

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

**GELENEKSEL OLARAK ÜRETİLEN BAZI KÖY PEYNİRLERİNDEN
İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI
VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda KILIÇ

Enstitü Anabilim Dalı

: GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı

: Doç. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ

Temmuz 2017

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

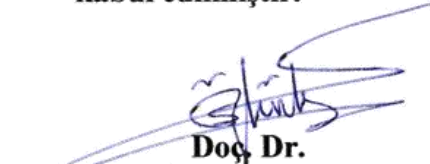
GELENEKSEL OLARAK ÜRETİLEN BAZI KÖY PEYNİRLERİNDEN
İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI
VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

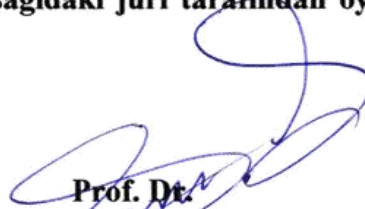
YÜKSEK LİSANS TEZİ


Eda KILIÇ

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 03.07.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr.
Suzan ÖZTÜRK YILMAZ
Jüri Başkanı


Prof. Dr.
Ahmet AYAR
Üye


Prof. Dr.
İbrahim ÇAKIR
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Eda KILIÇ

03.07.2017

TEŞEKKÜR

Araştırmanın her aşamasında bilgi ve deneyimlerindenden yararlandığım, zaman ayırıp çalışmanın tım aşamalarında titizlikle takip ederek yardımlarını esirgemedeni beni teşvik ederek yönlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Suzan ÖZTÜRK YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını eksik etmeyen, çalışmamı tamamlayabilmem için tım imkânlarını sağlayan ve bizzat takip eden, Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Mikrobiyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. İpek MUMCUOĐLU'na teşekkür ederim.

Gıda Mühendisliği Bölümünde destekleri için Prof. Dr. Ahmet AYAR hocama ve tım yoğun zamanlarımdaki yardımları ve manevi desteklerini gördüğüm çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Alev AKÇAY, Arş. Gör. Elif SEZER, Arş. Gör. Hatice SIÇRAMAZ, Arş. Gör. İnci CERİT, Arş. Gör. Gülşah KARABULUT başta olmak üzere çeşitli sorunlarımda her türlü yardımlarıyla bana destek olan Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün Öğretim elemanlarına çok teşekkür ederim.

Maddi açıdan desteklerinden dolayı Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2017-50-01-006) teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim beni hayatım boyunca teşvik eden ve anlayış gösteren başta Annem Leyla KILIÇ, Babam Ahmet KILIÇ olmak üzere tım aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarak tım sammiyetimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ | v |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | vi |
| TABLolar LİSTESİ | vii |
| ÖZET | viii |
| SUMMARY | ix |
| BÖLÜM 1. | |
| GİRİŞ | 1 |
| BÖLÜM 2. | |
| KAYNAK ARAŞTIRMASI | 4 |
| 2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Fermentasyonu..... | 4 |
| 2.2. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri..... | 5 |
| 2.2.1. <i>Enterococcus</i> | 5 |
| 2.2.2. <i>Leuconostoc</i> | 6 |
| 2.2.3. <i>Streptococcus</i> | 6 |
| 2.2.4. <i>Lactobacillus</i> | 7 |
| 2.2.5. <i>Lactococcus</i> | 7 |
| 2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri | 7 |
| 2.3.1. Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler | 9 |
| 2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması | 12 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1. Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması..... | 12 |
| 2.4.2. Laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması. | 14 |
| 2.4.3. Laktik asit bakterilerinde proteomik çalışmaları..... | 15 |

BÖLÜM 3.

| | |
|--|----|
| MATERYAL VE YÖNTEM | 18 |
| 3.1. Materyal | 18 |
| 3.2. Yöntem | 19 |
| 3.2.1. Peynir örneklerinden laktik asit bakterisi izolasyonu..... | 19 |
| 3.2.2. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması..... | 21 |
| 2.2.2.1. Gram boyama | 21 |
| 2.2.2.2. Katalaz testi | 21 |
| 2.2.2.3. Farklı sıcaklıklarda gelişme testi | 22 |
| 2.2.2.4. Farklı pH'larda gelişme testi | 22 |
| 2.2.2.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi | 22 |
| 2.2.2.6. Sitrati kullanma | 23 |
| 2.2.2.7. Metil-Red, Voges-Proskauer testi | 23 |
| 2.2.2.8. Hareket testi | 23 |
| 2.2.2.9. Glikozdan gaz oluşturma testi | 24 |
| 2.2.2.10. % 0.1 metilen mavisi indirgeme testi..... | 24 |
| 3.2.3. MALDI-TOF MS yöntemi ile bakterilerin tanımlanması..... | 24 |
| 3.2.4. Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi | 25 |
| 3.2.5. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması | 26 |

BÖLÜM 4.

| | |
|--|----|
| ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 28 |
| 4.1. Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu..... | 28 |
| 4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanma Sonuçları..... | 29 |
| 4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi.. | 49 |

| | |
|--|----|
| 4.4. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosinlerin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi..... | 54 |
|--|----|

BÖLÜM 5.

| | |
|-------------------------|----|
| SONUÇ VE ÖNERİLER | 58 |
|-------------------------|----|

| | |
|-----------------|----|
| KAYNAKLAR | 61 |
|-----------------|----|

| | |
|----------------|----|
| ÖZGEÇMİŞ | 73 |
|----------------|----|

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---------------|---|
| API | : Application Programming Interface |
| ATCC | : Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu |
| <i>B.</i> | : <i>Bacillus</i> |
| BSM | : Bifidus Selective Agar |
| <i>C.</i> | : <i>Cronobacter</i> |
| <i>E.</i> | : <i>Enterococcus</i> |
| GRAS | : Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen |
| KAA | : Kanamycin Esculin Azide Agar |
| kob | : Koloni Oluşturan Birim |
| LAB | : Laktik Asit Bakterisi |
| <i>L.</i> | : <i>Listeria</i> |
| <i>Lb.</i> | : <i>Lactobacillus</i> |
| <i>Lc.</i> | : <i>Lactococcus</i> |
| <i>Leu.</i> | : <i>Leuconostoc</i> |
| MALDI-TOF | : Matrix-Assisted Laser Desorption/İonization |
| MRS | : De Man Rogosa Sharpe Agar |
| MR-VP | : Metil Red, Voges Proskauer |
| <i>S.</i> | : <i>Salmonella</i> |
| <i>Staph.</i> | : <i>Staphylococcus</i> |
| <i>St.</i> | : <i>Streptococcus</i> |
| TSA | : Tyriptic Soy Agar |
| TSB | : Tyriptic Soy Broth |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Laktik asit bakterileri identifikasyon şeması..... | 14 |
| Şekil 4.1. MALDI-TOF MS yöntemine göre tüm peynirlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının suşlara göre yüzde olarak dağılımı..... | 45 |
| Şekil 4.2. Bezde üretilen Tulum peynirinden elde edilen süpernatantın <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544'ye karşı antimikrobiyal etkisi.... | 49 |
| Şekil 4.3. <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644'e karşı izolatların oluşturduğu zon çapları (mm)..... | 51 |
| Şekil 4.4. <i>Esherichia coli</i> O157:H7'ye karşı izolatların oluşturduğu zon çapları (mm)..... | 51 |
| Şekil 4.5. <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544'e karşı izolatların oluşturduğu zon çapları (mm)..... | 52 |
| Şekil 4.6. <i>Bacillus cereus</i> ve <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028'ya karşı izolatların oluşturduğu zon çapları (mm)..... | 53 |
| Şekil 4.7. <i>Enterococcus faecium</i> F72 ve <i>Enterococcus faecalis</i> IA2 tarafından üretilen ham bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesi..... | 55 |
| Şekil 4.8. Tulum peynirinden elde edilen kısmi bakteriyosinin <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028'e karşı antimikrobiyal etkisi..... | 55 |
| Şekil 4.9. Peynirlere göre antimikrobiyal etkili bakterilerin ve kısmi bakteriyosinlerin sayıları..... | 57 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan peynirler ve kodları..... | 18 |
| Tablo 4.1. Peynirlerden elde edilen izolat sayısı..... | 28 |
| Tablo 4.2. Peynir örneklerinden izole edilen ve M17 Agar'da gelişen izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları..... | 31 |
| Tablo 4.3. Peynir örneklerinden izole edilen ve MRS Agar'da gelişen izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları | 34 |
| Tablo 4.4. Peynir örneklerinden izole edilen ve KAA'da gelişen izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları | 38 |
| Tablo 4.5. MALDI-TOF MS yöntemi ve biyokimyasal yöntemler ile izolatların tanımlama sonuçları | 41 |
| Tablo 4.6. Peynirlerden izole edilen ve MALDI-TOF MS ile tanısı yapılan suşların sayıları..... | 48 |
| Tablo 4.7. Antimikrobiyal etki gösteren izolatlar..... | 50 |
| Tablo 4.8. Antimikrobiyal etki göstermeyen izolatlar..... | 50 |

ÖZET

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, MALDI-TOF MS, yöresel peynirler, antimikrobiyal aktivite, bakteriyosin

Gıda güvenliği çok önemlidir ve gıda ürünleri hazırlanırken insan sağlığını etkileyebilecek her olası tehlike ve risk göz önünde bulundurulmalıdır. Tüketiciler, hiçbir kimyasal katkısı olmayan, doğal ve güvenli gıda ile beslenmeyi tercih eder. Bu anlamda, laktik asit bakterilerinin kullanımı, doğal ve tercih edilen bir koruma yöntemidir.

Bu çalışmada geleneksel yöntemle üretilmiş 21 adet peynir örneği ile çalışılmış; toplam 525 izolat elde edilmiştir. Geleneksel peynir örneklerinden izole edilen bu izolatlardan 142 adet laktik asit bakterisi, biyokimyasal testler ile tanımlanmıştır. Biyokimyasal test sonuçlarına göre 10 adet leukonostok, 47 adet laktobasil, 44 adet enterokok olmak üzere toplam 102 adet laktik asit bakteri izolatı cins düzeyinde tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS analizi ile de 71 suş tür düzeyinde *E. durans* (6), *E. faecalis* (18), *E. faecium* (24), *E. italicus* (2), *Lb. brevis* (1), *Lb. paracasei* (2), *Lb. plantarum* (1), *Lc. lactis* (3), *Leu. lactis* (1), *Leu. mesenteroides* (11) ve *St. parauberis* (2) olarak tanımlanmıştır.

Araştırma bulgularına göre 21 adet peynir örneğinden 10 adet antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Laktik asit bakteri suşlarından elde edilen süpernatların antimikrobiyal aktivitesi iki farklı yöntemle incelenmiştir. Öncelikle, işlenmemiş süpernatant kullanılarak toplam antibakteriyel etki tespit edilmiştir. Daha sonra, laktik asit bakteri suşlarından elde edilen ve kısmi saflaştırma işlemi uygulanan ham bakteriyosin preparatları (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii* ATCC 29544, *B. cereus*, *S. Typhimurium* ATCC 14028) patojenlerine karşı disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. *E. faecium* ve *E. faecalis* olarak tanımlanan izolatların ürettiği bakteriyosinler, *E. coli* O157: H7 ve *S. Typhimurium* ATCC 14028'e karşı antibakteriyel etki sergilemiştir. Antimikrobiyal etkinin büyük çoğunluğunun bu organizmalar tarafından üretilen organik asitlerden kaynaklandığı belirlenmiştir.

IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONALLY PRODUCED LOCAL CHEESE

SUMMARY

Keywords: Lactic acid bacteria, MALDI-TOF MS, local cheese, antimicrobial activity, bacteriocin

Food safety is very important and food products are supposed to be prepared regarding every possible hazard and risk which may affect human health. Consumers prefer natural and safe food with no chemical additive and loss in nutrition. In this means, use of lactic acid happens to be a natural and preferable preservation method.

In this study, traditionally made 15 cheese were used; total 525 isolates was obtained from cheeses. 142 lactic acid bacteria isolated from local cheese samples were identified by using biochemical tests. The lactic acid bacteria strains were identified at genus levels as *Leuconostoc* (10), *Lactobacillus* (47) and *Enterococcus* (44) by biochemical tests. The 71 strains were identified at species levels as *E. durans* (6), *E. faecalis* (18), *E. faecium* (24), *E. italicus* (2), *Lb. brevis* (1), *Lb. paracasei* (2), *Lb. plantarum* (1), *Lc. lactis* (3), *Leu. lactis* (1), *Leu. mesenteroides* (11), and *St. parauberis* (2) by MALDI-TOF MS analysis.

10 isolates had antimicrobial activity were obtained from 21 samples of local cheese. Supernatants obtained from lactic acid bacteria strains by centrifuging the 24-48 hour incubated lactic acid bacteria strains. Supernatants were studied for two effect mechanisms. Firstly the total antibacterial effect was observed by using the unprocessed supernatant. Then, bacteriocins were obtained from lactic acid bacteria strains isolated from cheeses sources by partial purification and antimicrobial activity of these bacteriocins against some pathogenic microorganisms (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii* ATCC 29544, *B. cereus*, *S. Typhimurium* ATCC 140828) were compared. Disc diffusion method were tested. Bacteriosins produced by isolates identified as *E. faecium* and *E. faecalis* demonstrated antibacterial activity against *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* ATCC 14028. It was found that major antimicrobial effect was due to organic acids produced by these organisms.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), patojenik ve bozulma yapan mikroorganizmaları inhibe edebilmeleri ve aynı zamanda lezzet ve dokuda arzu edilen değişiklikleri yapabilmeleri nedeniyle fermente gıdaların üretimi için binlerce yıldır kullanılmıştır. Bu grubun temsilcilerinin çoğu insan için herhangi bir sağlık riski oluşturmadığı ve birçok fermente gıdada yaygın olduğu için, GRAS (Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen) organizmalar olarak kabul edilmektedir (Holzapfel ve ark., 1995). Bu tür probiyotik kültürlerin güvenli olduğu ve insanlara önemli ölçüde sağlık açısından yararlı olduğu bilinmektedir (Adams, 1999). LAB'nin antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunan çeşitli faktörler tanımlanmıştır. Bu bakteriler, organik asitler (laktik asit, asetik asit, formik asit, fenilaktik asit, kaproik asit), hidrojen peroksit, karbon dioksit, diasetil, etanol, bakteriyosin, reuterin ve reuterisiklin gibi patojenik ve bozulma etmeni mikroorganizmaları engelleyebilen, raf ömrünü uzatan ve gıda ürünlerinin güvenliğini arttıran farklı doğal antimikrobiyal maddeler üretmektedirler (Aymerich ve ark., 2000, Holzapfel ve ark., 1995, Messens ve De Vuyst, 2002). Buna göre hem hijyen hem de güvenlik noktalarına bakış açısından starter kültür olarak LAB'ın veya bakteriyosinlerin kullanımı önerilmektedir (O'Keefe ve Hill, 1999) Ayrıca LAB'nin etanol, aroma bileşikleri, ekzopolisakarit ve çeşitli enzimleri üretimi de önemlidir. Bu şekilde ürünlerin raf ömrünün ve mikrobiyolojik açıdan güvenilirliğinin artırılmasına, yapısının geliştirilmesine ve nihai ürünün duyuşal profiline katkıda bulunmaktadır. Şeker polimerleri, tatlandırıcılar ve vitaminler üreten, probiyotik özelliklere sahip bu bakterilerin insan sağlığına olumlu etkileri de bulunmaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Fermantasyon sürecini kısaltmak ve fermantasyon başarısızlığı riskini azaltmak için, bilinçli bir şekilde seçilmiş bir başlangıç kültürü kullanmak gerekmektedir. Günümüzde, fermente yiyecek ve içeceklerin spontan fermantasyon yoluyla üretimi,

az gelişmiş ülkelerde ucuz ve güvenilir bir koruma yöntemi olarak görülürken, gelişmiş ülkelerde fermente gıdaların büyük ölçekli üretimi, gıda endüstrisinin önemli bir kolu haline gelmiştir (Leroy ve ark., 2004). Seçilen starter kültürlerin direkt olarak eklenmesi, son ürünün standardizasyonu üzerinde yüksek bir etkiye sahiptir. Uygun fizyolojik ve metabolik özelliklere sahip olan suşlar doğal yaşam alanlarından veya fermente edilmiş ürünlerden izole edilmektedir (Oberman ve Libudzisz, 1998). Fakat bu starter kültürler son ürünün istenen özelliklerine ve işlevlerine göre yeterince değişiklik gösterme yeteneğine sahip değildir. Bu yüzden LAB'leri bazı önemli metabolik özelliklerini çoğalma sırasında kaybedebilirler. Bu nedenle starter kültürler için biyoçeşitlilik sınırlı kalır. Böylece orijinal ürün benzersizliğini kaybeder ve ürünü popüler hale getiren özelliklerinin kaybolmasına neden olur (Caplice ve Fitzgerald, 1999). Geleneksel fermente gıdaların karmaşık ekosistemlerinden izole edilen saf kültürler, endüstriyel starter kültür olarak kullanılan suşlardan güçlü bir şekilde farklılaşan çeşitli metabolik aktiviteler sergilemektedir (Klijn, Weerkamp ve de Vos, 1995). Buna ek olarak, bu suşlar kendi biyosentetik kapasitelerine bağımlıdır ve lezzet oluşumunda kilit rol oynayan daha fazla amino asit dönüştürücü enzim barındırırlar. Bu bulgular, devam eden küreselleşmenin dünyasında küçük ölçekli fermantasyon tesislerinin hayatta kalmasına katkıda buldukları için ekonomik açıdan önem taşımaktadır. Gıda fermantasyonunda starter kültürler olarak kullanılmak üzere bu türlerin geleneksel ürünlerden izole edilmesi yönünde bir eğilim mevcuttur (Beukes ve ark., 2001, De Vuyst ve ark., 2002 ve Hebert ve ark., 2000). Endüstriyel başlatıcı kültürler, ürün çeşitlendirmesi için gerekli özellikleri barındırmamaktadır. Fakat yeni ilginç starter kültürlerin ticari olarak bulunabilirliği sınırlı olmasına rağmen, LAB'leri farklı starter kültür olarak kimyasal katkı maddelerinin doğal bileşiklerle değiştirilmesini sağlayabilmekte ve aynı zamanda tüketiciye yeni, beğenilen, daha farklı gıda ürünleri sağlamaya yardımcı olabilmektedir (Chandan, 1999, Erkkilä ve ark., 2001, Jahreis ve ark., 2002, Pidcock ve ark., 2002 ve Ross ve ark., 2000).

Peynir; sütün, peynir mayası (rennin enzimi) veya zararsız organik asitlerle pıhtılaştırılarak, peynir suyunun ayrılmasından sonra pıhtının kesilmesi ve tuzlanması ile elde edilen bir fermente süt ürünüdür. Fermente süt ürünleri üretiminde hammadde

olan süt pastörize edilirken, zararlı mikroflora yanında ürün oluşumu sırasında yararlı olabilecek mikroflora da yok edilir. Bunların yerine genellikle 2-3 farklı starter kültür katılır.

Bazı peynirler ve bunlarla ilişkili bulunan laktik asit bakterileri

-Sert peynirler; *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

-Küçük gözenekli peynirler; *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*

-İsviçre ve İtalyan tipi peynirler; *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *St. thermophilus* (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Ülkemizde ise, yöresel peynirlerin çeşitliliği ve özellikle lezzetleri geniş halk kitleleri tarafından tanınmasına yol açmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen starter kültürler saklanamamış ve sanayi-niversite iř birliği çok fazla sağlanamamıştır. Son yıllarda doğal ürünlere talepteki artış nedeniyle bu konuya eğilim de artmıştır (Halkman ve Taşkın, 2010).

Bu çalışmada çeşitli yöresel peynirlerin üretiminde ürüne tat, koku, yapı ve görünüm bakımından istenilen nitelikleri kazandırmak amacıyla katılan potansiyel starter kültürlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla geleneksel peynir üretiminde tesadüfen kullanılmış, yani kendiliğinden gelişmiş olan laktik asit bakterileri doğal ürünlerden izole edilip tanımlanmış ve antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. İzole edilen ve tanımlanan LAB'leri starter ve probiyotik özellikleri daha sonra araştırılmak üzere stoğa alınarak, -80°C derecede muhafaza edilmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Fermentasyonu

LAB, Gram pozitif, bakterilerdir, genellikle spor yapmayan, morfolojik olarak kok veya çubuk, katalaz negatif; aerobik olmamakla birlikte aero-tolerant, asit toleranslı ve karbonhidratların fermentasyonu sırasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. LAB, doğada yaygın olarak bulunur (Lindgren ve Dobrogosz, 1990).

LAB; ilk olarak optimum büyüme sıcaklıklarına, morfolojilerine, ekolojilerine ve fizyolojik özelliklerine dayanarak sınıflandırılmıştır. *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* olarak üç alt gruba ayrılmıştır (Ehrmann ve Vogel, 2005). Laktik asit bakterileri, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* gibi cinslerin türlerini kapsamaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997; Carr ve ark., 2002). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009)'de yaptığı son taksonomi sınıflandırmasına göre Lactobacillales takımı *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* olmak üzere bu cinsleri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından 6 aileye ayırmıştır (Whitman ve ark., 2009).

Gıda fermentasyonu yüzlerce yıldır gıdaları korumak için bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Geleneksel olarak fermentasyonda kullanılan hammaddeler; meyveler, tahıllar, bal, sebze, süt, et ve balık gibi pek çok ürünü ihtiva etmektedir. Farklı hammaddeler, başlangıç kültürleri ve fermentasyon koşullarını seçerek, çok farklı gıda ürünleri elde etmek mümkündür. Mikroorganizmaların keşfedilmesi ile izole edilmiş ve iyi karakterize edilmiş kültürleri kullanarak ürünleri kontrollü koşullarda üretmek ve fermentasyon süreçlerini iyileştirmek mümkün olmuştur.

Laktik asit bakterileri fermente gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hansen, 2002).

Fermantasyon süreçlerinde dikkatle seçilmiş suşların starter kültür olarak uygulanması, doğal ve sağlıklı bir ürün elde edilmesine katkıda bulunur. LAB'leri kullanımı katkı maddelerinin doğal bileşiklerle değiştirilmesinin bir yoludur ve aynı zamanda yeni, farklı ürün üretilmesine katkı sağlayabilir. Farklı starter kültürler ile daha geniş ve esnek bir uygulama alanına olanak tanınmaktadır (Leroy ve De Vuyst, 2004). LAB'leri hem koruyucu özellikleri hem de doğal mikrobiyotaya verdikleri katkı nedeniyle, son zamanlarda karışık starter kültürler olarak da önem kazanmıştır. Tüm bunlara bağlı olarak gıda sistemlerinde bulunan laktik asit bakteri türlerinin tanımlanması önemli hale gelmiştir. Endüstriyel uygulamalar için en önemli nokta uygun LAB suşlarının seçimidir. Kullanılabilecek starter kültürlerin güvenli bir tanımlama ile spesifik ve kesin olarak tanımlanması bu noktada oldukça önemlidir.

LAB süt ve peynir gibi farklı kaynaklardan izole edilebilmektedir ve LAB'lerin lipolitik, proteolitik ve glikolitik enzimleri peynir muhafazasında ve lezzet üretiminde önem taşımaktadır. Gıdalarda LAB'lerini biyolojik koruma için önemli hale getiren husus antimikrobiyal bileşikler üretmeleridir. Bu özellikler, teknolojik potansiyeli olan yeni suşların araştırılmasını gerektirmektedir (Tulini ve ark., 2016).

2.2. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

2.2.1. *Enterococcus*

Enterokoklar uzun yıllar zararlı mikroorganizmalar olarak düşünülmesine karşın anne sütüne ait doğal mikrobiyota'ya ilişkin yapılan çalışmalarda baskın gruplar arasında oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle büyük olasılıkla anne sütündeki faydaların bir kısmının bu bakterilerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Jiménez ve ark., 2008). Enterokoklar önemli sağlık riski oluşturmazlar ancak bazı türlerinde zararlı olabilecek suşların bulunması bilimsel ve endüstriyel açıdan bu bakterileri tartışmalı hale getirmektedir. Gıda ürünlerinde enterokokların varlığına ilişkin endişeler nedeniyle

karşı çıkan ve destekleyen çeşitli görüşler bulunmaktadır (Foulquié-Moreno et al., 2006). Uzun zaman süresince enterokoklar gıdalardan izole edilmişlerdir ve deneysel kanıtlar bu ürünlerin raf ömrünün uzamasına katkıda bulduklarının altını çizmişlerdir. Enterokoklar çevreye çok iyi adaptasyon sağlayarak, bağırsak sağlığının iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenlerle potansiyel probiyotik mikroorganizma olarak kabul edilmektedirler. Enterokoklarla ilgili endişenin kaynağı, birçok suşunun zararlı olduğunun kanıtlanmasından kaynaklanmaktadır (Tenreiro et al., 2012). Enterokokların bazı suşları fırsatçı patojen olup hastane kaynaklı enfeksiyonlarda yaygın olarak görülmektedir (Özden et al., 2013). Buna rağmen probiyotik olarak potansiyel adaylar oldukları da rapor edilmiştir (Pimentel et al., 2007). Bu suşların probiyotik özellikleri daha iyi araştırılmalı ve ticari starter kültür olarak kullanılabilirliği için güvenilirliği daha kapsamlı araştırılmalıdır (Tenreiro et al., 2012). Enterokoklar, insanlarda ve hayvanlarda bağırsak mikrobiyotasında mikrobiyal dengeyi sağlamak için probiyotik olarak kullanılmaktadırlar (Franz et al., 1999). *E. faecium* ve *E. faecalis* probiyotik özellik gösteren iki türdür (Birolo et al., 2001; Erginkaya et al., 2007).

2.2.2. *Leuconostoc*

Leuconostoc spp. mezofil, Gram pozitif, fakültatif anaerobik ve katalaz negatif spor oluşturmeyen kok şeklinde bakterilerdir. Hayatta kalabilmek için 4.8 veya daha yüksek bir pH'ya ihtiyaç duymaktadırlar. Bazı suşlar, süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılabilirler. Bununla birlikte, *Leu. carnosum* çok etkili bir bakteriyosin üretmektedir. Bu bakteriyosin; *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerin gelişmesini engelmektedir (Feiner, 2006).

2.2.3. *Streptococcus*

Streptococcus spp. Gram pozitif, fakültatif anaerobik, katalaz negatif küresel veya ovoid şeklinde bakterilerdir. Gelişmeleri için gerekli optimum sıcaklık yaklaşık 36 °C'dir (Feiner, 2006).

2.2.4. *Lactobacillus*

Lactobacillus spp. Lactobacillaceae ailesinin üyeleridir. Bu grup psikrofilikten termofiliğe kadar geniş bir yelpazede yer alan, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde, hareketsiz, Gram pozitif, katalaz negatif ve fakültatif anaerob türlerden oluşmaktadır. Homofermentatif suşları daha fazladır ve bu suşlar, şekerleri gaz oluşturmadan laktik aside (% 90'dan fazla) dönüştürmektedir. Diğer yandan heterofermentatif türler, glikozun laktik aside fermente edilmesinin yanı sıra asetik asit ve CO₂ gibi diğer maddeleri de üretmektedir. Bu suşlar *L. monocytogenes* gibi bazı patojenlerin aşırı gelişmesini engellemektedir (Feiner, 2006).

Lactococcus türleri DNA'sında genellikle %50'den az guanin+sitozin nükleotidine sahip olan ve laktik asit bakterileri arasında en fazla bulunan cinstir. Fermentatif, aside dayanıklı ya da asidofiliktir ve karbonhidratlar, amino asitler, peptidler, yağ asidi esterleri, tuzlar, vitaminler vb. gibi kompleks besinlere ihtiyaç duymaktadırlar (Wood ve Holzapfel, 1992).

2.2.5. *Lactococcus*

Bu türler Gram pozitifdir ve endospor oluşturmazlar. Katalaz ve oksidaz negatiftirler. *Lactococcus* türleri 0,5-1,2x 0,5-1,5 µm büyüklüğünde küre ya da oval şeklindedir. Hareketsizlerdir ve kapsülleri yoktur. Fakültatif anaeropturlar. Fermentatif metabolizmaları ile bazı karbonhidratları fermente ederek ve laktik asit oluşturken gaz oluşturmazlar (Büyükyörük ve Soyutemiz, 2010).

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Özellikleri

LAB, patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik göstermektedirler. Antimikrobiyal bileşikler ürettikleri için fermente gıdalarda koruyucu kültür olarak da kullanılabilirler (Altuntaş ve ark., 2009). Artan dünya nüfusu ile birlikte beslenme gereksiniminin karşılanması, mikrobiyal kaynaklı ekonomik kayıplardan kaçınma ihtiyacı ve gıda kaynaklı hastalıklardan korunmak için birçok gıda muhafaza

yöntemi geliştirilmiştir. Fakat gıda endüstrisinde doğal biyolojik yöntemlerle muhafaza işleminin gıda ile ilgili birçok sorunun çözümünü sağlayabileceği düşünülmektedir (Galvez ve ark., 2008).

LAB'leri ve ürettikleri antimikrobiyal bileşikler kullanılarak gıdaların raf ömrünü uzatılabilmektedir. LAB'leri organik asitler (laktik, asetik veya propiyonik asit gibi), alkoller, karbondioksit, diasetil, hidrojen peroksit, reuterin ve reutersiklin gibi bakteriyosinler üreterek patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemektedirler (Kesenkaş ve ark., 2006). LAB'lerinin oluşturdukları organik asitler; sitoplazma zarının geçirgenliğini değiştirerek, karbondioksit; anaerobik ortam oluşturarak hücre içi ve dışı pH değerini düşürerek antimikrobiyal etki sağlamaktadır (Özcan ve Aran, 2003).

Ayrıca LAB'leri arasında sütte bulunan *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakteriler probiyotik mikroorganizmalardır (Gürel ve ark., 2004).

Pek çok peynir çeşidinde; *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* ve *E. coli* patojen bakterilerinin, önemli sorunlara neden olduğu belirlenmiştir. LAB'leri istenmeyen bu mikroorganizmaları inhibe edebilmektedir (Rodriguez ve ark., 2005). Taleggio, Mozerella ve Gorgonzola peynirlerinde *E. faecium*, Mozeralla peynirinde ise, *Lc. lactis* biyokoruyucu kültür olarak, *L. monocytogenes*'e karşı kullanılan laktik asit bakterileridir (Özcan ve Aran, 2003). LAB; *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Staph. aureus* ve *Salmonella* spp gibi patojen bakterileri inhibe edebilmektedir (Ananou ve ark., 2007).

Süt ürünlerinde küf ve mayalar birçok bozulmaya neden olmaktadır. LAB'leri kaproik asit, 3- hidroksi yağ asitleri, fungusitler, halkalı dipeptitler, fenillaktik asit, reuterin, hidrojen peroksit, diasetil, laktik ve asetik asit, karbondioksit ve kaproik asit gibi antifungal bileşenler üreterek küf ve mayaya karşı da koruma sağlamaktadır (Schnürer ve Magnusson, 2005).

2.3.1. Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler

Bakteriyosinler, bakterilerin ribozomol yolla ürettikleri peptidlerdir (Cotter ve ark., 2005). LAB'leri tarafından birçok bakteriyosin üretilmektedir. Bakteriyosinler, antibakteriyel proteinlerdir ve ısıya karşı dayanıklı olmaları, organoleptik ve besinsel olarak zengin olmaları gıda korumasında potansiyel koruma sağlamaktadır. Ayrıca kimyasal katkı maddelerinin kullanımını düşürmektedir. Bunlar arasında en çok kullanılan nisindir (Cleveland 2001; Gálvez ve ark., 2007). LAB tarafından üretilen bakteriosinler ve üretilen diğer metabolitler genellikle güvenli bileşikler olarak kabul edilir. Ayrıca diğer avantajları da stabildirler, antimikrobiyal etkiye sahiptirler, toksik etkileri yoktur ve tadı değiştirmezler (Carr ve ark., 2002; Cotter ve ark., 2005). Şimdiye kadar sadece nisin ve pediocin PA-1, gıda katkı maddeleri olarak ticarileştirilmiştir. Ancak diğer LAB bakteriosinleri de umut vaat etmektedir. Bunlara örnek olarak örneğin Enterosin AS-48 (Sánchez-Hidalgo ve ark., 2011) veya laktisin 3147 (Suda ve ark.,2012) verilebilir.

Nisin, Ricotta peynirinde *L. monocytogenes* patojenine karşı kullanılmaktadır. Pediyosin AcH, Cheddar ve Munster peynirlerinde *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* ve *E. coli*' ye karşı, laktisin 3147 Cheddar, Cottage peynirlerinde *L. monocytogenes* ve *B. cereus*' a karşı ve enterosin AS-48 Manchego peynirinde *L. monocytogenes* patojenlerine karşı kullanılabileceği belirtilmiştir (Cleveland ve ark., 2001; Ananou ve ark., 2007). Enterosin AS-48, *Staph. aureus* gelişimini taze peynirde yüksek oranda azaltmıştır (Munoz, 2007).

Enterokokların ürettiği bakteriyosinlere enterosin denilmektedir. *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının ürettikleri enterosinlerin fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri diğer bakteriyosinlerden daha iyidir (Park ve ark, 2003; Moreno ve ark, 2003).

Jabbari ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada *Lb. plantarum* izolatlarını geleneksel peynir Kouzeh'den tanımlayarak gıda patojenleri üzerine antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmiştir. Toplam 56 laktik asit bakterisi izole edilerek bunlardan

12 tanesi biyokimyasal yöntemler ile 11 tanesi de moleküler yöntemle tespit edilmiştir. Difüzyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal etkinlik testlerinde *Staph. aureus* ve *Staph. epidermidis* (sırasıyla 15 ± 0.3 ve 14.8 ± 0.7 mm) üzerinde etkinlik göstermiştir. *Escherichia coli* üzerine ise daha etki ettiği görülmüştür.

Tuzla'daki evlerde herhangi bir başlangıç kültürü eklenmeksizin geleneksel yöntemlerle üretilen peynirlerden LAB'nin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatların *Lactobacillus* ve *Lactococcus* türlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen izolatların patojen bakterilerden; *Escherichia coli*, *Staph. aureus*, *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis* üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Patojenik bakterilerin gelişimi üzerindeki en yüksek inhibisyon aktivitesini, *Lb. plantarum* 1 ve *Lb. brevis* 1'den izole edilen hücresiz süpernatant (kültür üst sıvısı) göstermiştir. Süpernatantın proteolitik enzime duyarlılığı proteinaz K kullanılarak test edilmiştir (Husejnagić ve ark., 2016).

Geleneksel Sicilya peynirlerinden ve çiğ süttten izole edilen 699 LAB elde edilmiştir. *L. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *Escherichia coli*, *S. enteritidis* bakterileri antimikrobiyal test için indikatör olarak kullanılmıştır. Toplam 223 suşun *L. monocytogenes*'in büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Süt ürünlerinde bakteriyosin üreten kültürlerin eklenmesinin ürünün kalitesini ve emniyetini artıracığı ve daha pratik ve ekonomik bir yöntem olacağı bildirilmiştir (Macaluso ve ark., 2016).

Mısır'da geleneksel süt ürünlerinden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin bazı patojenler üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda; *Lc. lactis subsp. Lactis* A15 ve *E. faecium* A15, *L. monocytogenes* EGDEe 107776'ya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen suşlardan üretilen bakteriyosinlerin pH 5 ile 8 arasında kararlı ve 100°C'ye kadar stabil olduğu belirlenmiştir. Günümüzde, gıda ürünlerine (yani, peynir ve yoğurt) doğal gıda koruyucuları olarak bakteriyosinler ve/veya bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin eklenmesi, bu ürünlerin gıda güvenliğini arttırmak amacıyla kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bakteriyosinler *L. monocytogenes*'i kontrol etmek için başarıyla kullanılmıştır. *Lc. lactis subsp. Lactis* A15, *L.*

monocytogenes'in büyümesini önlemek ve süt ürünlerinin emniyetini ve raf ömrünü uzatmak için besin sistemi içerisinde başlangıç kültürü veya birlikte kültür olarak kullanılabilmesi ifade edilmiştir. Öte yandan, *E. faecium* A15'den üretilen bakteriyosinin, süt ürünlerinde raf ömrünü uzatmak için biyolojik koruyucu maddeler olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (El-Ghaish ve ark., 2017).

Pastörize edilmemiş süttten yapılan Camembert peynirinden izole edilen bir tür olan *Carnobacterium maltaromaticum* CPN tarafından üretilen bir bakteriyosinin yapısı ve antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Maltarisin CPN olarak adlandırılan bu bakteriyosinin; özellikle gıda kaynaklı patojen *L. monocytogenes*'in pek çok türüne karşı güçlü aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Hammi ve ark., 2016).

Zorunlu bir heterofermentatif LAB olan *Lb. helveticus*, Genel Olarak Güvenilir (GRAS) olarak tanınır. LAB, gıda ürünlerinin duyu özelliklerini bozmadan patojen bakterilerin büyümesini inhibe etmede dikkate değer bir rol oynamaktadır. Çin'de geleneksel yöntemle üretilen peynirlerden izole edilen *Lb. helveticus* KLDS 1.8701'in *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *Staph. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 dahil olmak üzere dört gıda kaynaklı patojene karşı antimikrobiyal potansiyelinin in vitro olarak taranması, Oxford fincan yöntemi ve karışık kültür engelleme deneyleri ile yapılmıştır. Hücresiz süpernatantların organik asit üretimi ve antimikrobiyal potansiyeli, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak farklı muamele ve analizler yoluyla değerlendirilmiştir (Bian ve ark., 2016).

Geleneksel olarak fermente edilmiş Xinjiang peynirinden altı LAB suşu izole edilmiş ve fonksiyonel, probiyotik özellikleri açısından başlangıç kültürleri olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen altı LAB türü, *Lb. rhamnosus* (bir suş), *Lb. helveticus* (bir suş) ve *E. hirae*'yi (dört suş) kapsamaktadır. Xinjiang fermente süt ürünlerinden izole edilen suşların peynir endüstrisinde başlangıç kültürleri olarak yüksek potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Azat ve ark., 2016).

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

2.4.1. Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması

Biyokimyasal tanımlama, izolatların sayısının azaltılmasını sağlayarak moleküler tanımlamaya ön hazırlık açısından önemlidir (Huys ve ark., 2003). Biyokimyasal tanımlama yapılmadan, çok sayıda koloni ile yapılan moleküler tanımlamalar yanlış tanımlamalara neden olabilmektedir. Bu nedenle moleküler tanımlama ile biyokimyasal tanımlamanın beraber yapılması daha doğru bir tanımlama yapmaya olanak sağlar. Sonuç olarak biyokimyasal olarak belirlenen bir türün moleküler tanımlama ile net bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir (Tabasco ve ark., 2007). Biyokimyasal tanımlamalar her ne kadar yararlı olsa da benzer özelliklere sahip suşların ayırımında yeterli olmamaktadır. Bunun yanında metotların ayırt ediciliği ve tekrarlanabilirliği azdır (Miller ve ark., 1996).

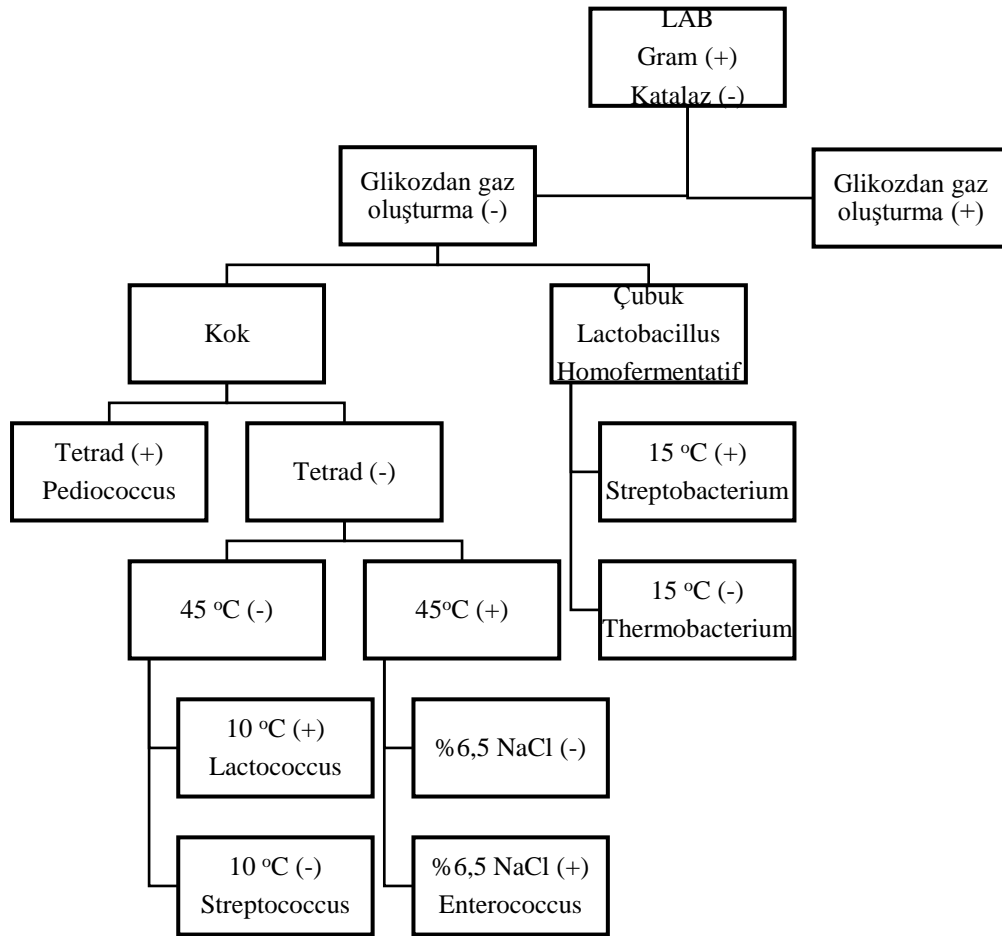
Deve sütünden izole edilen LAB tanımlanması için biyokimyasal ve moleküler yöntemleri karşılaştırmayı amaçlamıştır. Buna göre 62 LAB izolatı arasından 10 suş, API50CHL ve 16S rDNA dizilimi kullanılarak tanımlama için seçilmiştir. Sadece Gram pozitif ve Katalaz negatif izolatlar düşürülmüştür. Sitrat kullanımı, karbonhidratların varlığında incelenmiştir. (%4, %6,5), farklı sıcaklıktaki (10°C-45°C) büyüme ve farklı pH değerlerinde büyüme (9.2, 9.6)'leri test edilmiştir. 10 suş biyokimyasal yöntemlerle; *Lc. lactis*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* ve *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanırken; moleküler yöntemlerle tüm suşlar *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, her tekniğin sınırlamaları olduğu ancak moleküler analizin en güvenilir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (Fguiri ve ark., 2015).

Yapılan başka bir çalışmada çiğ süttten üretilmiş 7 adet beyaz peynir örneğinden toplam 145 koloni izole edilmiş bunlardan 77 adedi biyokimyasal identifikasyon yöntemleri ve Gram-pozitif ID test kiti ile belirlenmiştir. Bu izolatlardan 25'i *Lactococcus* spp., 22'si *Enterococcus* spp. ve 30 tanesi *Lb.* spp. olarak tespit edilmiştir.

Lactococcus spp. olarak tanımlanmış izolatların, 19'su *Lc. lactis* spp. *lactis*, 4'ü ise *Lc. lactis* spp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. *Enterococcus* spp. izolatından 5 tanesi *E. faecalis*, 2'si *E. durans*, 2'si *E. avium*, 4'ü *Pediococcus pentosaceus*, 2'si *E. faecium* ve 1'i *E. solitarius* olarak tespit edilmiştir. *Lb.* spp. izolatlarına uygulanan şeker testleri sonucunda izolatların ise 7'si *Lb. plantarum* olarak, 7'si *Lb. curvatus*, 10'u da *Lb. jensenii* olarak tanımlanmıştır. Böylece beyaz peynirde baskın olan bakterilerin *Lb.* spp. ve *Lactococcus* spp. grubu laktik asit bakterilerinin olduğu belirlenmiştir (Ertürkmen ve ark., 2015).

Bir başka çalışmada koyun sütünden yapılan geleneksel Urfa peynirinde baskın LAB suşlarının biyokimyasal, fenotipik ve genotipik metotlar kullanılarak karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çalışmanın asıl amacı yeni starter kültür olabilecek umut verici türlerin belirlenebilmesidir. Elde edilen sonuçlara göre % 48.95 *Enterococcus* spp., % 40.55 *Lactococcus* spp., % 9.10 *Lb.* spp., % 0.69 *Streptococcus* spp. ve % 0.69'lük *Leuconostoc* spp. laktik asit bakterilerinin dağılım yüzdeleri verilmiştir. Dört suş da bakteriyosin aktivitesi göstermiştir. Urfa peynirinde tuz oranının fazla olması, tuza dirençli bakterilerin baskın tür olarak bulunmasına yorumlanmıştır. Tuza dirençli suşların endüstriyel üretimde kullanımının önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Kırmacı ve ark., 2015).

LAB'lerinin tanımlanmalarında klasik identifikasyon testlerinin çok fazla olması ve standart bir ayırım yapan şemanın olmamasından dolayı zorluklar yaşanmaktadır. Ayrıca şemalarda yeni türlerin olmaması da sıkıntılara neden olmaktadır. Klasik tanımlamada öncelikle Gram pozitif, katalaz negatif olan izolatlar değerlendirmeye alınmaktadır. Bu izolatlar morfolojilerine, glikozdan gaz oluşturma özelliklerine göre ve farklı sıcaklıklarda gelişebilmelerine göre sınıflandırılabilirlerdir



Şekil 2.1. Laktik asit bakterileri identifikasyon şeması (Schillinger ve ark., 1987).

2.4.2. Laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması

Fenolik testler LAB tanımlanmasında uzun zamandır kullanılmaktadır. Fakat bu tanımlama yöntemleri alt tür ve suşların net bir şekilde ayrımını tam olarak sağlayamamaktadır. Bu nedenle LAB'nin kesin tanımlanmasında moleküler tanımlama yöntemleri önerilmektedir (Osmanağaoğlu 2011). Bu yöntemlerden bazıları, plazmit profili analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, Restriction Fragment Length Polymorphism PCR (RFLP-PCR), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleridir. Her bir moleküler yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır (Aslantaş, 2006; Sancak, 2001). LAB'lerinin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasında, PCR'a dayalı yöntemler 16S rRNA'yı kodlayan sekansların

karşılaştırılması yöntemi ile önemli bir yere sahip olmuştur (Stiles ve Holzaphel, 1997).

LAB grubu, geleneksel süt kaynaklarından izole edilebilir ve karakterize edilebilir. Yapılan bir çalışmada, İran geleneksel süt ürünlerinden faydalı sağlık etkileri gösteren probiyotik LAB suşlarının izole edilmesi, tanımlanması ve biyolojik olarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Toplam 19 LAB türü, 16S rRNA genlerinin dizilimi ile tanımlanmıştır (Haghshenas ve ark., 2016).

2.4.3. Laktik asit bakterilerinde proteomik çalışmalar

Belli bir organizmada bulunan proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerin tümüne proteomik çalışmalar denilmektedir. Proteomik çalışmaların iki temel amacı vardır. Bunlardan birincisi hücrelerden izole edilen proteinlerin tanımlanması ikincisi ise tanımlanmış bu proteinlerin ifade edilmesidir (Bantscheff ve ark., 2007). Proteomik çalışmalarda kullanılan yöntemler ELISA, 2D PAGE (İki Yönlü Jel Elektrofrezisi), Mikroarray (Doku ve Protein Çiğ Teknolojisi) ve Kütle Spektrometresi olarak ayrılmaktadır. Kütle spektrometresi de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) ve SELDI-TOF (Surface Enhanced Selective Capture With-Time of Flight) olarak ayrılmaktadır. Bu tip çalışmalarda ilk olarak toplam protein izole edilmekte ve toplam protein miktarı belirlendikten sonra proteinler izoelektrik noktalarına ve molekül ağırlıklarına göre kütle spektro ayrılmaktadır (Hillenkamp ve ark., 2007).

Proteomik çalışmalarda hedeflere ulaşmada kütle spektrometresi (Mass Spectrometry, MS) oldukça önemli bir araçtır. Mikrobiyoloji alanında kütle spektrometresinin kullanımı 1970'lere dayanmaktadır. Bakterilerin tür ve cins bazında kendilerine has bir kütle spektralarının olduğu 1975'lerde tespit edilmiştir. Dezopsiyon ve iyonizasyon teknolojisinin gelişmesiyle beraber 1980'lerde mikroorganizmaların biyolojik izlerinin tanımı oluşturulabilmiştir. Daha sonra, 1990'lı yıllara gelindiğinde ise soft iyonizasyon teknolojilerinin de sistem ile birleştirilmesi ile protein gibi büyük moleküller incelenebilmiştir. Bu sayede her mikroorganizma için spesifik olan bir çeşit

parmak izi oluşturulmakta ve mikroorganizmaların tanımlanması yapılabilmektedir (Anhalt ve ark., 1975; Heller ve ark., 1987; Claydon ve ark., 1996; Holland ve ark., 1996).

MALDI-TOF yönteminin birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi hızlı bir yöntem olmasıdır. Geleneksel yöntemlerde bir mikroorganizmanın tanımlanması 1-2 gün sürerken MALDI-TOF MS yönteminde tanımlama işlemi katı besiyerinde gelişen saf kültürlerde çok kısa sürelerle inebilmektedir. Ayrıca bu yöntem yeni bir yöntem olmasından dolayı daha önceden 16S rRNA gen sekansı ile ayrılan yakın türlerin bile ayrımını yapabilmektedir (Wieser ve ark., 2012). Geleneksel yöntemlerle ayrılması zor olan anaerob ve bazı non-fermentatif bakterilerin, Gram pozitif basillerin tanımlanmasında da başarılı olabilmektedir (Barbuddhe ve ark., 2008; Mellmann ve ark., 2008). Bu sistem güç üreyen bakterilerde de hızlı ve güvenilir bir isimlendirme yapabilmektedir. Diğer bir avantajı ise maliyet açısından çok uygun olmasıdır. Cihazın ilk alımının dışında örnek başına maliyet diğer yöntemlere göre oldukça uygundur. Biyokimyasal testler ile kıyaslandığında MALDI-TOF MS analizinin dört kat daha ucuz olduğu belirlenmiştir (Seng ve ark., 2009). Avantajlarının yanında bu yöntemin bazı olumsuz özellikleri de bulunmaktadır. Bu yöntemde *S. pneumoniae*, *S. mitis* gibi benzer türler tam olarak tanımlanamamaktadır (Prod'hom ve ark., 2010; Stevenson ve ark., 2010). Bu durum veri tabanında bu iki türe ait yeterli bilgi olmaması ve bu iki bakterinin ribozomal protein sekanslarında yeterli fark olmamasından kaynaklanmaktadır. Tanımlamayı etkileyen başka bir neden de bakterilerin hücre duvarlarında bulunan kapsüldür (Prod'hom ve ark., 2010). MALDI-TOF tür saptamasında gayet başarıyla alttürlerin saptanmasında şimdilik çok güvenilir bulunmaktadır. Anaerob bakterilerde de yeterli veri olmadığı için tanımlama başarısı %50'nin altına düşmektedir (Cherkaoui ve ark., 2010).

MALDI-TOF yönteminde mikroorganizmaların protein, peptit ve şeker gibi biyomolekülleri ve polimer, dendrimer ve makromolekül gibi büyük organik molekülleri lazer atışları ile elektromanyetik uçuş tüpünden geçirilmektedir. Lazer atışları yardımıyla matris ışığı emer ve örnekteki moleküller iyonize hale gelerek cihazın içinde molekül ağırlığına göre uçmaya başlar. Kütleleri ile orantılı hız kazanan

iyonlar dedektöre farklı zamanda çarparak farklı sinyaller elde edilir. Böylece elde edilen sinyaller proteinlerin kütle spektrumlarını oluşturmaktadır. Oluşan bu spektrumlar sistemin veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak mikroorganizmalar hem cins hem de tür bazında tanımlanmaları sağlanmaktadır (Anhalt ve ark., 1975). Tanımlama için temel alınan mikroorganizma proteinleri ise hücre içinde bol miktarda bulunan ve orta hidrofobik özellikteki ribozomal proteinlerdir. Genellikle 4-15 kDa aralığında bulunan ribozomal proteinler çevresel koşullardan ve mikrobiyolojik gelişme koşullarından çok az etkilenirler. Matriks solüsyonu seçilirken de özellikle bu proteinleri iyonize edecek olan solüsyonların tercih edilmesi gerekmektedir (Sulh ve ark., 2004). Matriks solüsyonu da mikroorganizmaların kristalize hale gelmesini sağlamaktadır. Analiz için 10^4 - 10^6 kob/mL düzeyinde az miktarlardaki mikroorganizma sayısı bile yeterli olmaktadır. Dikkat edilmesi gereken nokta ise kolonilerin 48 saatten daha yaşlı olmamasıdır. Çünkü yaşlanan kültürlerde ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu azalmaktadır. Bu durum ribozomal proteinlerin parçalanmasından kaynaklanmaktadır (Wieser, 2012).

Yapılan bir çalışmada MALDI-TOF MS kullanılarak çiğ veya pastörize süttten üretilmiş Fransız peyniri Maroilles'ten izole edilen LAB'leri tanımlanmıştır. LAB MRS Agarda 30°C'de geliştirilmiş, Gram pozitif ve katalaz negatif olarak belirlenen 192 adet suş MALDI-TOF MS yöntemine tabi tutulmuştur. Bu suşlardan 105 adet suş çiğ süttten üretilen, 92 adet suş ise pastörize süttten üretilen Maroilles peynirinden izole edilmiştir. Bu yöntem ile LAB'ne ait olan *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* üç cins olarak tanımlanabilmiştir. Buna göre *Lactobacillus* cinsi her iki sütte de en fazla türü bulunan cins olarak belirlenmiş ve *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fructivorans*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. brevis* olarak yedi farklı tür tespit edilmiştir. Seçilen suşlar üzerinde 16S rRNA'ya dayalı tanımlamada gerçekleştirilmiştir ve MALDI-TOF MS yöntemi ile arasındaki korelasyon ilişkisi incelenmiştir. Hızlı, analiz maliyeti açısından ekonomik açıdan uygun, sağlam ve güvenilir olan bu yöntemin yaygın olarak kullanılan 16S rRNA yöntemine göre cazip bir alternatif olduğu ve gıda endüstrisinde uygulanabilir olduğu rapor edilmiştir (Nacef ve ark., 2017).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada Tablo 3.1.'de görüldüğü üzere toplam 21 adet geleneksel yöntemlerle üretilen köy peynirleri izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Örnekler laboratuvara getirilinceye kadar steril örnek kaplarında 4°C'de saklanmış ve soğuk zincirle Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan peynirler ve kodları

| Üretildiği İl | Peynir adı | Kodu | Üretildiği İl | Peynir adı | Kodu |
|---------------|----------------|------|---------------|--|------|
| Sakarya | Çerkez peyniri | A | Giresun | Yaylada üretilmiş yağlı Tulum peyniri | B |
| | Urfa peyniri | E | | Yaylada üretilmiş yağsız Tulum peyniri | C |
| | Otlu peyniri | F | | Tecen peyniri | G |
| | Tulum peyniri | P | | Deride ambalajlanmış Tulum peyniri | H |
| | Lavaş peyniri | R | | Bezde ambalajlanmış Tulum peyniri | I |
| | Köy peyniri | M | | | |
| Artivin | Çeçil peyniri | N | | Çökelek peyniri | D |
| Bolu | Gerede peyniri | J | Karaman | Obruk peyniri | S |
| Erzurum | Civil peyniri | K | Tekirdağ | Yumuşak inek peyniri | T |
| | Köy peyniri | L | | Sert inek peyniri | U |
| Trabzon | Köy peyniri | O | | Dokuz höyük peyniri | Y |

Denemelerde 24 saat süreyle MRS Broth (de Man Rogosa Sharpe Medium, Merck, Almanya) besiyerinde ve M17 Broth (Merck, Almanya) besiyerinde aktifleştirilmiş izolatlar ile çalışılmıştır. İzolatların biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması

yapıldıktan sonra saf kültürler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünde MALDI-TOF MS (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi, Bruker, Almanya) yöntemi ile de moleküler tanımlama yapılmıştır. Daha sonra izole edilen ve tanımlanan LAB'nin antimikrobiyel aktivite testleri için; *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii* ATCC 29544, *B. cereus*, *S. Typhimurium* ATCC 140828 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan saf bakteri izolatları %20 gliserol içeren ilgili besiyerlerinde -80°C'de saklanmış ve her analiz öncesinde izolatlar aktiveleştirildikten sonra kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Peynir örneklerinden laktik asit bakterisi izolasyonu

Steril örnek kaplarında 4°C'de Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilen farklı kaynaklardan alınan 21 adet peynir örneği analizleri tamamlanıncaya kadar soğuk depoda +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Katı besiyerinden izolat seçiminde kolonilerin farklı morfolojik özelliklere sahip olmasına dikkat edilmiştir. İzolatların seçiminde morfolojik olarak enterokoklar için küçük, beyaz ya da soluk rekli ve düzgün kenarlı koloniler, laktobasiller için krem renkli, mat düzgün kenarlı koloniler ve laktokoklar için beyaz, düzgün kenarlı ve parlak kolonilerin alınmasına dikkat edilmiştir (Turhan, 2012).

Bakteri izolasyonu için peynirlerden aseptik koşullar altında 10'ar gram tartılarak 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) çözeltisi ilave edilerek steril stomacher poşetlerinde homojenizatör (Wiggen-Hauser) ile 2 dakika homojenize edilmiştir. Fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanılarak 10^{-6} 'ya kadar bir seri seyrelti hazırlanmıştır (Halkman, 1990).

Hazırlanan bu 10^{-4} ve 10^{-6} 'lık seyreltilerden laktokoklar için yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Buna göre 0.1' er mL alınarak M17 Agar besiyerine aktarılmıştır (Harrigan ve Mc Cance, 1966). Aseptik koşullar altında drigalski spatülü ile örnekler homojen bir şekilde yüzeye yayılmış, 30°C 'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda beyaz, düzgün kenarlı ve parlak özelliğindeki koloniler muhtemel laktokok kolonileri olarak izole edilerek saflaştırılmıştır.

Hazırlanan bu 10^{-4} ve 10^{-6} 'lık dilüsyonlardan, laktobasiller için yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. Buna göre 0.1'er mL seyrelti alınarak MRS Agar besiyerine aktarılmıştır (Harrigan ve Mc Cance, 1966). Aseptik koşullar altında drigalski spatülü ile örnekler homojen bir şekilde yayılmış, 30°C 'de 24-48 saat süreyle anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda krem renkli, mat düzgün kenarlı koloniler özelliğindeki koloniler muhtemel laktobasiller kolonileri olarak izole edilerek saflaştırılmıştır.

Lb. acidophilus ve *Lb. casei* izolasyonu için MRS-D-Sorbitol agar kullanılmıştır ve 30°C ' de 24-48 saat süreyle anaerobik inkübasyona bırakılmıştır (Zamfir, 2005; Rosaria, 2006; Klein, 2003). MRS-D-Sorbitol agar hazırlanırken %10'luk (w/v) D-sorbitol çözeltilisinden 10 mL steril filtreden geçirilerek 90 mL MRS Agara eklenerek karıştırılmıştır (Yılmaztekin, 2001).

Hazırlanan 10^{-4} ve 10^{-6} 'lık dilüsyonlardan enterokoklar için 0.1'er mL alınarak Kanamycin Aesculin Azide (KAA; Merck) Agar besiyerine aktarılmıştır. Aseptik koşullar altında drigalski spatülü ile örnekler homojen bir şekilde yayılmış, 37°C ' de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Zamfir, 2005; Rosaria, 2006; Klein, 2003). İnkübasyon sonunda koloniler muhtemel *Lb. acidophilus* ve *Lb. casei* kolonileri olarak izole edilip, saflaştırılmıştır.

Anaerob ortamlar için Anaerocult A (Merck) kullanılmıştır. Anaerocult A poşeti, olabildiğince yatay tutulurken 15-20 saniye süre içinde poşetin her yanını ıslatacak şekilde 35 mL su ilave edilip, süzülmeden kavanoza yerleştirilmiştir. Poşetin yazılı

kısmı Petri kutularına doğru olarak yerleştirildikten sonra kavanoz, hızla ve tam olarak kapatılıp istenilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Petri kutularında gelişen mikroorganizmalardan tek koloniler alınmış öze yardımıyla uygun besiyerlerine çizilmiş ve uygun gelişme sıcaklıklarında 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatlar tanımlama testleri yapılması için saklanmak amacıyla %20'lik steril gliserol içeren ependorf tüplerine (800 µL aktif izolat + 200 µL gliserol) aktarılmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir (Harrigan ve McCance 1990). Toplam 142 adet izolata biyokimyasal testler uygulanmış, bu izolatlardan 71 adedi MALDI-TOF MS yöntemi ile de suş düzeyinde tanımlanmıştır.

3.2.2. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması

İzolatların tanımlanması için öncelikle katalaz testi ve Gram boyama yapılmıştır. Katalaz (-) olan suşlar belirlendikten sonra gram boyama yapılmıştır ve Gram (+) izolatlar seçilmiştir.

3.2.2.1. Gram boyama

Gram boyama testi; 18-24 saatlik bakteriler kullanılarak, Temiz (2000)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemle boyama yapıldıktan sonra mikroskop altında mor renkli görülen mikroorganizmalar Gram (+) ve pembe görülenler de Gram (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.2. Katalaz testi

Uygun besiyerlerinde gelişen Petri kutusundaki kolonilerin üzerine Pastör pipeti ile %3'lük H₂O₂ damlatılarak hava kabarcığı oluşumuna bakılmıştır. Hava kabarcığı görülmesi katalaz (+), görülmemesi ise katalaz (-) olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000, Kim ve ark., 2001, Carr ve ark., 2002).

Gram (+) ve katalaz (-) suşlar belirlendikten sonra diğer tanımlama işlemleri bu suşlar üzerinden devam edilmiştir.

3.2.2.3. Farklı sıcaklıklarda gelişme testleri

İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme testleri için; steril 5 mL M17 ve MRS Broth besiyerlerine %1 oranında inokülasyon yapılarak, 10°C’de ve 45°C’de 48 saat inkübasyona bırakılıp, bu sürenin sonunda oluşan bulanıklık dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır (Sandine ve ark., 1962; Harrigan ve Mc Cance, 1966; Tunail, 1978; Sürmeli, 1979; Salminen ve Wright, 1993; Holt ve ark., 1994; Tunail ve ark., 2001).

3.2.2.4. Farklı pH’larda gelişme testleri

İzolatlar için 9.2 ve 9.6 pH’ya sahip 3.0 mL M17 ve MRS Broth besiyerine 18 saatlik izolatlardan öze ile aşılama yapılmış ve 30°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bulanıklık oluşan tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Papamanoli ve ark., 2003; G-allegria ve ark., 2004; Sandine ve ark., 1962; Harrigan ve Mc Cance, 1966; Tunail, 1978; Sürmeli, 1979; Salminen ve Wright, 1993; Holt ve ark., 1994; Tunail ve ark., 2001).

3.2.2.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testleri

Bakteri izolatlarının tuz toleranslarını belirlemek amacıyla %4 ve %6,5 NaCl içeren M17, MRS ve KAA besiyerleri kullanılmıştır. Saflaştırılarak stoğa alınan izolatlar, uygun agar besiyerine ekilmiş ve 37 °C’de 48 saat inkübasyondan sonra gelişimleri incelenmiştir (Facklam ve ark., 2002; Sandine ve ark., 1962; Harrigan ve Mc Cance, 1966; Tunail, 1978; Sürmeli, 1979; Salminen ve Wright, 1993; Holt ve ark., 1994; Tunail ve ark., 2001).

3.2.2.6. Sitrati kullanma testi

Muayeneleri yapılacak saf bakteri izolatları; steril fizyolojik su ile biraz sulandırıldıktan sonra tüp içinde yatık Simmons Citrate Agar besisi yerine (4-5 mL, pH 6.9 ve yeşil renkte) ekimler yapılmış ve tüpler 2-7 gün 37 °C inkübasyonda bırakılmıştır (Anonim 2017).

3.2.2.7. Metil Red Voges Proskauer testi

MRS Broth besiyerinde geliştirilen aktif izolatlardan 5'er mL steril Metil Red Voges Proskauer (MR-VP Broth- Merck) besiyerine %1 oranında aktarılmış ve tüpler 48 saat süreyle 30°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir tüpten VP testinin yapılması amacı ile ayrı tüplere 1'er mL alınmıştır. Bu tüplerin üzerine önce 0,6 mL α -naftol, sonra da 0,2 mL %40'luk KOH çözeltisi ilave edilmiş ve kiraz kırmızısı renk oluşumu gözlenen tüplerdeki suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

VP testi amacıyla 5mL'lik aktif izolatdan 1'er mL alınmasının ardından, tüpte kalan 4 mL kültüre MR testi için Pastör pipeti ile 4 damla kadar metil kırmızısı indikatörü damlatılmıştır. Sarıdan kırmızıya dönen tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000; Harrigan ve Mc Cance, 1966; Tunail ve ark., 2001).

3.2.1.7. Hareket testi

Denemede kullanılan izolatların hareketlilik özelliklerini saptamak amacıyla laktobasiller için MRS ve M17 Broth besiyerleri kullanılmıştır. %0,3 agar içeren (yumuşak agar) besiyerine MRS ve M17'de geliştirilen suşlar, iğne özeyle batırma şeklinde inoküle edilmiş ve tüpler 30°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde, inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış bulanıklık şeklinde bir üremenin görülmesi bakterinin hareketli, yalnızca inokülasyon hattı boyunca üreme gözlenmesi bakterinin hareketsiz bir bakteri olduğunu göstermiştir (Halkman, 2005).

3.2.2.9. Glikozdan gaz oluşturma testi

MRS ve M17 Broth besiyerleri içeren tüplere ters konumda Durham tüpleri yerleştirilmiş ve 10'ar mL besiyeri aktarılarak otoklavda sterilize edilmiştir. İzolatlardan 0,1 mL örnek alınarak tüplere ekim yapılmış ve rnekler 30°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Durham tüplerinin tabanında gaz oluşumunun varlığı kontrol edilmiştir. Glikozun fermente edilmesiyle ortamda gaz oluşup oluşmadığına bakılmıştır. Gaz oluşumu tespit edilmişse heterofermantatif, gaz oluşumu görülmemişse homofermantatif olarak değerlendirilmiştir (Randazzo ve ark., 2004).

3.2.2.10. % 0.1 metilen mavisi indirgeme testi

Steril 5'er mL % 0.1 metilen mavisi içeren Skim Milk (%10'luk skim milk besiyeri hazırlanarak, 110 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. %3'lik steril metilen mavisi hazırlanarak, sterilize edilmiş ve son konsantrasyon %0.1 olacak şekilde steril skim milk besiyerine ilave edilmiştir) besiyerine aktif kültürden % 1 oranında aşılama yapılarak, 28 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu mavi rengin beyaza dönüşümü ve pıhtı oluşumu esas alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Sandine *et al.*, 1962; Harrigan ve Mc Cance, 1966; Tunail, 1978; Sürmeli, 1979; Salminen ve Wright, 1993; Holt *et al.*, 1994; Tunail *vd.*, 2001).

3.2.3. MALDI-TOF yöntemi ile bakterilerin tanımlanması

Araştırma kapsamında izole edilen 71 bakteri izolatu Trypticase Soy Agar (TSA)'da 24 saat 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu yönteme göre izolatların kullanılmadan önce 24 saatlik genç kültür olması önemlidir. Besiyerinde gelişen her bir suşa ait tek koloniden krdan ucuyla alınan rnekler MALDI-TOF MS cihazının plakasında bulunan ayrı ayrı bölmelere aktarılarak yayılmıştır. zerine %70'lik formik asitten 1'er µL eklenerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra matriks (HCCA: Siyano-4-hidroksisinamik asit) zeltisinden 1'er µL eklenerek tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Plak daha sonra cihaza yerleştirilerek okuma

yapılmıştır. Ölçüm sonuçları 0-3 arasında bir skala ile değerlendirilmekte, üretici firma önerisi ile 2 veya daha yüksek olan skor değerleri cins ve tür düzeyinde doğru tanımlama olarak kabul edilmektedir. İki'den küçük çıkan izolatlar ise tekrar denenerek bakterilerin tanımlanması yapılmıştır (Özcan ve ark., 2016).

3.2.4. Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemi ile laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında izole edilerek stoğa alınmış olan 98 adet LAB'den ayrı ayrı bir öze dolusu alınarak MRS Agara ekim yapılmıştır. Alınan bakterilerin gelişmesi için 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gelişen koloniler, McFarland standardına göre FTS'de 0,5-0,6 McFarland düzeyinde (10^7 kob/ml) hücre konsantrasyonu olacak şekilde McFarland Biosan 1B cihazı ile ayarlanmıştır. FTS içinde bu şekilde konsantrasyonları belirlenen bakteriler, tekrar gelişmeleri için uygun sıcaklıklarda (30 °C) inkübasyona bırakılmışlardır. İstenen konsantrasyonda gelişen izolatların, ikinci kez aktive edildikten sonra son aktivasyonun yapıldığı tüpten MRS broth (20 ml) içeren santrifüj tüplerine %1 (v/v) düzeyinde ekimi yapılmıştır. Daha sonra LAB izolatları aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kültürleri içeren santrifüj tüpleri 4°C'de 10.000 rpm'de 45 dakika Universal 320r santrifüj cihazı ile santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çökme işleminden sonra süpernatant kısmı ayrılmıştır. Elde ettiğimiz süpernatantlar (kültür üst sıvısı) içerisinde çöken bileşiklerin veya ölü canlıların bulunması ihtimaline karşı 0.22 µm gözenek çaplı steril membran filtreler kullanılarak sterilize edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar; laktik asit ve diğer organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler içermektedir (Yamoto ve ark., 2003; Campos ve ark., 2008, Uludağ, 2015).

Aynı şekilde *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii* ATCC 29544, *B. cereus*, *S. Typhimurium* ATCC 140828 suşları stok kültürlerinden bir öze dolusu alınarak TSA'a ekim yapılmıştır, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. FTS'de 0,5-0,6 McFarland düzeyinde (10^7 kob/mL) hücre konsantrasyonu olacak şekilde ayarlanmıştır. FTS içinde bu şekilde konsantrasyonları

belirlenen bakteriler, tekrar gelişmeleri için 37°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Gelişen test mikroorganizmaları, TSA içeren Petrilere, 0,1 mL ilave edilerek, drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Test mikroorganizması ekilmiş besiyeri yüzeyine, steril boş kağıt diskler yerleştirilerek, üzerine elde edilen süpernatant 15 µL ilave edilmiştir. Süpernatantın besiyerine iyice difüze olabilmesi için düz bir şekilde 1 saat bekletildikten sonra Petrilere her bir indikatör patojen için uygun olan sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan zonlar ölçülmüştür (Yamato ve ark., 2003; Campos ve ark., 2008). Deneme üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Zon çapları mm cinsinden ölçülerek ortalamaları alınmıştır (Zengin, 2012).

3.2.5. Bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

LAB izolatlarından elde edilen süpernatantlar santrifüj sonunda çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek, yeni tüplere süpernatant aktarılmıştır ve süpernatantta, organik asitin antimikrobiyal etkisini engellemek için 10 N sodyum hidroksitle (NaOH) süpernatantın pH'sı 7,0'ye ayarlanmıştır. Daha sonra süpernatant içerisine proteinlerin çöktürülmesi amacıyla, son konsantrasyon oranı %40 olacak şekilde, yavaş yavaş amonyum sülfat ilave edilmiş ve eriyinceye kadar vorteks ile karıştırılmıştır. Amonyum sülfat ilave edilen süpernatantlar, santrifüj tüplerine aktararak +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler, 10.000 devirde +4°C'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda, üst faz dökülmüş ve kalan çökelti 4 mL steril 0,05 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde çözüldürülmüştür. Süspanse edilen çökelti karışımı, kısmi bakteriyosin ekstraktı olarak kullanılmıştır (Uludağ, 2015).

Potasyum fosfat tamponu (0,1 M) hazırlamak için 1,22 g KOH tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır, benzer şekilde 27,2 g KH₂PO₄ alınarak yine saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra KOH çözeltisinden 30 mL, KH₂PO₄ çözeltisinden de 50 mL alınarak karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen bu çözelti balon jöje ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 50 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır ve böylece 0,05 M potasyum fosfat tamponu hazırlanmıştır (Öncel ve ark., 2004).

LAB'lerinden elde edilen ve kısmi olarak saflaştırılan süpernatantların; *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii* ATCC 29544, *B. cereus*, *S. Typhimurium* ATCC 140828'a karşı antimikrobiyal etkinlikleri kontrol edilmiştir. Deneme üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Zon çapları mm cinsinden ölçülerek ortalamaları alınmıştır.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakteri İzolasyonu

Çalışmada Sakarya'dan Çerkez peyniri, köy peyniri, Urfa peyniri, Otlu peynir, Tulum peyniri ve Lavaş peyniri, Artvin'den Çeçil peyniri, Giresun'dan yaylada üretilmiş yağlı ve yağsız tulum peyniri ve çökelek, Giresun'dan köyde üretilmiş Tecen peyniri, deride ambalajlanmış Tulum peyniri ve bezde ambalajlanmış Tulum peyniri, Bolu'dan Gere de köy peyniri, Erzurum'dan Civil peyniri ve köy peyniri, Trabzon'dan Köy peyniri, Karaman'dan Obruk peyniri, Tekirdağ'dan yumuşak inek peyniri, sert inek peyniri ve dokuz höyük peyniri olmak üzere gelenkesel yöntemlerle üretilmiş toplam 21 adet peynir ile çalışılmıştır.

Tablo 4.1. Peynirlerden elde edilen izolat sayısı

| Örnek adı | Çerkez peyniri | Köy peyniri | Urfa peyniri | Otlu peynir | Tulum peyniri | Lavaş peyniri | Çeçil peyniri |
|---------------|---------------------|----------------------|-----------------|---------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| İzolat sayısı | 20 | 7 | 15 | 18 | 6 | 8 | 4 |
| Örnek adı | Yağlı Tulum peyniri | Yağsız Tulum peyniri | Çökelek peyniri | Tecen peyniri | Deride Tulum peyniri | Bezde Tulum peyniri | Gere de köy peyniri |
| İzolat sayısı | 22 | 17 | 0 | 18 | 18 | 17 | 4 |
| Örnek adı | Civil peyniri | Köy peyniri | Köy peyniri | Obruk peyniri | Yumuşak inek peyniri | Sert inek peyniri | Dokuz Höyük peyniri |
| İzolat sayısı | 9 | 6 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 |

Her peynir için farklı beş besiyerinden (MRS, M17, KAA, BSM ve MRS-D-Sorbitol)'den beşer adet izolat olmak üzere toplam 525 izolat elde edilmiş ve katalaz pozitif olanlar elendikten sonra Gram negatif olanlar da çıkarılarak 203 izolat elde edilmiştir. Böylece yaklaşık %61 oranında izolatın gram negatif veya katalaz pozitif olduğu sonucuna varılmıştır. Her peynir çeşidinden ayrı ayrı 25'şer izolat elde edilerek; Gram negatif ve Katalaz pozitif olanlar çıkarıldıktan sonra Tablo 4.1.'deki izolatlar elde edilmiştir.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlama Sonuçları

İzolatların tanımlanmaları, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri yardımıyla yapılmıştır. Gram (-) ve katalaz (+) suşlar elendikten sonra farklı sıcaklıklarda (10 °C, 15 °C ve 45 °C), farklı pH'larda (9,2 ve 9,6), farklı tuz konsantrasyonlarında (%4 ve %6,5) gelişme, glikozdan CO₂ gazı üretimi, %0,1 metilen mavisinde üreme testi, sitrat testi, hareket testi, Metil Red ve Voges Proskauer gibi fenotip özellikleri belirlendikten sonra tanımlamalar yapılmıştır (Harrigan ve McCance 1990, Temiz 2000, Carr ve ark., 2002, Halkman 2005). Çalışmada izolatların tanımlanması amacıyla yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları Tablo 4.2., 4.3. ve 4.4.'te verilmiştir. Tabloda görülen bütün izolatlar Gram (+) ve katalaz (-)'dir. Tez çalışmasında izole edilen muhtemel laktik asit bakterilerinin cinsleri 1984 yılında yayınlanan *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'ye göre adlandırılmıştır. Bu testler daha güvenilir ve doğru sonuçların olabilmesi için tanımlamalarda destekleyici olarak kullanılmaktadır (Nigatu ve ark., 2000, Kılıç 2008, Tangüler 2010).

Bakteri izolatlarını belirlemede, klasik yöntemler kullanışlı olmasına rağmen tam olarak bakterilerin özelliklerini tespit edememektedir. Hassasiyetlerinin düşük olması, fazla zaman alması gibi zorlukları vardır. Bu olumsuzlukları nedeniyle suşları cins düzeyinde tanımlamada kullanılmalarının daha uygun olacağı düşünülmektedir (Dimitonova ve ark., 2008, Freitas ve ark., 2008). Klasik testlerdeki tekrar edilebilirlik açısından da zorluk düşünülerek moleküler düzeyde tanımlama yapılarak sonuçların desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada Gram (+) ve katalaz (-) oldukları belirlenen izolatlardan 142 tanesine biyokimyasal tanımlama testleri uygulanmıştır. İzolatların büyük çoğunluğunda glikozdan gaz oluşumu gözlenmemiştir ve bundan dolayı izolatların daha çok homofermentatiftir özellikle olduğu sadece 10 tanesinin heterofermentatif olduğu tespit edilmiştir. Biyokimyasal tanımlaması gerçekleştirilen 142 izolatın hepsinin hareketsiz olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal sonuçlara göre 10 adet *Leuconostoc*, 47 adet *Lactobacillus*, 44 adet *Enterococcus*, 1 adet *Streptococcus* olmak üzere toplam 102 adet laktik asit bakteri izolatu cins düzeyinde tespit edilmiştir. 40 adedi ise cins düzeyinde belirlenememiş. Araştırma kapsamında çalışılan izolatlardan 71 adedi MALDI-TOF MS yönteminde tanısı yapılacak izolatlar seçilirken; hem farklı peynirlerden elde edilen izolatlar hemde biyokimyasal olarak farklı cins olarak belirlenmiş izolatlar seçilmeye çalışılmıştır. MALDI-TOF MS yöntemi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

Biyokimyasal testler Sherman sınıflandırmasına göre yapılmıştır. Öncelikli olarak mikroskopik incelemelerde hücre morfolojilerine göre izolatlar kok ve basil olarak ayrılmıştır. Ardından 10°C ve 45°C gelişme, pH 9,6 ve 9,2 ile %4 ve %6,5 NaCl konsantrasyonundaki gelişimlerine bakılarak öncelikli olarak *Lactococcus* cinsi bakterilerin, *Enterococcus* ve diğer *Streptococcus* cinsi bakterilerden ayrıştırılması sağlanmıştır (Carr ve ark., 2002; Schleifer ve Balz, 1984; Kırmacı, 2010). 10°C, 15°C, 45°C'de, %6,5 NaCl'de ve pH 9,6'da gelişebilen suşlar enterokok olarak tanımlanmış ve geri kalan koklar da laktokok olarak tespit edilmiştir (Turhan, 2012). Sınıflandırmada Şekil 2.1'deki akış şemasından yararlanılmıştır. Enterokok cinsi bakteriler %6,5 NaCl ve pH 9,6 ortamlarında gelişme gösterebilmektedir. Streptokok cinsi bakterileri ise gösterememektedir. Böylece bu iki cins ayrılabilir. Laktokok cinsi bakteriler ise %6.5 NaCl, pH 9.6, 45 °C'de gelişmemektedir, fakat 10 °C'de gelişme göstermektedir. *Leuconostoc* ise glikozdan gaz oluşturabilmektedir (Sezer, 2007).

Tablo 4.2. Peynir örneklerinden izole edilen ve M17 Agar'da gelişen izolatların biyokimyasal tanımlama sonuçları

| İzolat No | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| B71 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| B72 | Z | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| B73 | - | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| B74 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| B75 | - | + | + | + | - | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| B76 | Z | Z | + | + | + | + | - | Z | - | - | - | + | * |
| C71 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| C72 | Z | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| C73 | Z | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| C74 | Z | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| C75 | Z | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| C76 | Z | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| E71 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| E72 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| E73 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| E74 | Z | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |

+ : Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.2. (Devamı)

| İzolot No | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| F71 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| F72 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| F73 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| F74 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| G71 | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| G72 | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | * |
| G73 | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| G74 | - | - | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + | <i>Streptococcus</i> |
| H71 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| H72 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| H73 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| H74 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| I71 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| I72 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| I73 | - | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| I74 | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | * |

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.2. (Devamı)

| İzolat No | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| M71 | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | * |
| M72 | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| P71 | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| P72 | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| L71 | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | * |
| L72 | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | * |
| R71 | - | - | - | + | - | - | - | Z | - | - | - | + | * |
| R72 | - | - | - | + | - | - | - | Z | - | - | - | + | * |

+ : Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.3. Peynir örneklerinden izole edilen ve MRS Agar'da gelişen izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

| İzolat No | 15°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|--------------|--|
| AS1 | + | - | - | - | - | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |
| AS2 | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | * |
| AS3 | + | - | - | - | + | - | - | Z | - | - | + | - | <i>Streptobacterium</i> |
| AS4 | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | * |
| BS1 | - | - | - | - | - | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Thermobacterium</i> |
| BS2 | - | - | - | - | + | - | + | Z | - | - | - | - | <i>Leuconostoc</i> |
| BS3 | - | - | - | - | + | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Thermobacterium</i> |
| BS4 | + | - | - | - | - | - | + | Z | - | - | - | - | <i>Leuconostoc</i> |
| BS5 | + | - | - | - | + | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |
| BS6 | + | - | - | - | - | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |
| AD1 | + | - | - | - | + | - | + | Z | - | - | + | - | <i>Leuconostoc</i> |
| AD2 | + | - | + | - | + | - | - | + | - | - | + | - | <i>Streptobacterium</i> |
| AD3 | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | + | - | * |
| AD4 | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| BD1 | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |
| BD2 | - | - | - | - | - | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Thermobacterium</i> |

+ : Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.3. (Devamı)

| İzolot No | 15°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| CD1 | - | - | - | - | - | - | - | Z | - | - | - | - | <i>Thermobacterium</i> |
| ED1 | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | + | <i>Thermobacterium</i> |
| FS1 | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | + | + | <i>Thermobacterium</i> |
| FS2 | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | <i>Leuconostoc</i> |
| FS3 | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | <i>Leuconostoc</i> |
| FS4 | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | <i>Leuconostoc</i> |
| GS1 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | <i>Thermobacterium</i> |
| GS2 | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Thermobacterium</i> |
| GS3 | - | - | - | - | + | + | + | Z | - | - | - | + | <i>Leuconostoc</i> |
| GS4 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| HS1 | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| HS2 | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| HS3 | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| HS4 | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| IS1 | Z | - | - | - | + | + | - | Z | - | - | + | + | * |
| IS2 | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |

+: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.3. (Devamı)

| İzolot No | 15°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| IS3 | - | - | + | - | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| IS4 | - | - | - | - | - | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| JS1 | - | - | - | - | - | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| JS2 | - | Z | - | - | - | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| FD1 | + | - | + | - | + | + | - | Z | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |
| FD2 | + | - | - | - | + | + | - | Z | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |
| GD1 | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| GD2 | - | - | - | - | + | + | + | Z | - | - | - | + | <i>Leuconostoc</i> |
| HD1 | - | - | + | - | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| HD2 | - | - | - | - | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Thermobacterium</i> |
| ID1 | - | - | - | - | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Thermobacterium</i> |
| ID2 | - | - | + | - | + | + | - | Z | - | - | + | - | <i>Thermobacterium</i> |
| KD1 | - | - | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Thermobacterium</i> |
| RS1 | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | <i>Leuconostoc</i> |
| RS2 | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| PS1 | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | <i>Streptobacterium</i> |

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, * : Belirlenemedi

Tablo 4.3. (Devamı)

| İzolat No | 15°C'de üreme | 45°C'de üreme | % 4 tuz oranında üreme | % 6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| PS2 | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Streptobacterium</i> |
| LS1 | + | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| LS2 | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| US1 | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| US2 | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | <i>Leuconostoc</i> |
| YS1 | + | - | + | + | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| YS2 | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| MS1 | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| MS2 | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| MS3 | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| MS4 | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| NS1 | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |
| NS2 | + | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | + | <i>Streptobacterium</i> |

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.4. Peynir örneklerinden izole edilen ve KAA'da gelişen izolatlarının biyokimyasal tanımlama sonuçları

| İzolat No | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges-Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|---------------|---------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|------------------------------|------------------|---------|-----------------|-----------|----------------------------------|
| AA1 | Z | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| AA2 | Z | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| AA3 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| AA4 | Z | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| AA5 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| AA6 | Z | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| BA1 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| BA2 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| BA3 | Z | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| BA4 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| CA1 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | - | <i>Enterococcus</i> |
| CA2 | - | + | + | - | + | + | - | Z | - | - | + | - | * |
| CA3 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| CA4 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| CA5 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | - | <i>Enterococcus</i> |
| CA6 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | - | <i>Enterococcus</i> |

+: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.4. (Devamı)

| İzolot No | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| EA1 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| EA2 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| EA3 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| EA4 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| EA5 | - | + | + | + | - | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| EA6 | - | + | + | + | - | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| FA1 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| FA2 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| FA3 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| FA4 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| GA1 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| GA2 | - | - | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | * |
| GA3 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| GA4 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |
| HA1 | - | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| HA2 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Tablo 4.4. (Devamı)

| İzolat No | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | %4 tuz oranında üreme | %6,5 tuz oranında üreme | pH 9,2'de üreme | pH 9,6'da üreme | Glikozdan gaz oluşumu | %0,1 metilen mavisinde üreme | Sitrat kullanımı | Hareket | Voges- Proskauer | Metil Red | Biyokimyasal tanımlama sonuçları |
|-----------|------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------|--|
| HA3 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| HA4 | - | + | + | + | + | + | - | Z | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| IA1 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| IA2 | - | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| IA3 | - | Z | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| KA1 | - | - | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | * |
| RA1 | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| RA2 | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | <i>Enterococcus</i> |
| MA1 | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | <i>Enterococcus</i> |

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon, Z: Zayıf reaksiyon, *: Belirlenemedi

Yapılan biyokimyasal tanımlamalar sonucunda bazı suşların özellikleri aynı olmasına rağmen moleküler düzeyde yapılan tanımlama ile farklı bakteriler olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle biyokimyasal tanımlamaların kesin olarak ayırım yapmakta yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır ki bu durum literatür çalışmalarında da vurgulanmıştır.

Deve sütünden izole edilen LAB hem moleküler hem de biyokimyasal olarak tanımlanmaya çalışılmış ve sadece Gram pozitif ve katalaz negatif suşlar izole edilmiştir. İzolatların sitrat kullanımı, karbohidratların varlığında incelenmiştir. Ayrıca tuz konsantrasyonu (%4, %6,5), farklı sıcaklık (10-45°C) ve farklı pH değerlerinde (9,2, 9,6) gelişme durumları test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 10 suş biyokimyasal yöntemlerle *Lc. lactis*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* ve *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanırken; moleküler yöntemlerle tüm suşlar *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, her tekniğin sınırlamaları olduğu ancak moleküler analizin en güvenilir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (Fguiri ve ark., 2015). Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar da bu bulgularla paralellik göstermiştir.

Tablo 4.5. MALDI-TOF MS yöntemi ve biyokimyasal yöntemler ile izolatların tanımlama sonuçları

| Peynir Çeşidi | İzolat Kodu | MALDITOF Sonuçları | Biyokimyasal Sonuçları |
|---------------------|-------------|---------------------------|------------------------|
| Çerkez Peyniri | AA1 | <i>E. faecalis</i> | Belirlenemedi |
| | AA2 | <i>E. faecalis</i> | Belirlenemedi |
| | AD1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | <i>Leuconostoc</i> |
| | AM1 | <i>E. faecalis</i> | Belirlenemedi |
| | B71 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| Yağlı Tulum Peyniri | B72 | <i>E. durans</i> | Belirlenemedi |
| | BA1 | <i>E. faecalis</i> | Belirlenemedi |
| | BA2 | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | BM1 | <i>E. faecalis</i> | Belirlenemedi |

Tablo 4.5. (Devamı)

| | | | |
|-------------------------|-----|--------------------|----------------------|
| Yağsız Tulum Peyniri | C71 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | C72 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | CA1 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | CA2 | <i>E. durans</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | CM1 | <i>E. faecalis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | CM2 | <i>E. durans</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| Urfa Peyniri | E71 | <i>E. faecalis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | E72 | <i>E. faecalis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | EA1 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | EA2 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | ED1 | <i>E. faecalis</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| | EM1 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| Otlu Peynir | F71 | <i>E. durans</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | F72 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | FA1 | <i>E. faecalis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | FA2 | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | FD1 | <i>Lc. lactis</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Tecen Peyniri | G71 | <i>E. italicus</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | G72 | <i>E. italicus</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | GA1 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | GA2 | <i>E. durans</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | GD1 | <i>Lc. lactis</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| | GM1 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |

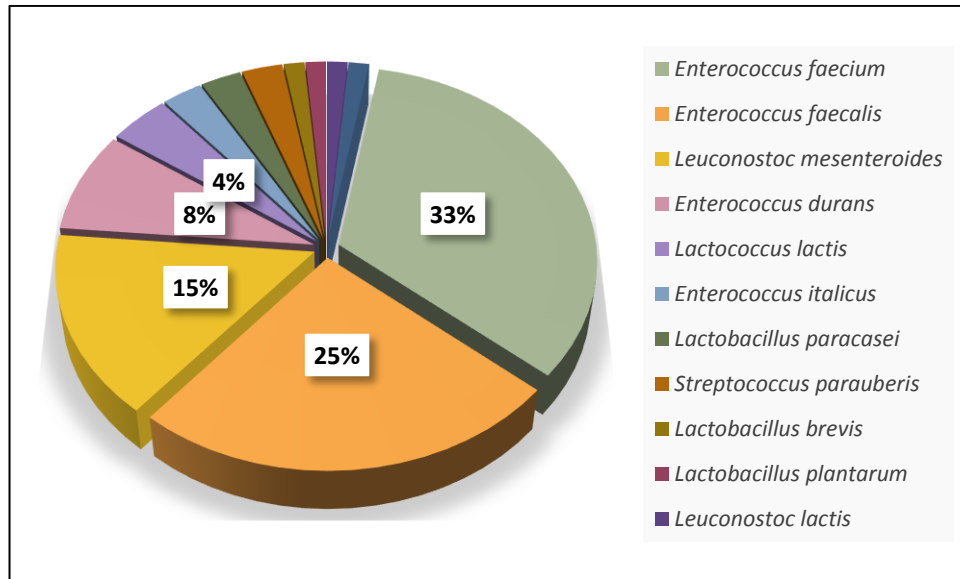
Tablo 4.5. (Devamı)

| | | | |
|-------------------------|-----|---------------------------|----------------------|
| | H71 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | H72 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| Deride Tulum Peyniri | HA1 | <i>E. durans</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | HA2 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | HD1 | <i>E. faecium</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| | HM1 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | I71 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | I72 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| Bezde Tulum Peyniri | IA1 | <i>E. faecalis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | IA2 | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | ID1 | <i>Lb. paracasei</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| | IM1 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | IS2 | <i>Lb. plantarum</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Civil Peyniri | KA1 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | KM1 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| Köy Peyniri | L71 | <i>St. parauberis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | L72 | <i>E. faecium</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | LS1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Köy Peyniri | M71 | <i>E. faecalis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | M72 | <i>St. parauberis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| | MA1 | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | MM1 | <i>Leu. lactis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| Çeçil Peyniri | NM1 | <i>Lb. brevis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |
| Köy Peyniri | OM1 | <i>Lc. lactis</i> | <i>Belirlenemedi</i> |

Tablo 4.5. (Devamı)

| | | | |
|----------------------|-----|---------------------------|----------------------|
| | P71 | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | P72 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| Tulum Peyniri | PM1 | <i>E. faecium</i> | Belirlenemedi |
| | PS2 | <i>Lb. paracasei</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| | R71 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |
| | R72 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |
| | RA1 | <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus</i> |
| Lavaş Peyniri | RA2 | <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus</i> |
| | RM1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |
| | RS1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |
| | RS2 | <i>Leu. mesenteroides</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Yumuşak İnek Peyniri | TM1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |
| İnek Peyniri | UM1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |
| Dokuz Höyük Peyniri | YS1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| | YM1 | <i>Leu. mesenteroides</i> | Belirlenemedi |

Tablo 4.5.'ten görüldüğü gibi 71 izolat MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır. İzolatlardan 6 tanesi *E. durans*, 18 tanesi *E. faecalis*, 24 tanesi *E. faecium*, 2 tanesi *E. italicus*, 1 tanesi *Lb. brevis*, 2 tanesi *Lb. paracasei*, 1 tanesi *Lb. plantarum*, 3 tanesi *Lc. lactis*, 1 tanesi *Leu. lactis*, 11 tanesi *Leu. mesenteroides* ve 2 tanesi *St. parauberis* olarak tanımlanmıştır. Sonuçlara göre tüm peynirlerden izole edilen toplam izolatlarda, kokların basillere göre çok daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. MALDI-TOF MS yöntemine göre tüm peynirlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının suşlara göre yüzde olarak dağılımı

Şekil 4.1.'den anlaşıldığı üzere toplam olarak geleneksel yollarla üretilmiş tüm peynirlere bakıldığında %33 oranında *E. faecium*, %25 oranında *E. faecalis*, %15 oranında *Leu. mesenteroides*, %8 oranında *E. durans*, %4 oranında da *Lc. lactis* olduğu görülmektedir. Diğer bakteri suşları %3'ün altında yer almaktadır. Baskın olan türler *E. faecium* ve *E. faecalis* olarak tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada Tomas peynirlerinden izole edilen LAB'nde baskın türün *E. faecium* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* olarak tespit edilmiştir (Korucu, 2012).

Bryndza, Cebreiro, Kefalotyri, Manchego, Picante da Beira Baixa, Semicotto Caprino, Beyaz, Teleme ve Tulum gibi geleneksel peynir türlerinden izole edilen laktik asit bakterileri arasında enterokok cinsi bakteriler yüksek oranda bulunmuştur (Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Wessels ve ark., 1990; Freitas ve ark., 1996; Cintas ve ark., 2000; Suzzi ve ark., 2000; Ambadoyiannis ve ark., 2004; Öner ve ark., 2004; Jurkovič ve ark., 2006; Tuncer, 2009; Yoğurtçu, 2011).

Daha önce yapılan birçok çalışmada Tulum peynirinde başta *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* türleri olmak üzere farklı enterokok türlerine ait çok sayıda suş tespit edilmiştir (Öner ve ark., 2004; Tuncer, 2009; Yoğurtçu, 2011).

Picante da Beira Baixa (Freitas ve ark., 1996), Semicotto Caprino (Suzzi ve ark., 2000) ve Bryndza (Jurkovič ve ark., 2006); gibi geleneksel peynir türlerinden de izole edilen izolatlar arasında benzer şekilde *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* türlerinin daha fazla oranda olduğu bildirilmiştir (Yoğurtçu 2011). Tüm bu sonuçlarda görüldüğü gibi, yapılan bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki bilgiler ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında Tablo 4.8.'den anlaşıldığı gibi 13 peynir çeşidinde de Enterokok cinsi bakterilerin tespit edildiği görülmüştür.

Hızarcı (2011) yaptığı çalışmada 30 tulum peyniri örneğinden 75 LAB izole etmiş, izolatların 5 türe ait olduğunu belirlemiştir. İzolatlar arasında en sık bulunan türün *Lb. brevis* 1 (%66,67) olduğu, bunu *Lb. plantarum* 1 (%20,6), *Lb. paracasei* spp *paracasei* 1 (% 5,5), *Lb. pentosus* (%4,1), *Lc. lactis* spp *lactis* 1 (%1,4) takip ettiği belirlenmiş. 2 izolat ise tanımlanamamıştır.

Lb. paracasei, ev yapımı olarak üretilen ısıtılmış keçi sütünden üretilen Bukuljac peynirinde (Nicolic ve ark., 2008) ve başka bir çalışmada da Cheddar peynirinde (Williams ve Banks 1997) *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ve *Lb. plantarum* baskın tür olarak tespit edilmiştir (Hoorde ve ark., 2008). Yapılan çalışmamızda da köylerde geleneksel yollarla üretilmiş iki Tulum peynirinde *Lb. paracasei* ve bir Tulum peynirinde ise *Lb. plantarum* tespit edilmiştir. Bu peynirler ile Tulum peyniri sonuçları arasındaki benzerlik gözlenmiştir.

Şengül ve Çakmakçı (2003) ve Gürses ve Erdoğan, (2006) yaptıkları çalışmada Tulum peynirlerinden *Lb. paracasei* izole etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada iki farklı Tulum peyniri örneğinden *Lb. paracasei*'nin elde edilmesinden dolayı benzerlik göstermektedir.

Garabal ve ark., (2008) Cebreiro peyniri, Costa peynirinde *Lc. lactis* izole etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada Köy peyniri, Tecen peyniri ve Otlu peynirde aynı bakteri izole edilmiştir.

Şengül ve Çakmakçı (2003) Tulum peynirinden; Herreros ve ark., (2003); Armada peynirinden; Ouadghiri ve ark., (2005) Moroccan yumuşak beyaz peynirinden; Öksüztepe ve ark., (2005) çiğ süttten üretilmiş Tulum peynirinden *Lb. brevis* suşunu izole etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada geleneksel yollarla köyde üretilmiş Çeçil peynirinden bu bakteri elde edilmiştir.

Hoorde ve ark., (2008) Gauda tipi peynirlerden izole ettikleri LAB arasında baskın türlerin *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* olduğunu belirtmişlerdir. Williams ve Banks (1997) ise Cheddar peynirinden izole ettikleri 15 adet LAB izolatında en çok izole edilen türlerin *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ve *Lb. plantarum* olduğunu belirlemişlerdir. Navidghasemizad ve ark., (2009)'nın koyun sütünden elde edilen Lighvan peynirinden izole ettikleri LAB türlerinin içerisinde baskın türlerin *E. faecium*, *Lc. lactis* ve *Lb. plantarum* olduğunu ifade etmişlerdir (Coşkun, 2012).

MALDI-TOF MS ve biyokimyasal tanımlama sonuçlarını yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında iki yöntemle de tanımlaması yapılan suşlar arasında 25 tanesi cins düzeyinde aynı sonucu vermiş, 7 tanesi ise cins düzeyinde farklı bakteri olarak tespit edilmiştir. Fguiri ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada LAB izolasyonu ve tanımlanmasında biyokimyasal ve moleküler yöntemleri karşılaştırmışlardır. Buna göre *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* ve *Lb. brevis* olarak belirledikleri suşların moleküler tanımlama sonucunda *E. faecium* olduğunu tespit etmişlerdir (Fguiri ve ark. 2015). Bu sonuç yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermiştir.

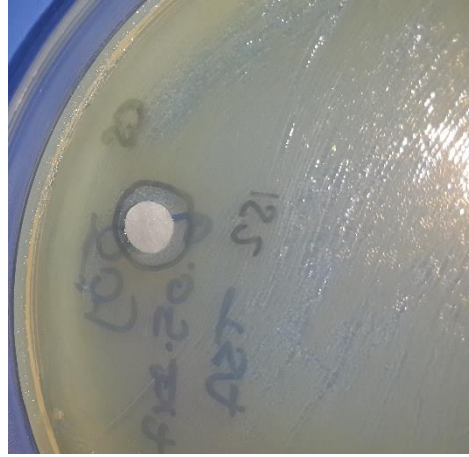
Heterofermentatif olan *Leuconostoc* suşlarının da biyokimyasal testte gaz oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu da biyokimyasal tanımlamada yanılgıya neden olmuştur.

Tablo 4.6. Peynirlerden izole edilen ve MALDI-TOF MS ile tanısı yapılan suşların sayıları

| | Çerkez peyniri | Yağlı Tulum peyniri | Yağsız Tulum peyniri | Urfa peyniri | Otlu peynir | Tecen peyniri | Deride Tulum peyniri | Bezde Tulum peyniri | Civil peyniri | Köy peyniri | Köy peyniri | Çeçil peyniri | Tulum peyniri | Lavaş peyniri | Yumuşak İnek peyniri | Sert İnek peyniri | Dokuz höyük inek peyniri | Toplam Sayı |
|---------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------------|------------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------|
| <i>E. durans</i> | - | 1 | 2 | - | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6 |
| <i>E. faecalis</i> | 3 | 3 | 1 | 3 | 2 | - | - | 2 | - | - | 2 | - | 1 | 1 | - | - | - | 18 |
| <i>E. faecium</i> | - | 1 | 3 | 3 | 1 | 2 | 5 | 3 | 2 | 1 | - | - | 2 | 1 | - | - | - | 24 |
| <i>E. italicus</i> | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| <i>Lb. brevis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>Lb. paracasei</i> | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 2 |
| <i>Lb. plantarum</i> | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>Lc. lactis</i> | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 3 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 5 | 1 | 1 | 2 | 11 |
| <i>St. parauberis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | 2 |
| <i>Leu. lactis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Toplam LAB Sayısı | 4 | 5 | 6 | 6 | 5 | 6 | 6 | 7 | 3 | 4 | 3 | 1 | 4 | 7 | 1 | 1 | 1 | 71 |

4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Araştırmada peynirlerden izole edilmiş olan 98 adet muhtemel laktik asit bakterisinin antimikrobiyal aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. LAB izolatlarının süpernatatları, disk difüzyon tekniğine göre *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC, *C. sakazakii* ATCC 29544, *B. cereus*, *S. Typhimurium* ATCC 140828'a karşı test edilmiştir. İnkübasyon sonrası zon oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Buna göre 10 adet izolatta antimikrobiyal etkinlik tespit edilmiş. LAB'lerinin yaklaşık %10'unun 6 patojen üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.2. Bezde üretilen tulum peynirinden elde edilen süpernatantın *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544'ye karşı antimikrobiyal etkisi

Şekil 4.2.'de *C. sakazakii* ATCC 29544'ye karşı tulum peynirinden elde edilen süpernatantın oluşturduğu zon görülmektedir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernatantların *C. sakazakii*'ye inhibe edici etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri ile ilgili yapılmış birçok çalışma olmasına rağmen bu patojenle yapılmış bir çalışmaya rastlanılmadığı için bu çalışma örnek oluşturmaktadır.

Tablo 4.7.'de laktik asit bakterilerinden elde edilen izolatlardan *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii* ATCC 29544,

B. cereus, *S. Typhimurium* ATCC 140828 patojenlerine karşı antimikrobiyal etki gösterenler Tablo 4.8.'de ise antimikrobiyal etki göstermeyenler verilmiştir.

Tablo 4.7. Antimikrobiyal etki gösteren izolatlar

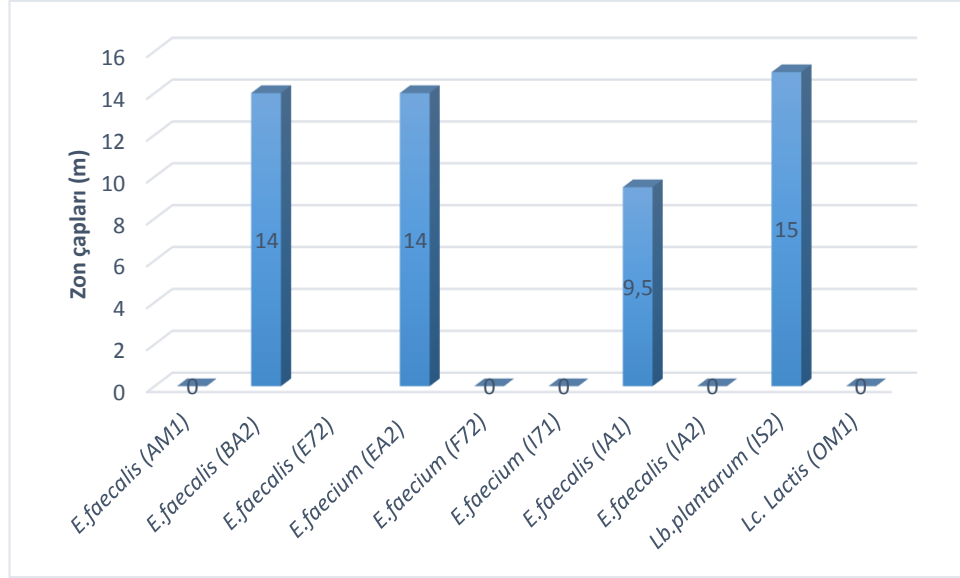
| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AM1 | BA2 | E72 | EA2 | F72 | I71 | IA1 | IA2 | IS2 | OM1 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

Tablo 4.8. Antimikrobiyal etki göstermeyen izolatlar

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AA1 | BD1 | CD1 | FA1 | GA1 | HA1 | IM1 | L72 | MS2 | PS2 | SM1 |
| AA2 | BM1 | CM1 | FA2 | GA2 | HA2 | IS1 | LS1 | NM1 | R71 | TM1 |
| AD1 | BS1 | CM2 | FD1 | GD1 | HD1 | JS1 | LS2 | NS1 | R72 | UM1 |
| AS1 | BS2 | E71 | FM1 | GM1 | HM1 | JS2 | M71 | NS2 | RA1 | US1 |
| AS2 | C71 | EA1 | FS1 | GS1 | HS1 | KA1 | M72 | P71 | RA2 | US2 |
| B71 | C72 | ED1 | FS2 | GS2 | HS2 | KD1 | MA1 | P72 | RM1 | YM1 |
| B72 | CA1 | EM1 | G71 | H71 | I72 | KM1 | MM1 | PM1 | RS1 | YS1 |
| BA1 | CA2 | F71 | G72 | H72 | ID1 | L71 | MS1 | PS1 | RS2 | YS2 |

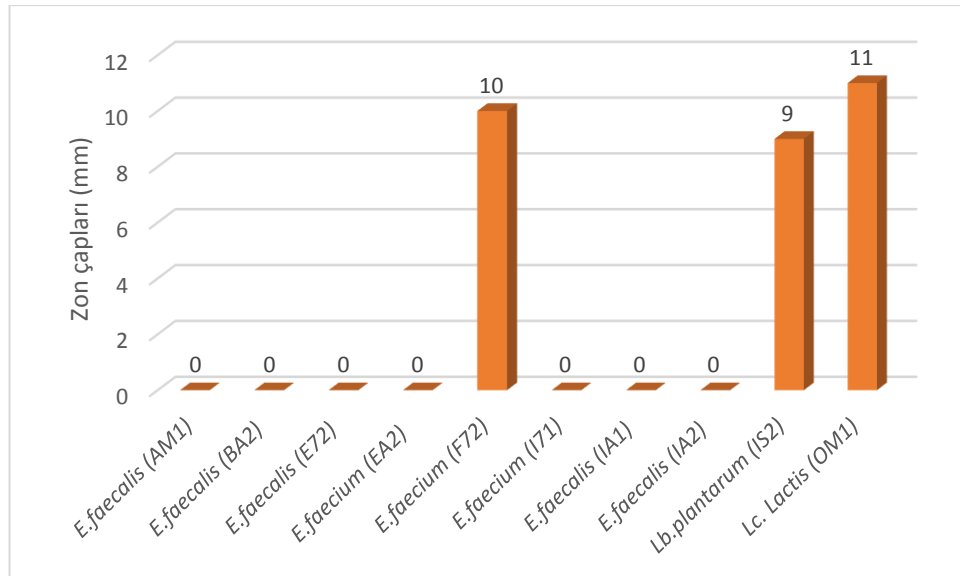
Tablo 4.7 ve 4.8'den anlaşıldığı gibi yapılan bu çalışmada peynirlerden elde edilen laktik asit bakterisi izolatlarından büyük çoğunluğunun antimikrobiyal etki göstermediği anlaşılmaktadır.

Theppangna ve ark. (2007), et, köpek dışkısı, su kuşları dışkısı ve insan dışkısından elde edilen 48 adet *E. faecium* ve 91 adet *E. faecalis*'den meydana gelen toplam 129 izolatın antibakteriyel aktivitesini; *Staph. aureus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* ve *E. coli* üzerinde test etmişlerdir. İzolatların %37'sinin en az bir bakteriye karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu değerlendirmişlerdir. Bu çalışmadaki sonuçlarda elde ettiğimiz veriler ile örtüşmektedir.



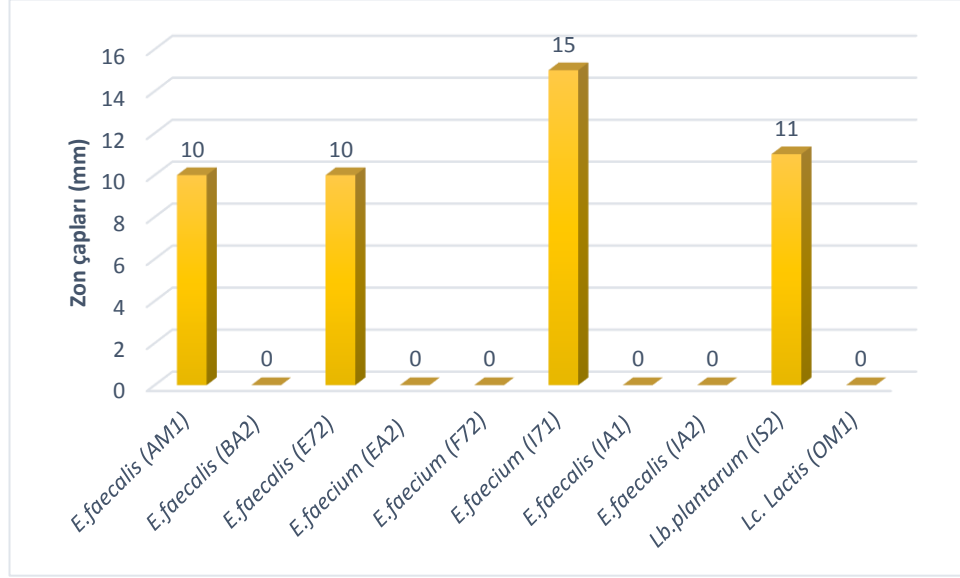
Şekil 4.3. *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı izolatların oluşturduğu zon çapları(mm)

Şekil 4.3.'ten görüldüğü üzere Yağlı Tulum peynirinden elde edilen *E. faecalis* 14 mm, Urfa peynirinden izole edilen *E. faecium* 14 mm, Tulum peynirinden izole edilen *E. faecalis* 9,5 mm; *Lb. plantarum* ise *L. monocytogenes* ATCC 7644' karşı 15 mm zon oluşturmuştur.



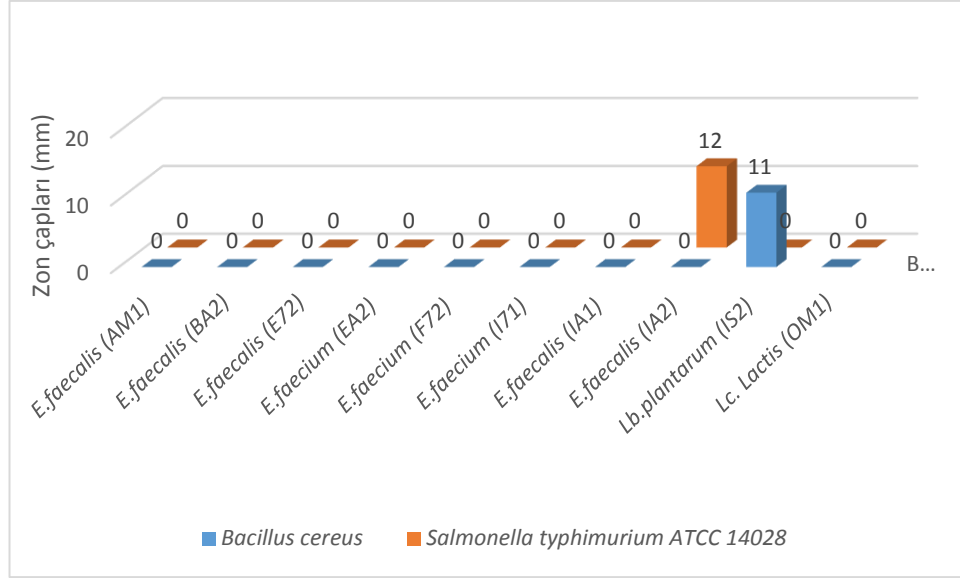
Şekil 4.4. *E. coli* O157:H7'e karşı izolatların oluşturduğu zon çapları(mm)

Şekil 4.4'ten anlaşıldığı gibi Otlu peynirden izole edilen *E. faecium* 10 mm, Tulum peynirinden izole edilen *Lb. plantarum* 9 mm ve köy peynirinden izole edilen *Lc. lactis*; *E. coli* O157:H7'ye karşı 11 mm zon oluşturmuştur.



Şekil 4. 5. *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544'ya karşı izolatların oluşturduğu zon çapları(mm)

Şekil 4.5.'ten görüldüğü üzere Çerkez peynirinden elde edilen *E. faecalis* 10 mm, Urfa peynirinden izole edilen *E. faecalis* 10 mm, Tulum peynirinden izole edilen *E. faecium* 15 mm; *Lb. plantarum* ise *C. sakazakii* ATCC 29544'ya karşı 11 mm zon oluşturmuştur.



Şekil 4.6. *B. cereus* ve *S. Typhimurium* ATCC 14028'ya karşı izolatların oluşturduğu zon çapları (mm)

Şekil 4.6.'dan anlaşıldığı üzere Tulum peynirinden izole edilen *E. faecalis*, *S. Typhimurium* ATCC 14028'ya karşı 12 mm; *Lb. plantarum* ise *B. cereus*'a karşı 11 mm zon oluşturmuştur. *Staph. aureus* ATCC 25923'yi elde edilen 98 tane izolattan hiçbirisi inhibe edememiştir.

Yapılan tüm antimikrobiyal testler üç tekerrürlü olarak uygulanmış ve ortalamaları alınmıştır. Standart sapması yüksek olan sonuçlarda ise çalışmalar tekrarlanmıştır.

Yapılan bir tez çalışmasında; şalgam suyundan izole edilmiş olan 6 adet laktik asit bakterisinin antimikrobiyal aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staph. aureus* ATCC 10832'de inkübasyon sonrası zon oluşumu görülmemiştir (Samandır, 2014). Yaptığımız çalışmada da *Staph. aureus* ATCC 25923'ü izolatlardan hiçbirisi inhibe edememiştir. Bu açıdan elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile benzerlik göstermektedir.

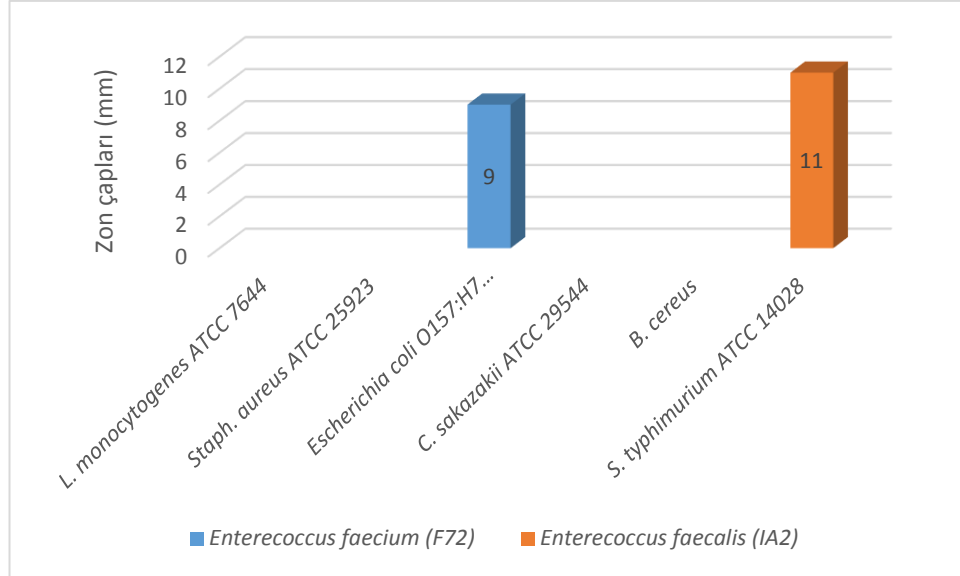
Hajikhani ve ark (2007), beyaz peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Değerlendirilen tüm enterokok

izolatlarının gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Yine bir başka çalışmada Bilgin (2008), geleneksel olarak üretilen beyaz peynirden izole edilen *E. faecium*'un *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'a karşı inhibitör aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Abanoz (2014) ise, yaptığı çalışmada fermente süt ürünlerinden izole ettiği *E. faecalis*'in, *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmiştir (Uludağ, 2015).

Bir başka çalışmada ise; salamura beyaz peynirden izole edilen suşların antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. İzole edilen laktobasil suşlarının *E. coli* ve *Yersinia enterocolitica* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu laktobasil suşlarının starter olarak farklı bakteriler ile birlikte kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Özkaya 2001).

4.4. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosinlerin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Amonyum sülfat ile çöken proteinlerdeki oluşan yapışkanlık nedeniyle potasyum fosfat tamponu ile çözündürülmüştür. Elde edilen çökelti kısmi bakteriyosin olarak değerlendirilerek daha önce antimikrobiyal etki gösteren izolatlardan elde edilen bu kısmi bakteriyosinlerin yine aynı altı patojen bakteri üzerine antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. *E. faecium* F72 ve *E. faecalis* IA2 tarafından üretilen ham bakteriyosinlerin bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesi

Daha önce süpernatantları antimikrobiyal etki gösteren bazı izolatlardan (AM1, BA2, E72, EA2, I71, IA1, IS2, OM1) elde edilen kısmi bakteriyosinleri altı patojene karşı antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir. Bunlardan sadece (F72 ve IA2 preparatları) patojenleri inhibe etmiştir. Otlu peynirden elde edilen *E. faecium*'un ürettiği kısmi bakteriyosin *E. coli* O157:H7'ye karşı 9 mm çapında zon, Tulum peynirinden izole edilen *E. faecalis*'in ürettiği kısmi bakteriyosin ise *S. Typhimurium* ATCC 14028'ya karşı 11 mm zon oluşturmuştur. Denemeler üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve ortalamaları alınmıştır.



Şekil 4.8. Tulum peynirinden elde edilen kısmi bakteriyosinin *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028'e karşı antimikrobiyal etkisi

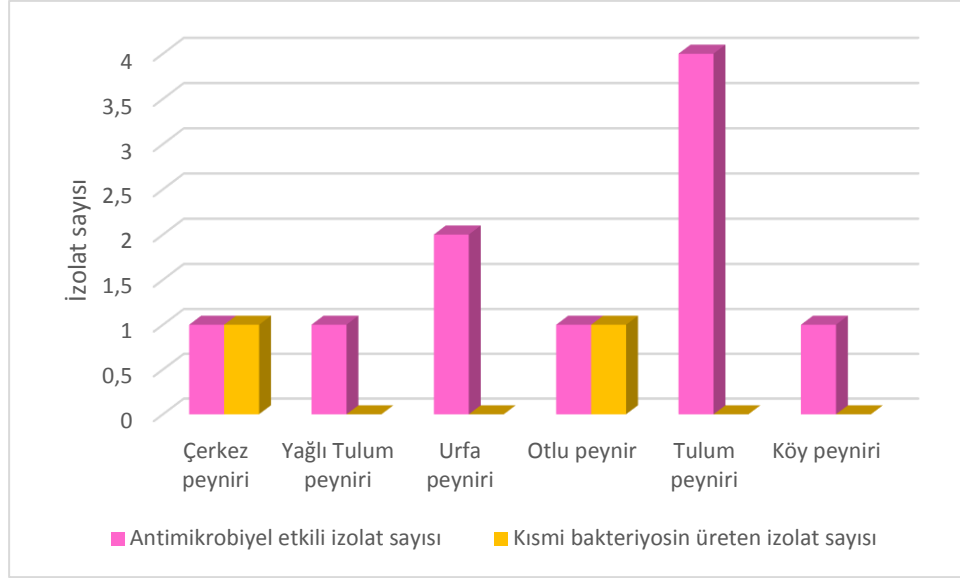
Şekil 4.8.'de Tulum peynirinden elde edilen kısmi bakteriyosinin *S. Typhimurium* ATCC 14028'e karşı oluşturduğu zon görülmektedir.

Bu çalışmada antimikrobiyal etkili 10 izolattan sadece 2 tanesi tarafından üretilen ve kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosin preparatlarının antimikrobiyal etkisini koruduğu görülmüştür.

Yapılan başka bir tez çalışmasında da nötralizasyon sonrası 601 izolattan sadece 35 adedinin etkisini koruduğu görülmüştür. Ayrıca katalaz enzimi ile hidrojen peroksitin antimikrobiyal etkisi de giderilmiş ve katalaz uygulanması sonucunda antimikrobiyal testte hiçbir izolatin etkisini kaybetmediği ve antimikrobiyal etkinin hidrojen peroksitten kaynaklanmadığı anlaşılmıştır (Sezer, 2007). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Uludağ (2015), yaptığı yüksek lisans çalışmasında enterokoklardan elde edilen kısmi bakteriyosinler, *S. Enteritidis*, *E. coli*, *B. cereus* ve *Stah. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da *E. faecium*'un ürettiği kısmi bakteriyosin *E. coli* O157:H7'ye, *E. faecalis*'in ürettiği kısmi bakteriyosin ise *S. Typhimurium*'a etki etmiştir.

Karagül (2010), tulum peynirlerinden izole edilen Bakteriyosin-benzeri madde üreten LAB izolatlarının *B. cereus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *Staph. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. üzerine inhibitör etki gösterdiğini bulmuştur. Achemchem ve ark (2005), yaptıkları bir çalışmada *E. faecium*'in ürettiği bakteriyosinin *Listeria*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'un bazı suşlarına karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Todorov ve Dicks (2005), yaptıkları araştırmada *E. faecium* tarafından üretilen bakteriyosinin *E. coli*'ye karşı inhibitör etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Başka çalışmada ise Gharairi ve ark (2008), "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium*'un ürettiği enterosin A ve B'nin., *L. monocytogenes* ve *Staph. aureus* üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (Uludağ, 2015). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar da literatürde verilen bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.9. Peynirlere göre antimikrobiyal etkili bakterilerin ve kısmi saflaştırılan bakteriyosinlerin sayıları

Sonuç olarak Şekil 4.9.'da görüldüğü üzere Çerkez peynirinden, Yağlı Tulum peynirinden, Otlu peynirden ve köy peynirinden 1'er adet antimikrobiyal etkili, Urfa ve Tulum peynirlerinden 2'şer adet etkili suş elde edilmiştir. Çerkez ve Otlu peynirden izole edilen 2 adet laktik asit bakterisi, ayrıca kısmi bakteriyosin üretebilmişlerdir.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde birçok farklı yapı, görünüş ve tada sahip, üretildikleri bölgede sınırlı kalmış geleneksel peynir çeşitleri bulunmaktadır. Geleneksel yöntemlerle üretilmiş peynirlerin araştırılması kültürel mirasın devamlılığına katkı sağlamanın yanı sıra beslenmedeki gıda çeşitliliğini artırmak açısından da yararlı olmaktadır. Bu çalışmada geleneksel yöntemlerle üretilmiş 21 adet köy peynirinden laktik asit bakterilerini izole ederek cins ve tür düzeyinde tanımlanması ve antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu peynirlerden 525 adet izolat elde edilmiş ve katalaz pozitif olanlar elendikten sonra Gram negatif olan izolatlar çıkarılınca geride kalan 203 izolat kalmıştır. Bunlar içerinden farklı peynirlerden elde edilen ve farklı besiyerinde gelişen izolatlardan 142 tanesi seçilerek testler uygulanmış ve bunlardan da 71 tanesi MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak kesin tanıları yapılmıştır.

Biyokimyasal test sonuçlarına göre 10 adet *Leuconostoc*, 47 adet laktobasil, 44 adet enterokok ve 1 adet streptokok olmak üzere toplam 102 adet laktik asit bakteri izolatu cins düzeyinde tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS analizi sonucunda bu izolatlardan 6 tanesi *E. durans*, 18 tanesi *E. faecalis*, 24 tanesi *E. faecium*, 2 tanesi *E. italicus*, 1 tanesi *Lb. brevis*, 2 tanesi *Lb. paracasei*, 1 tanesi *Lb. plantarum*, 3 tanesi *Lc. lactis*, 1 tanesi *Leu. lactis*, 11 tanesi *Leu. mesenteroides* ve 2 tanesi ise *St. parauberis* olarak belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu yapılırken MRS ve M17 Agar'ın yeterince selektif olmamasından dolayı zorluklar yaşanmıştır. Biyokimyasal ve fenotip olarak birbirine çok benzeyen türlerin genotipik özellikleri birbirinden farklı olabilmektedir. Bu yüzden laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında klasik yöntemlerin yanında mutlaka moleküler yöntemlerin de kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

MALDI-TOF MS yönteminin laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında çok büyük oranda doğru sonuç vermesi, analizin kısa sürede gerçekleşmesi ve maliyetinin düşük olması gibi çok fazla avantajının olmasından dolayı tanımlama testlerinin bu yöntem ile yapılmasının verimli olacağı tespit edilmiştir.

Tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi laktik asit bakterilerinde de yapılan çalışmalarda bakterilerin fenotipik özelliklerinde zamanla değişimler olabilmekte ve her denemede farklı sonuçlar elde edilebilmektedir.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu çalışmada laktik asit bakterilerinin ve ürettikleri metabolitlerin, farklı patojenlere karşı farklı etkiler gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle daha çok sayıda farklı patojenlerle çalışılmasının kesin sonuçlar alınmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde birçok çalışmada da bahsedildiği gibi zonlar 6. saatten itibaren saf ve konsantre olmadıklarından etkisini kaybedebilmektedir. İnkübasyon süresi boyunca 18-24 saat değil 6-8. saatlerde de zonlar incelenmelidir.

Daha az basamaklı, pratik ve daha kısa süren bir yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmadaki laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkinliğinin yaklaşık %85'inin organik asit ve düşük pH değerlerinden kaynaklandığı görülmüştür. Süpernatantların pH'ları nötralize edildiğinde ve kısmi bakteriyosin elde edildiğinde antimikrobiyal etkinliğini koruyan suş sayısı çok düşük bir değer bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önce yayınlanan literatür verileri ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada 98 izolattan 10 tanesi antimikrobiyal etki göstermiş ve bu izolatlardan sadece 2 tanesi bakteriyosin üreticisi olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma ayrıca bir türe ait bakterinin farklı izolatlarının ürettiği antimikrobiyal etkili maddelerinin patojenlere karşı gösterdiği inhibisyonların birbirinden farklılık

gösterebildiği sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni olarak izolatın alt türlerinin ürettiği farklı metabolitlerden kaynaklandığı düşünölmektedir.

Laboratuvar ortamında patojenlere karşı etkili olan bakteriyosinlerin mutlaka gıdalar üzerine de denenmesi ve uygulanabilirliğinin kesinleştirilmesi yararlı olacaktır. Ekonomik üretim yöntemleri geliştirilerek büyük miktarda bakteriyosin üretim yöntemi geliştirilmeli ve gıda sanayiinde doğal koruyucu olarak kullanılabilirliği üzerine çalışılmalıdır.

Bakteriyosinlerin elde edilmesinde kısmi bir saflaştırma işlemi yapıldığı için antimikrobiyal etkinin tek bir proteinden mi yoksa birden fazla proteinden mi kaynaklandığı kesin olarak bilinmemektedir. Bakteriyosin preparatları tam olarak saflaştırılması ve tanımlanması için kromatoğrafik yöntemler uygulanarak amino asit diziliminin tespit edilmesi gerekmektedir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda bu elde edilen bakteriyosinlerin tanımlanması planlanmaktadır. Bu çalışmada elde edilen izolatlar ile starter kültür ve probiyotik potansiyeli açısından devam edilecek daha ileri çalışmalar için materyal sağlanmışır.

KAYNAKLAR

- Abanoz, H. 2014. *Enterococcus faecalis* Kt11'in probiyotik potansiyelinin belirlenmesi ve bakteriyosin üretimi üzerine çalışmalar. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 1-110.
- Adams, M. R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68: 2, 171-178.
- Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., ve Kuipers O. P. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (7), 2939-2951.
- Ambadoyiannis, G., Hatzikaramari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. 2004. Probiotic and technological properties of enterococci isolated from infants and cheese. *Food Biotechnology*, 18 (3), 307-325.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 475–486.
- Anhalt, J. P., Fenselau, C. 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 47: 219-25.
- Anonim 2017, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FFC0671D8648333F35>, Erişim Tarihi: 26.01.2017.
- Aslantaş, Ö., Öztürk, F., Çelebi, A., Açıık, L., Ergün, Y. 2006. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 53, 47–51.
- Aymerich, M. T., Garriga, M., Monfort, J. M., Nes, I., Hugas, M. 2000. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17(1), 33-45.
- Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W., Zheng, X. D. 2016. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17 (8), 597.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Küster, B. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 389: 1017-1031.

- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T. 2008. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*;74: 5402–07.
- Bekpınar, E. 2012. Bazı laktik asit bakterisi suşlarının *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'a karşı antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Beukes, E. M., Bester, B. H., Mostert, J. F. 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63(3), 189-197.
- Birollo, G. A., Reinheimer, J. A., Vinderola, C. G. 2001. Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology*, 18, 597-604.
- Bian, X., Evivie, S. E., Muhammad, Z., Luo, G. W., Liang, H. Z., Wang, N. N., Huo, G. C. 2016. In vitro assessment of the antimicrobial potentials of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from traditional cheese in Sinkiang China against food-borne pathogens. *Food and Function*, 7 (2), 789-797.
- Bilgin, H. 2008. Fermente süt ürününden izole edilen bakteriyosinjenik bir bakterinin antimikrobiyal aktivitesi. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 5-24.
- Büyükyörük, S., Soyutemiz, G. E. 2010. Geleneksel olarak üretilmiş İzmir tulum peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve alttür *cremoris*) suşlarının izolasyonu, fenotipik ve moleküler teknikler ile identifikasyonu, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg. 7(2), 81-87.
- Campos, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M., Velazquez, J.B., 2008. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta Maxima), *Food Research International*,7, 432-441.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1), 131-149.
- Carr, F. J., Chill, D., Miada, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Chandan, R. C. 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. *Journal of Dairy Science*, 82 (10), 2245-2256.
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., Schrenzel, J. 2010. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of clinical microbiology*, 48: 1169–75.

- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hermandez, P. E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produced enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182 (23), 6806-6814.
- Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V., Gordon D.B. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14: 1584–86.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1–20.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3:777–788. doi:10.1038/nrmicro1273
- Dalca, H. S., 2015. Denizli ilinden toplanan çiğ sut ve peynirlerden otololitik laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanınlanması ve otolitik ozelliklerinin belirlenmesi. Pamukkale Universitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Muhendisliği Anabilim Dalı, Yuksek Lisans Tezi.
- De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Messens, W., 2002. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation,. *Applied and Environmental Microbiology* 68.12, 6059-6069.
- Dimitonova, S.P., Bakalov, B.V., Aleksandrova-Georgieva, R. N., Danova, S. T. 2008. Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 41 (6), 469-477.
- Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (1-3), 31-42.
- El-Ghaish, S., Khalifa, M., Elmahdy, A. 2017. Antimicrobial impact for *Lactococcus lactis subsp. lactis* A15 and *Enterococcus faecium* A15 isolated from some traditional Egyptian dairy products on some pathogenic bacteria. *Journal of Food Biochemistry*, 41 (1).
- Eralp M. 1973. Peynir Teknolojisi. Ankara Universitesi Basımevi, Ankara, 331.
- Erginkaya, Z., Yurdakul, N. E., Karakaş, A. 2007. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in starter ve probiyotik kultur ozellikleri. *Gıda*, 32 (3) : 137-142.
- Erkkila, S., Petaja, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., Suihko, M. L. 2001. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat science*, 58 (2), 111-116.
- Erturkmen, P., Oner, Z. 2015. Beyaz peynir orneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kultur ozelliklerinin biyokimyasal yontemlerle belirlenmesi. *SDU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19 (3).

- Facklam, R., R., Sahm, D. S., Teixeira, L. M. 2002. Standard laboratory methods for identifying and growing enterococci. manual of clinical microbiology, ASM Press.
- Feiner, G. 2006. Meat products handbook: Practical science and technology. Elsevier. 595-610
- Fguiri, I., Atigui, M., Ziadi, M., Arroum, S., Khorchani, T. 2015. Biochemical and molecular identification of lactic acid bacteria isolated from camel milk in Tunisia. Emirates Journal of Food and Agriculture, 27 (9), 716.
- Foulquié-Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou. E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. International journal of food microbiology, 106 (1), 1-24.
- Franz, C., Holzapfel, W. H., Stiles, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. International journal of food microbiology, 47 (1), 1-24.
- Freitas, A. C., Paris, C., Malcata, F. X. Hogg, T. A., 1996. Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. Journal of Food Protection, 59; 155-160.
- Freitas, D. B., Reis, M. P., Lima-Bittencourt, C. I., Costa, P. S, Assis, P. S., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A. 2008. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes, 1 (92), 1-92.
- G-Allegria, E., Lopez, I., Ruiz, I. J., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C. Ruiz-Larrea, F. 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. FEMS Microbiology Letters, 230: 53-61.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology 120: 51–70.
- Galvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. B. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. Critical Reviews in Biotechnology, 28(2), 125-152.
- Garabal, J. I., Alonso, P. R., Centeno, J. A. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain), LWT 41, 1452-1458.
- Gurses, M., Erdoğan, A., 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. International Journal of Food Properties (9): 551-557.
- Gürgün, V., Halkman, K. 1990. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara.
- Gürsel, A., Şenel, E., Yaman, Ş. 2004. Use of a biopreservative culture against yeast and mould growth in set-type yoghurt. Gıda 29: 283–289.
- Haghshenas, B., Haghshenas, M., Nami, Y., Khosroushahi, A. Y., Abdullah, N., Barzegari, A., Rosli R., Hejazi, M. S. 2016. Probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H isolated from traditional dairies microbiota. Advanced pharmaceutical bulletin, 6(1), 37.

- Hajikhanı, R., Beyatlı, Y., Aslım, B. 2007. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 105-108.
- Halkman, A. K. 2005. Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları, MERCK, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara, 358.
- Halkman, A.K., Taşkın, Y. 2010. Ulusal düzeyde laktik starter kültür üretimi. 1. uluslararası Adriyatik'ten Kafkaslara geleneksel gıdalar sempozyumu, 15-17 Nisan 2010, Tekirdağ.
- Hammi, I., Delalande, F., Belkhou, R., Marchioni, E., Cianferani, S., Ennahar, S. 2016. Maltarinin CPN, a new class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CPN isolated from mould-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 121 (5), 1268-1274.
- Hansen, E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131.
- Harrigan, W. F., McCance, M. E., 1990. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. 8th edn., Academic Press, London, 452.
- Harrigan, W.F., Mc Cance, M.E., 1966. *Laboratory methods in microbiology*. Academic Pres, 362 s, London and Newyork.
- Hébert, E. M., Raya, R. R., Tailliez, P., Giori, G. S. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *International journal of food microbiology*, 59(1), 19-27.
- Heller, D. N., Cotter, R. J., Fenselau, C., Uy, O. M. 1987. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem*. 59: 2806-09.
- Herreros, M. A., Fresno, J. M., Prieto, M. J., ve Tornadijo, M. E. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal* 13, 469-479.
- Hızarcı, Ö. 2011. Tulum peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve anti-listerial etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 37.
- Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J. 2007. MALDI MS: A practical guide to instrumentation. İn: *methods and applications*. John Wiley and Sons, 345.
- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., Lay, J. O. 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10 (10), 1227-1232.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. H., Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition, William & Wilkins, Baltimore, 787.
- Holzappel, 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.

- Hoorde, K. V., Verstraete, T., Vandamme, P., Huys, G., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, 25: 929–935.
- Husejnagić, D., Hodžić, S., Avdić, A., Širanović, S., Vilišić, M. 2016. Antimicrobial activity of the cell free supernatants of the lactic acid bacteria isolated from fresh cow cheese produced in tuzla region. *Technologica Acta*, 9 (2).
- Huys, G., Pearson, M., Kampfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V. Swings, J. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. *nov.*, isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (3), 885- 891.
- Jabbari, V., Khiabani, M. S., Mokarram, R. R., Hassanzadeh, A. M., Ahmadi, E., Gharenaghadeh, S., Karimi, N., Kafil, H. S. 2017. *Lactobacillus plantarum* as a probiotic potential from kouzeh cheese (traditional iranian cheese) and its antimicrobial activity. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-5.
- Jahreis G., Vogelsang, H., Kiessling, G., Schubert, R., Bunte, C., Hammes W.P. 2002. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Research International*, 35, 133–138
- Jiménez, E., Delgado, S., Fernández, L., García, N., Albújar, M., Gómez, A. Rodríguez, J.M. 2008. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in microbiology*, 159 (9), 595-601.
- Jurkovič, D., Križkova', L., Dušinsky', R., Belicova', A., Sojka, M., Krajčovič, J., Ebringer, L. 2006. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 553-559.
- Kılıç, S. 2008. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 451.
- Kırmacı, A., H., Özer, B. H., Akçelik, M., ve Akçelik, N. 2015. Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *International Journal of Dairy Technology*.
- Kim, S. W., Perl, L., Park, H. J., Tandianus, E. J., Dunn, W. N., 2001. Assesment of stress responce of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 43: 346-350.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 2-3, 123-131.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., De Vos, W. M. 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (2), 788-792.
- Korkmaz, A. G. 2011. Yoğurt ve peynir için starter kültür üretimi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.

- Korucu, D. 2012. Tomas peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 32.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67-78.
- Lindgren, S. W., Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev*, 87, 149-164.
- Litopoulou-Tzenetaki, E. 1990. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *Journal of Food Science*, 55, 111-113.
- Macaluso, G., Fiorenza, G., Gaglio, R., Mancuso, I., Scatassa, M. L., 2016. In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. *Italian Journal of Food Safety*, 5 (1).
- Mellmann, A, Cloud, J., Maier T, Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight light mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non fermenting bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 46 (6), 1946-1954.
- Messens, W., Neysens, P., Vansielegheem, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L. 2002. Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (3), 1431-1435.
- Miller, K. G., Alfonsott, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., Rand, J. B. 1996. A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Neurobiology*, 93, 12593–12598.
- Moreno, F., Callewaert, R., Devreese, B., Beeumen, J. V, Vuyst, D. L. 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 214– 229.
- Munoz, A., Ananou, S., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Rodriguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal* 17: 760–769.
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C. 2017. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International journal of food microbiology*, 247, 2-8.
- Navidghasemizad S, Hesari J, Saris P, Nahaei M R. (2009). Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semihard cheese made from raw sheep milk in Iran. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (2): 260-264.
- Nicolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 162–170.

- Nigatu, A., Ahrne, S., Molin, G. 2000. Temperature-Dependent Variation in API 50 CH Fermentation Profiles of *Lactobacillus* Species. *Current Microbiology*, 41(1), 21-26.
- O'Keefe, T., Hill, C. 1999. Bacteriocins: Potential in food preservation. *Encyclopaedia of food microbiology*, 1, 183-196.
- Oberman, H., Libudzisz, Z. 1998. Fermented milks. *Microbiology of fermented foods*. Springer US, 308-350.
- Okcu, G. 2011. Geleneksel olarak üretilen şalgam suyundan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve fenolik asit dekarboksilaz üreten suşların seçimi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F., Oral, B. 2011. Bazı laktik asit bakterilerinden 16S rDNA ara bölge (ISR) temel alınarak gerçekleştirilen filogenetik analizler. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, Ankara, 205.
- Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., Swings, J. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben), *FEMS Microbiology Letters* 251, 267- 271.
- Öksüztepe, G., Patır, B., Çalıcıoğlu, M. 2005. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak Tulum Cheese. *Turk J Vet. Anim. Sci* 29, 873-879.
- Öncel, I., Üstün, S., Keleş, Y. 2004. Bitki fizyolojisi labotatuvar kılavuzu, A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletme Yayınları No: 48, 27.
- Öner, Z., Sağdıç, O., Şimşek, B. 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of turkish tulum cheeses. *European Food Research and Technology*, 219, 455-459.
- Özcan, A. Ö., Aran, N. 2003. Laktik asit bakterilerinin gıda muhafazasında koruyucu kültür olarak kullanımları. *Gıda Teknolojisi*: 60–64.
- Özcan, N., Ezin, Ö., Akpolat, N., Bozdağ, H., Mete, M., Gül, K. 2016. Klinik örneklerde saptanan *Candida* türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi.
- Özkaya, F.D. 2001. Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı Laktokok, Enterokok ve Laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 134, Ankara.
- Papamanoli, E., Tzanetakı, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65: 859-867.
- Park, S. H., Itoh, K., Fujisawa, T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *Journal of applied microbiology*, 95 (2), 294-300.

- Pidcock, K., Heard, G. M., Henriksson, A. 2002. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*, 76 (1), 75-81.
- Pimentel, L., Semedo, T., Tenreiro, R., Crespo, M. T., Pintado, M. M., Malcata, F. X. 2007. Assessment of safety of enterococci isolated throughout traditional Terrincho cheese making: virulence factors and antibiotic susceptibility. *Journal of food protection*, 70 (9), 2161-2167.
- Prod'hom, G., Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. 2010. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *Journal of clinical microbiology*, 48 (4), 1481-1483.
- Randazzo, L. R., Restuccia, C., Romaro, D. A., Caggia, C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 9-14.
- Rodriguez, E., Calzada, J., Arques, J. L., Rodriguez, J. M., Nunez, M., Medina, M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* and *E. coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15: 51-57.
- Rosaria, M., Modesto, M., Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal Of Microbiology* 115, 35-42.
- Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Coffey, A. 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology*, 11(3), 96-104.
- Salminen, S., Von Wright, A. 1993. Lactic acid bacteria. Microbiology and functional. Marcel Dekker, INC. New York.
- Samandır, N. 2014. Şalgam suyundan izole edilen laktik asit bakterilerinin 16s rRNA ile tanımlanması ve bazı gelişme parametrelerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Sancak, B., Günalp, A. 2001. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatların kantitatif antibiyogram ve plazmid profil analizi yöntemleri ile tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bült*, 35,11-24.
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez Bueno, M., Maqueda, M. 2011. AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell Mol Life Sci* 68:2845-2857. doi:10.1007/ s00018-011-0724-4
- Sandine, W. E., Elliker, P. R., Hays, H. 1962. Cultural studies on *Streptococcus diacetyllactis* and other members of the lactic streptococcus group. *Canadian journal of microbiology*, 8 (2), 161-174.
- Schillinger, U., Lücke, F. K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*, 4 (3), 199-208.
- Schnürer, J., Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology* 16: 70-78.

- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., Raoult, D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49 (4), 543-551.
- Sengül, M., Çakmakçı, S. 2003. Characterization of natural isolates of lactic acid bacteria from Erzincan (Savak) Tulum cheese. *Milchwissenschaft*, 58 (9-10), 510-513.
- Sezer, Ç. 2007. Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Stevenson L.G., Drake S.K., Murray P.R. 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 48 (2), 444-447.
- Stiles, M. E., Holzapel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria and foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Suda, S., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2012. Lactacin 3147—biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13 (3), 193-204.
- Suh, M. J., Limbach, P. A. 2004. Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *European Journal of Mass Spectrometry*, 10 (1), 89-100.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gadrini, F., Lombardi, A., Vanni, L., Guerzoni, M. E, Andrighetto, C., Lanorte, M. T. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89, 267-274.
- Sürmeli, G. 1979. Çeşitli vitaminlerin bazı süt mamulünden izole edilen süt asiti bakterilerinin gelişmesi ve meydana getirdikleri metabolik ürünler üzerine etkisi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Z. Mikrobiyoloji Kürsüsü, Ankara.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17, 1107– 1114.
- Tangüler, H. 2010. Şalgam suyu üretiminde etkili olan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi ve şalgam suyu üretim tekniğinin geliştirilmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 367.
- Tatlı, D. 2009. Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, Ankara. 291.
- Tenreiro, R., Barreto-Crespo, M. T., Semedo-Lemsaddek, T. 2012. *Enterococcus* and safety. New York: Nova Science Publishers, Inc.

- Theppangna, W., Murase, T., Tokumaru, N., Chikumi, H., Shimizu, E., Otsuki, K. 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J. Vet. Med. Sci.*, 69:1235-1239.
- Tulini, F. L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., De Martinis, E. C. 2016. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *Journal of Dairy Research*, 83 (01), 115-124.
- Tunail, N. 1978. Starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri ile beyaz peynirlerden izole edilen bazı bakterilerin önemli fizyolojik özellikleri üzerinde araştırmalar.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 309.
- Tunail, N., Özkaya, F. D., Gürsel, A. Tamuçay, B. 2001. Starter bakterilerin oluşturdukları biyojen aminlerin saptanması ve salamura beyaz peynirdeki biyojen amine bağlı risk faktörünün belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 96-11-12-04, Ankara.
- Tuncer, B. Ö., Ay, Z., Tuncer, Y. 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turkish Journal of Biology*, 37 (4), 443-449.
- Tuncer, Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7008-7016.
- Turhan, İ. 2012. Kaşar peyniri üretimi için starter kültür izolasyonu ve izolatların fır spektroskopisi ile tanısının yapılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 43.
- Uludağ, H. 2015. Klinik ve gıda kaynaklı enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin bazı patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal etkilerinin karşılaştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 54-62.
- Wessels, D., Jooste, P. J., Mostert, J. F. 1990. Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 349-352.
- Whitman, W. B., De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmucutes*. 2nd Edition, Vol. 3; 1422 p, Springer, London.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond. *Applied microbiology and biotechnology*, 93 (3), 965-974.
- Williams, A. G., Banks, J. M. 1997. Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (nslab) isolated from cheddar cheese manufactured in the united kingdom. *Dairy Journal*, 7: 763-774.
- Wood, B. J. B., Holzapel, W. H. 1992. *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic, London.

- Yamato, M., Ozaki, K., Ota, F. 2003. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiological Research*, 158, 169-172.
- Yılmaz, S., Duyan, S., Artuk, C., Diktaş, H. 2014. Mikrobiyolojik tanımlamada maldıtof ms uygulamaları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13(5).
- Yılmaztekin, M. 2001. Beyaz peynir üretiminde *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*'dan yararlanma olanakları üzerine bir araştırma. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yoğurtçu, N. N. 2011. Tulum peynirinden enterokok suşlarının izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 30-41.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. V. L. 2005. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Romanian Dairy Products.
- Zengin, N. 2012. Doğal olarak üretilen yoğurtlardan izole edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*'un bakteriyosin üretme yeteneklerinin belirlenmesi ve ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.

ÖZGEÇMİŞ

Eda Kılıç, 22.02.1990'da Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Giresun'da tamamladı. Hamdi Bozabağ Anadolu Lisesi'nden 2008 yılında mezun oldu. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne 2009 yılında başladı ve 2014 yılında mezun oldu. Aynı sene Ordu Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak 2016 yılında çalışmaya başladı ve yüksek lisans eğitimine de bu bölümde devam etti. Halen Sakarya Ünivesitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.