Lactic Acid Bacteria In Health And Disease* (Pp. 199-225). Marcel Dekker Inc..
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. 1999. Probiotics: How Should They Be Defined. *Trends In Food Science & Technology*, 10(3), 107-110.
- Sánchez-Sánchez, A. V., Camp, E., & Mullor, J. L. 2011. Fishing Pluripotency Mechanisms In Vivo. *International Journal Of Biological Sciences*, 7(4), 410.
- Sankarankutty, M., & Damani, J. 2018. Isolation Of Antibioticsresistant *Micrococcus Aloeverae* From Milk Powder. *J Food Microbiol Saf Hyg*, 3, 1-5.
- Santos, E. C. D., & Genigeorgis, C. 1981. Survival And Growth Of *Staphylococcus Aureus* In Commercially Manufactured Brazilian Minas Cheese. *Journal Of Food Protection*, 44(3), 177-184.
- Sarimehmetoğlu, B. 1995. Sütte Ve Peynirde *Listeria Monocytogenes*' In Bulunuşu Ve Önemi. *Gıda*, 20(5).
- Sattin, E., Andreani, N. A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Novelli, E., ... & Cardazzo, B. 2016. Microbial Dynamics During Shelf-Life Of Industrial Ricotta Cheese And Identification Of A *Bacillus* Strain As A Cause Of A Pink Discolouration. *Food Microbiology*, 57, 8-15.
- Schillinger, U. 1989. Antibacterial Activity Of *Lactobacillus Sake* Isolated From Meat. *Applied And Environmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- Schirmer, B. C. T., Heir, E., Møretrø, T., Skaar, I., & Langsrud, S. 2013. Microbial Background Flora In Small-Scale Cheese Production Facilities Does Not Inhibit Growth And Surface Attachment Of *Listeria Monocytogenes*. *Journal Of Dairy Science*, 96(10), 6161-6171.
- Şengül, M. 2001. *Tulum Peynirinden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakteri Suşlarının Starter Kültür Özellikleri Ve Peynirlerin Bazı Özelliklerinin Tespiti* (Doctoral

- Dissertation, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum).
- Seral, C., Castillo, J. F., Llorente, T. M., Varea, M., Clavel, A., Rubio, C. M., & Gómez-Lus, R. 2001. The Eaea Gene Is Not Found In *Hafnia Alvei* From Patients With Diarrhea In Aragón, Spain. *International Microbiology*, 4(2), 81-82.
- Şimşek, Ö. 2003. Uşak Ve Yöresi Ekşi Hamurlarından İzole Edilen Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması Ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Denizli*.
- Somerville-Millar, D. A., & Noble, W. C. 1974. Resident And Transient Bacteria Of The Skin. *Journal Of Cutaneous Pathology*, 1(6), 260-264.
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., Mackichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., ... & Lynch, S. V. 2015. Use Of 16S Rna Gene For Identification Of A Broad Range Of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *Plos One*, 10(2), E0117617.
- 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.
- Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M., & Marciňáková, M. 2008. Occurrence Of The Structural Enterocin A, P, B, L50B Genes In *Enterococci* Of Different Origin. *Veterinary Microbiology*, 132(3-4), 293-301.
- Suilen, J.G., Pittet, D., Siegrist, H. (1999). *Stenotrophomonas maltophilia*: Aktuelle Realitäten im Spitalmilieu. *Swiss-NOSO*. 6(3): 1-6.
- Surono, I., & Hosono, A. 2002. Fermented Milks| Starter Cultures.
- Surono, S., & Hosono, A. 2011. Fermented Milks - Starter Cultures. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. Mcsweeney (Eds.). *Encyclopedia Of Dairy Sciences* (Pp. 477–482). San Diego: Academic Press.
- Switaj, T. L., Winter, K. J., & Christensen, S. 2015. Diagnosis And Management Of Foodborne Illness. *American Family Physician*, 92(5), 358-365.
- Takeuchi, M., Hamana, K., & Hiraishi, A. 2001. Proposal Of The Genus *Sphingomonas* Sensu Stricto And Three New Genera, *Sphingobium*,

- Novosphingobium* And *Sphingopyxis*, On The Basis Of Phylogenetic And Chemotaxonomic Analyses. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1405-1417.
- Tamang, J. P., & Kailasapathy, K. (Eds.). 2010. Fermented Foods And Beverages Of The World. CRC Press.
- Tarakçı, Z., Bölük, M., & Karaağaç, M. 2015. Ordu İlinde Tüketicilerin PEYNİR Tüketim Alışkanlıkları. *Ordu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 55-62.
- Tekinşen, O. C., & Atasever, M. 1994. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını*.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. III. Baskı. *Hatıñoğlu Yayınevi. Ankara*.
- Teuber, M., & Geis, A. 2006. The Genus *Lactococcus*. *The Prokaryotes*, 4, 205-228.
- Toreci, K., & Topcu, A. 2002. Soyletir, Vg. Doğanay, “*Escherichia Türleri*” *İnfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri*, 2, 1564-1574.
- Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. 2015. A Standard Bacterial Isolate Set For Research On Contemporary Dairy Spoilage. *Journal Of Dairy Science*, 98(8), 5806-5817.
- Tükel, Ç., & Doğan, H. B. 2000. *Staphylococcus Aureus*. *Gıda Mikrobiyolojisi Ve Uygulamaları*, 2, 357-366.
- Tunail, N., Özkaya, F. D., Gürsel, A., & Tamuçay, B. 2001. Starter Bakterilerin Olufiturdıkları Biyojen Aminlerin Saptanması Ve Salamura Beyaz Peynirdeki Biyojen Amine Bağlı Risk Faktörünün Belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje*, (96-11), 12-04.
- Üçüncü, M. 2005. *Süt Ve Mamulleri Teknolojisi*. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi.
- Uğurdoğan, E. 2020. *İstanbul'da Satılan Tulum Peynirlerinde Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi Ve Geleneksel Tulum Peyniri İle Karşılaştırılması* (Master's Thesis, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı).

- Ünlütürk, A. 1998. Süt Ve Süt Ürünlerinde Mikrobiyolojik Bozulmalar, Patojen Mikroorganizmalar Ve Muhafaza Yöntemleri. *Gıda Mikrobiyolojisi*, 1, 289-307.
- Uraz, G., & Gündoğan, N. 1998. Beyaz Peynirlerin Mezofil Florasında Koliform, Streptokok, LLP (Laktobasil, Lökonostok, Pediokok) Stafilokok Ve Basillus' ların Bulunma Sıklıkları. *Gıda*, 23(6), 391-401.
- Urhan, G. Y., & Akin, A. T. D. 2012. *Ankara'da Çeşitli Kaynaklardan Satın Alınan Beyaz Peynirlerin Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü Üzerinde Araştırmalar* (Doctoral Dissertation, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı).
- Ustaçelebi, Ş. 1999. *Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi.
- Wang, Y., & Qian, P. Y. 2009. Conservative Fragments In Bacterial 16S Rna Genes And Primer Design For 16S Ribosomal DNA Amplicons In Metagenomic Studies. *Plos One*, 4(10), E7401.
- Williams, R. P., & Qadri, S. M. H. 1980. The Pigment Of *Serratia*. 31–79. Von Graevenitz, A., And Rubin, SJ (Ed.) The Genus *Serratia*.
- Wood, B. J., & Warner, P. J. (Eds.). 2003. *Genetics Of Lactic Acid Bacteria* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Yaygın, H. 1998. Gıda Ve Personel Hijyeni. *Basılmamış Ders Notları, Antalya*.
- Yaygın, H., & Demiryol, I. 1982. Peynirlerde Mikrobiyal Bozulmalar. *Ziraat Fakültesi Dergisi-Ege Üniversitesi*.
- Yerlikaya, O. Ve Kesenkaş, H. 2009. Laktik Asit Bakterilerinin Ve Fermente Süt Ürünlerinin Antimikrobiyal Özellikleri. *Hasad Gıda*, 25(290): 30-3
- Yörük, G., & Güner, A. 2011. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması Ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.
- Zarzecka, U., Zadernowska, A., & Chajęcka-Wierzchowska, W. 2020. Starter Cultures As A Reservoir Of Antibiotic Resistant Microorganisms. *LWT*, 127, 109424.