



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**GELENEKSEL OLARAK HAZIRLANMIŞ İZMİR TULUM PEYNİRİNDEN  
*LACTOCOCCUS LACTIS* (*LACTOCOCCUS LACTIS* ALTTÜR *LACTIS* VE ALTTÜR  
*CREMORIS*) SUŞLARININ İZOLASYONU, FENOTİPİK VE MOLEKÜLER  
TEKNİKLER İLE İDENTİFİKASYONU**

**Sadık BÜYÜKYÖRÜK**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2007**



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**GELENEKSEL OLARAK HAZIRLANMIŞ İZMİR TULUM PEYNİRİNDEN  
*LACTOCOCCUS LACTIS* (*LACTOCOCCUS LACTIS* ALTTÜR *LACTIS* VE ALTTÜR  
*CREMORIS*) SUŞLARININ İZOLASYONU, FENOTİPİK VE MOLEKÜLER  
TEKNİKLER İLE İDENTİFİKASYONU**

**Sadık BÜYÜKYÖRÜK**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Danışman: Prof. Dr. Gül Ece SOYUTEMİZ**

**Bursa-2007**

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR.....	41
TEŞEKKÜR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	56

## ÖZET

Bu çalışma, starter kültür kullanılmadan geleneksel tekniklere göre yapılmış İzmir Tulum peynirinden *Lactococcus* cinsine ait suşların izolasyonu ile bu izolatların birtakım fenotipik testler yardımıyla ve 16S rDNA baz alınarak düzenlenmiş primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak identifiye edilmesi amacıyla yapılmıştır. Elde edilen izolatlar, hem gelecekte bilimsel çalışmalarda materyal olarak kullanılacak, hem de peynircilikte potansiyel kültür olarak kullanılabilir.

Bu amaçla, Mayıs 2005 ile Mayıs 2006 tarihleri arasında 90 tane peynir örneği Aydın İli ve çevresinden toplanmıştır. Peynir örneklerinin soğuk zincir altında laboratuvara taşınmasından sonra mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir. Laktokok suşlarının izolasyonunda 40 µg/ml nalidiksik asit içeren M17 agar kullanılmıştır.

Bu besi yerindeki koloni sayılarının  $1.9 \times 10^7$  ile  $2.1 \times 10^8$  kob/g düzeyleri arasında değiştiği tespit edilmiş, tipik özellik gösteren koloniler ileri işlemler için seçilmiştir. Bu amaçla bu özellikteki suşlar, M17 laktoz broth içeren tüplere aktarılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Üreyen mikroorganizmalar yeniden M17 agar besi yerine ekilmiştir. Bu süreç izolatların saflaştırılması amacıyla 2 kez gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerden sonra izolatlar biyokimyasal testlere tabii tutulmuşlar ve bu şekilde 36 izolatın laktokok profili gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra bu izolatların *lactis* ya da *cremoris* alt türlerine ait olup olmadıklarını belirlemek amacıyla alttürler spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile analiz edilmiştir. Test edilen izolatların 18 tanesi *lactis* primerleri ile 11 tanesi de *cremoris* primerleri ile pozitif sonuç vermiştir. Test edilen primerlerden hiçbirisi diğer türe ait mikroorganizmalarla pozitif sonuç vermemiştir.

**Anahtar kelimeler:** İzmir Tulum peyniri, identifikasyon, *Lactococcus*, PZR

## SUMMARY

### **Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Strains From Traditionally Manufactured Izmir Tulum Cheese and Biochemical and PCR Identification**

This study was done to isolate strains belonging to the *Lactococcus* genus from Izmir Tulum cheese manufactured according to traditional techniques without using starter bacteria and to identify the isolates by some phenotypic tests and polymerase chain reaction by using primers designed from 16S rDNA. The isolated strains would be used for scientific studies in the future and selected possible candidates would be employed as starter culture in the cheese making.

For this purposes, 90 cheese samples were collected from Aydın province between May 2005–May 2006. Cheese samples were transported to the laboratory in appropriate conditions and subjected to microbiological analyses. M17 agar containing 40 µg/ml was used as the media for the isolation of lactococcal strains.

The number of colonies growing on the media was found to vary from  $1.9 \times 10^7$  to  $2.1 \times 10^8$  cfu/g. A typical colony representing the appearance of type strain was selected for the further identification. For this purpose the colonies were picked up and transferred into M17 lactose broth and incubated at 30 C for 24 h. Thereafter, planting onto M17 agar was performed. This process was repeated twice to allow purification of isolates. After this process the isolates were subjected to biochemical tests and 36 isolates represented lactococcus profile. The isolates were then analyzed by polymerase chain reaction (PCR) by using subspecies-specific primers distinguishing *lactis* and *cremoris* subspecies. Among the tested isolates 18 gave positive result with *lactis* primers whereas only 11 isolates were confirmed by *cremoris* primers.

**Key words:** Izmir Tulum cheese, *Lactococcus*, identification, PCR

## ÖZET

Bu çalışma, starter kültür kullanılmadan geleneksel tekniklere göre yapılmış İzmir Tulum peynirinden *Lactococcus* cinsine ait suşların izolasyonu ile bu izolatların birtakım fenotipik testler yardımıyla ve 16S rDNA baz alınarak düzenlenmiş primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak identifiye edilmesi amacıyla yapılmıştır. Elde edilen izolatlar, hem gelecekte bilimsel çalışmalarda materyal olarak kullanılacak, hem de peynircilikte potansiyel kültür olarak kullanılabilir.

Bu amaçla, Mayıs 2005 ile Mayıs 2006 tarihleri arasında 90 tane peynir örneği Aydın İli ve çevresinden toplanmıştır. Peynir örneklerinin hızlı bir şekilde laboratuvara taşınmasından sonra mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir. Laktokok suşlarının izolasyonunda 40 µg/ml nalidiksik asit içeren M17 agar kullanılmıştır.

Bu besi yerindeki koloni sayılarının  $1.9 \times 10^7$  ile  $2.1 \times 10^8$  kob/g düzeyleri arasında değiştiği tespit edilmiş, tipik koloni özellikleri gösteren suş ileri işlemler için seçilmiştir. Bu amaçla bu özellikteki suşlar, M17 laktoz broth içeren tüplere aktarılmış ve inkübe edilmiştir. Bundan sonra bu bakteriler, tekrar M17 agar besi yerine ekilmiştir. Bu süreç izolatların saflaştırılması amacıyla 2 kez gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerden sonra izolatlar basit biyokimyasal testlere tabii tutulmuşlar ve bu şekilde 36 izolatın laktokok profili gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra bu izolatların *lactis* ya da *cremoris* alt türlerine ait olup olmadıklarını belirlemek amacıyla alttürler spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile analiz edilmiştir. Test edilen izolatların 18 tanesi *lactis* primerleri ile 11 tanesi de *cremoris* primerleri ile pozitif sonuç vermiştir.

**Anahtar kelimeler:** İzmir Tulum peyniri, identifikasyon, *Lactococcus*, PZR

## SUMMARY

### **Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Strains From Traditionally Made Izmir Tulum Cheese and Identification of Isolates by Phenotypic and Molecular Techniques**

This study was done to isolate strains belonging to the *Lactococcus* genus from Izmir Tulum cheese manufactured according to traditional techniques without using starter bacteria and to identify the isolates by some phenotypic tests and polymerase chain reaction by using primers designed from 16S rDNA. The isolated strains will be used for scientific studies in the future and selected possible candidates would be employed as starter culture in the cheese making.

For this purposes, 90 cheese samples were collected from Aydın province between May 2005–May 2006. Cheese samples were transported to the laboratory rapidly and subjected to microbiological analyses. M17 agar containing 40 µg/ml was used as the media for the isolation of lactococcal strains.

The number of colonies growing on the media was found to be varied from  $1.9 \times 10^7$  to  $2.1 \times 10^8$  cfu/g bacteria. A typical colony representing the appearance of type strain was selected for the further identification processes. For this purpose the bacteria were picked up from the colony and transferred into a tube containing M17 lactose broth and incubated. Thereafter, the bacteria were again plated onto M17 agar. This process was repeated twice and allowed to purify the isolates. After this process the isolates were subjected to simple biochemical tests and 36 isolates were represented lactococcus profile. The isolates were then analyzed by polymerase chain reaction (PCR) by using subspecies-specific primers allowing distinguishing *lactis* and *cremoris* subspecies. Among the tested isolates 18 gave positive result with *lactis* primers whereas only 11 isolates were confirmed by *cremoris* primers.

**Key words:** Izmir Tulum cheese, *Lactococcus*, identification, PCR

## GİRİŞ

Fermente gıdaların fermantasyon süreci sırasında istenen nitelikleri kazanmalarında ve daha dayanıklı bir yapıya dönüşmelerinde laktik asit bakterileri (LAB) etkin bir role sahiptirler (1–3). Bu bakterilerin, gıdaların besleyici değerlerinin artmasının sağlanması, sindirimdeki yararlılıkları ve patojenlere karşı güvenilirlikleri gibi faydaları vardır. Doğal fermente ürünlerde ürünün kalitesi, fermantasyon prosesine ve dominant mikroorganizma türüne bağlı olarak değişmektedir (4).

LAB deyimi, Gram pozitif bakteriler ve birçok biyokimyasal ve ekolojik özellikleri bakımından ortak özellik taşıyan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır (5). LAB, sağlığa yararlı ve patojen olmayan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar içerisinde laktokoklar, laktobasiller, leukonostoklar, pediokoklar ve *Streptococcus thermophilus* yer almaktadır (6).

Organizma türüne ve metabolizmalarına bağlı olarak, başlıca karbon kaynağının glukoz olması durumunda, son ürün olarak laktik asit oluşturması durumunda homofermentatif (*Lactococcus* (*L.*), *Streptococcus* (*S.*)) ya da glukoz molekülünü laktat, etanol ve karbondioksit parçalanmasını sağlayan heterofermentatif (*Leuconostoc* (*Ln.*), *Weissella* (*W.*)) LAB olarak iki kısımda incelenmektedir (7,8). Bu asitleştirme ve enzimatik süreç ile LAB, fermente gıdalara, lezzet, tekstür ve dayanıklılık kazandırır (6). Bu mikroorganizmaların bir kısmı gıdaların bozulmasını ve patojen bakterilerin gelişimini inhibe etmelerinin ve gıdaların raf ömürlerinin uzamalarını sağlamalarının yanı sıra; et, balık ve içeceklerde bozulmaya da neden olabilmektedirler (8).

Laktik streptokoklara DNA–DNA hibridizasyon tekniklerinin uygulanması, bunların ilk sınıflandırılmasında değişikliklere neden olmuştur. Laktik streptokokların, diğer streptokoklardan genetik olarak farklı olduğu tespit edilmiş ve sonuç olarak “*Lactococcus*” adı altında yeni bir cins oluşturulması sağlanmıştır (9).

Laktokoklar, çeşitli fermente gıdalarda yararlı mikroorganizmalar olarak bilinmekle beraber (10–12), *L. lactis*, süt teknolojisinde en önemli starter bakteri türünü oluşturmaktadır (11,13–18). Doğal olarak bitkilerde ve sığır vücutlarında bulunan laktokokların (13), peynir ve diğer fermente süt ürünlerinin yapımında ve olgunlaştırılmasında starter kültür olarak dünya çapında kullanılan bir LAB olmasının nedenleri arasında bu suşların laktozu fermente etmeleri, proteinaz aktivitesine sahip olmaları, sitrat metabolizmaları, bakteriyofaj dirençlilikleri ile bakteriyosin ve ekzopolisakkarit (EPS) oluşturmaları yer almaktadır (19).



Laktokoklar, streptokok ve Enterokoklar gibi katalaz negatif, Gram pozitif koklardır. Makroskopik olarak küresel ya da oval olan bu hücreler, tek, çift ya da zincir halinde görülmektedir. Zincirin uzaması durumunda rod benzeri bir görüntü ortaya çıkmakta ve laktokokların, laktobasil olarak adlandırılmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucu olarak *L. lactis* subs. *lactis* ve *L. lactis* subs. *hordinae*, sırasıyla *Lactobasillus* (*Lb.*) *xylosus* ve *Lb. hordinae* olarak adlandırılmıştır. Laktokoklar hareketsiz olup genellikle hemoliz oluşturmazlar, sadece *L. lactis*'in bazı suşları zayıf bir  $\alpha$ -hemoliz oluşturmaktadır. Bütün laktokoklar genellikle % 4 tuzda gelişebilmektedir. Sadece *L. lactis* subs. *cremoris* % 2 tuzu tolere edebilmektedir. Laktokoklar, 10°C'de gelişebilirken 45°C'de gelişememektedirler. Bu özellikleri, streptokok ve enterokoklardan ayırt edilmesini sağlamaktadır (7,20,21).

LAB, süt ürünlerinin fermantasyonlarında özellikle de peynir yapımında önemli rollere sahiptir. Bazı fermente süt ürünlerinde, aroma bileşiklerinin oluşumunun başlatılmasında sıklıkla rol almaktadır. Süt endüstrisi, sürekli genişleyen ürün yelpazesi için LAB havuzundan özellikle çiğ süt ve çiğ süttten yapılan peynirlerden yeni suşlar elde etmeyi amaç edinmiştir (5).

Türkiye'de çok fazla peynir türü bulunmakla birlikte bunlardan 3 tanesi (Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirleri) daha fazla bilinmekte ve ekonomik önemi bulunmaktadır (22). Tulum peyniri Trakya Bölgesi hariç, Türkiye'nin her bölgesinde üretilmekle beraber gerek üretim ve gerekse üretim sonrası olgunlaştırma şekil ve süreleri farklılık göstermektedir. Tulum peyniri yaygın olarak üretildiği yörelere göre farklı isimlerle anılmaktadır. Yaygın olarak bilinenleri Erzincan (Şavak), Divle, Çimi ve İzmir (salamuralı) Tulum peynirleridir (22–25). Başta İzmir, Aydın ve Manisa illeri olmak üzere Ege Bölgesi'nde üretilen salamuralı tulum peyniri, İzmir Tulum peyniri olarak adlandırılmaktadır (25).

Standartlarımızda İzmir Tulum peyniri (salamura tulum peyniri) inek, koyun, manda ve keçi çiğ sütlerinin veya bunların karışımlarının pastörize edilmesinden sonra veya uygun pastörize sütünün tekniğine uygun olarak işlenmesi, işlem esnasında katkı maddelerinin ilave edilmesi ve olgunlaştırılması sonucu elde edilen ürün olarak tanımlanmaktadır (26).

Bu çalışma, Aydın ili ve çevresinde ilk sıralarda tercih edilen, geleneksel usullere göre yapılan İzmir Tulum peynirinden *L. lactis* suşlarının izolasyonu ve elde edilen izolatların fenotipik ve PZR ile identifikasyonu amacıyla yapılmıştır. Bu sayede, İzmir Tulum peynirlerinin doğal laktokok florasını oluşturan suşlar –80°C'de saklanarak korunmuş olacak ve ileride yapılacak asidifikasyon, proteoliz, bakteriosin oluşturma,

antibiyotik ve faj dirençlilikleri ile ekzopolisakkarit oluşturma gibi teknolojik nitelikler bakımından incelenip en uygun kültürlerin belirlenmesine ışık tutabilecektir.

## GENEL BİLGİLER

Süt içerdiği besin maddeleri nedeniyle insan için değerli bir besin olduğu kadar mikroorganizmalar için de uygun bir üreme ortamıdır. Bu nedenle dayanıklılık süresi oldukça kısadır. Sütün dayanıklılık süresinin uzatılabilmesi ancak süt ürünlerine işlenmesi ile mümkündür. Süt ürünleri içinde en yaygın olarak bilineni peynirdir. Dünya genelinde bilinen peynir çeşidi 2000 civarındadır. Fakat bu peynirlerin büyük çoğunluğu birbirine yakın çeşitler olup temelde farklı 12 peynir çeşidi vardır. Peynir yapımında kullanılan sütün çeşit ve bileşiminin bölgelere göre farklı olması tulum peynirlerinin kalitesine de yansımıştır. Bölgelere göre farklı işleme ve olgunlaştırma şekillerinden dolayı standart bir üretim şekli bulunmamaktadır. Bununla birlikte, kalitenin standardizasyonu için pastörizasyonun ve starter kültür kullanımının şart olduğu vurgulanmaktadır (23). Tulum peyniri Trakya Bölgesi hariç, Türkiye'nin her bölgesinde üretilmekle beraber gerek üretim ve gerekse üretim sonrası olgunlaştırma şekil ve süreleri farklılık göstermektedir. Tulum peyniri yaygın olarak üretildiği yörelere göre farklı isimlerle anılmaktadır. Yaygın olarak bilinenleri Erzincan (Şavak), Divle, Çimi ve İzmir (salamuralı) tulum peynirleridir. Kuru tulum peyniri genellikle İç, doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde, salamuralı tulum peyniri ise, Ege Bölgesinde özellikle de İzmir, Aydın ve Manisa çevresinde üretilmektedir (23–25).

Türkiye'de 100'den fazla peynir çeşidi bulunmakla birlikte, benzerlikleri yönünden yaklaşık 30 farklı grup altında toplanmaktadırlar. Beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniri gibi 3 peynir çeşidine ilave olarak lokal olarak üretilen Mihaliç, oltu peyniri, Van otlu peyniri, Civil peyniri, Golot peyniri, Külek peyniri, Urfa peyniri ve Diyarbakır tuzlu örgü peyniri gibi çok fazla peynir çeşidi vardır (27). Bununla birlikte ekonomik değeri olan peynirler; beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniridir (23,28).

Lokal peynirlerimizden olan tulum peynirinin (27,29) olgunlaşmasına, bakteriler ve küfler katkıda bulunmaktadır. Salamuralı tulum peyniri kendine has yapı, görünüş, renk, koku, tat ve aromada olmalı ve küflü görünümde olmamalıdır (26). İzmir Tulum peyniri, yarı sert peynir olup kütlece en çok % 50 rutubet içermelidir (26,27,30). Koyun, keçi, inek, manda sütlerinin tam, yarım yağlı ya da yağsız sütlerinden yapılabilmektedir (23,25–27,29,31).

## **İZMİR TULUM PEYNİRİ YAPILIŞI**

Trakya bölgesi dışında Türkiye'nin her yerinde tulum peyniri türleri, kuru ve salamuralı olmak üzere 2 ana grupta toplanabilir. Kuru tulum peynirleri daha çok Orta Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yaygın olarak üretilmektedir. Özellikle Erzincan, Erzurum ve Orta Anadolu'yu Akdeniz'e bağlayan Toros yaylalarının tulum peynirleri en ünlüleridir. Bunlardan Erzincan Şavak Tulum peyniri, Antalya Akseki Çimi peyniri, Karaman'ın Ayrancı yöresinin Divle Tulum peyniri ile Çankırı Kargı Tulum peyniri, büyük şehirlerimizde de talep görmektedir.

Başta İzmir, Aydın ve Manisa illeri olmak üzere Ege Bölgesi'nde üretilen salamuralı Tulum peyniri ise üretim teknolojileri ve özellikleri bakımından kuru tulum peynirlerinden farklıdır ve İzmir Tulum peyniri olarak adlandırılmaktadır.

Yarı sert, krem renginde, homojen dağılmış küçük gözler içeren İzmir Tulum peyniri, üretim yöntemleri aynı olmasına rağmen "teneke tulumu" ve "deri tulumu" olarak adlandırılmaktadır. Özellikle Ege Bölgesi'nde üretilen bu peynir, koyun, keçi, inek ve kimi zaman manda sütleri karışımından yapılmaktadır.

Geleneksel yöntemlere göre İzmir tulum peynirinin yapılışı (25);

### **Sütün ısıtılması ve mayalanması:**

Peynir yapımında kullanılacak süt genellikle pastörize edilmez, mayalanma sıcaklığına ısıtıldıktan sonra mayalanır. Mayalama sıcaklığı 32–37°C ve pıhtılaşma süresi 45–60 dakika kadardır.

### **Pıhtının parçalanması:**

Oluşan pıhtı, ucunda ağaç çubuklar bulunan ve "kıрма" adı verilen boyu 1.5 metreye varan sopalar ile parçalanır. Bu işlem, pıhtı tanelerinin nohut tanesi büyüklüğüne ulaşmaya kadar devam eder. Bu işlem tamamlandıktan sonra, pıhtı ve peynir altı suyu 15 dakika kadar dinlendirilir. Bazı işletmelerde ise, pıhtı parçalandıktan sonra tekneye 40–50°C su döküldükten ve su iyice karıştırıldıktan sonra pıhtı dinlendirilmektedir.

### **Telemenin cendere bezine aktarılması ve peynir suyunun süzülmesi:**

Dinlendirilen teleme, teknenin dibinde toplanır. Tekne içinde cendere bezine alınır. Bezdeki teleme suyunu salması için tekne boyunca baskılır ya da küçük işletmelerde cendere bezinin uçları birleştirilerek teknedeki suyun çıkartılır. Peynir suyunun süzülmesi, bazı

mandıralarda cendere bezi ile kazandan alınan teleme, bezle birlikte tavandaki çengellere asılır. Süzme sonrası arta kalan telemeden yapılan peyniri mandıracılar, “askı tulumu” olarak adlandırır. Bazı işletmelerde ise kazanda parçalanan pıhtı, tezgah üzerine serilen cendere bezlerine alınır ve üzerine ağırlık koyularak baskılanır. Bu şekilde peynir suyunun uzaklaştırıldığı peynire de “baskı tulumu” denir.

### **Taze peynirin kalıplar halinde kesilmesi, fermantasyon ve tulumlara ya da tenekelere yerleştirilmesi:**

Teknede peynir suyundan yeterince arındırılan teleme, kalıplar halinde kesilir. Ön olgunlaştırma yapılarak asitliğinin artması sağlanır ya da peynir suyunun süzülmesinin ardından tezgah üzerine aktarılır, iri parçalar halinde kesilir ve soğuması için üstüne temiz soğuk su dökülür. Ardından her bir parça 250–1500 gram arasında olacak şekilde tekrar kesilir. Önceden hazırlanmış, kılları kesilip yıkanmış olan keçi deri tulumlarının kıllı taraflarına bir sıra yerleştirilir. Üzerine iri taneli, yıkanmış kaya tuzu serpilir. Tulum ağzı dolduruluncaya kadar bu işleme devam edilir. Dolan tulumun ağız kısmına da bolca tuz serpilir. Kalıplarını tulumda boşluk yaratmamasına dikkat edilir ve tulumun ağzı kapatılır. Eğer teneke tulumu üretilecekse, peynir suyunun uzaklaştırılmasının ardından elde edilen teleme iri kalıplar halinde kesilir. Kaya tuzundan hazırlanmış salamurada 1 gün bekletilip tenekelere yerleştirilir, kalıplar arasına da kuru tuz serpilir, üzerleri örtülerek 1–2 gün bekletilir. Salamura ilave edilip üzerleri kapatılır ya da bir tekneye bir kat peynir, üzerine bir miktar tuz olmak üzere yerleştirilerek fermantasyona bırakılır. Bu süre 1–3 gün kadardır. Bu süre esnasında peynirler zaman zaman ters çevrilir ve gözeneklerin oluşması sağlanır. Daha sonra peynir kalıpları tenekelere yerleştirilir ve birkaç gün dinlendirilir. Bu arada tenekede oluşan su süzülerek uzaklaştırılır. Ardından salamura doldurulup ağzları kapatılarak 4–6°C’de 3.5–4 ay olgunlaştırılır.

### **Doldurulan tulumların depolanması:**

Yukarıda belirtildiği gibi doldurulup ağzları bağlanan tulumlar, oda sıcaklığında 1–2 hafta bekletilir. Böylece ön olgunlaşan peynirler, daha sonra soğuk hava deposuna taşınırlar. Soğuk hava deposundaki tulumlar 1–1.5 ay sonra kontrol edilirler. Tulumdaki peynir, genellikle önceden oluşan salamuranın tamamını çeker, salamuranın bir bölümü de tulumdan sızabilir. Kontrol aşamasındaki peynirlerin sertlik derecesine bakılır ve buna göre tulumla salamura eklenir.

**Randıman:**

Salamura tulum peynirlerinde randıman, özellikle üretimde kullanılan sütün kuru madde oranına bağlıdır. Genellikle, 1 kilo tulum peyniri için 4.5–5.0 litre koyun sütün, 5.5–6.0 litre keçi sütün ve 8–9 litre inek sütün gereklidir. Kuru ve salamuralı tulum peynirlerinin ortalama % bileşenleri tablo 1’de verilmiştir.

Salamura tulum peyniri üretim tarihinden itibaren en az 90 gün olgunlaşma süresini tamamladıktan sonra piyasaya sürülmelidir (26).

Bu şekilde üretilmiş olan İzmir Tulum peynirinin TSE tarafından belirlenmiş sınıflandırmaları şu şekildedir:

Duyu özelliklerine göre;

- a) Birinci sınıf
- b) İkinci sınıf olmak üzere 2 sınıftır.

İçermiş olduğu sütün yağ miktarına göre;

- a) Tam yağlı
- b) Yağlı
- c) Yarım yağlı
- d) Az yağlı (yavan) olmak üzere 4 tiptir.

Sütün yağ miktarı, katı maddede, tam yağlı salamura peyniri için kütlece en az % 42, yağlı salamura peyniri için kütlece en az % 30, yarım yağlı salamura peyniri için kütlece en az % 20 ve az yağlı (yavan) salamura peyniri için kütlece en çok % 20 olmalıdır (26).

Bazı kimyasal özellikleri bakımından ise;

- Rutubet, kütlece en çok % 50,
- Titrasyon asitliği laktik asit cinsinden en çok % 3 olmalıdır.
- Ağır metallerden kalay 250 ppm, kurşun 0.3 ppm ve cıva 0.03 ppm’den fazla olmamalıdır (26).

**Tablo 1:** Kuru ve salamuralı tulum peynirlerinin ortalama % bileşenleri (24).

Unsur	Miktar %	
	Kuru	Salamuralı
Rutubet	37.9	42.9
Yağ	28.7	28.7
Protein	26.1	21.2
Tuz	5.2	5.8
Saf kül	2.1	1.4

### **Laktik Asit Bakterileri ve Laktokoklar**

Gıda maddelerinin fermantasyon işlemine tabii tutularak işlenmesi çok eski dönemlerden beri bilinen ve kullanılan bir tekniktir. Et, süt, bitkisel ürünler, balıklar, sebzeler ve unlu mamullerin dayanımını, lezzetini ve besleyici değerini artırmak amacıyla dünyanın her yerinde değişik fermantatif bakterilerden yararlanılmaktadır (32). Fermente süt ürünlerinden yoğurdun fermantasyonunda *S. salivarius* subs. *thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* kullanılırken; tereyağlarında *L. lactis* subs. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Ln. mesenteroides* istenilen diasetil aromasının oluşması amacıyla kullanılmaktadır. Peynirlerde ise *L. lactis* çok büyük ekonomik öneme sahip bir türdür (33). Laktokokların, özellikle de *L. lactis* subsp. *cremoris*'in önemliliği, aroma oluşturma metabolizmasında üstünlüğündendir (6,34).

Laktokoklar önceleri streptokok cinsinde sınıflandırılıyordu ve maltoz fermantasyonundaki farklılık göz önüne alınarak *S. lactis* ve *S. cremoris* olmak üzere iki türe ayrılmıştır (9). Laktik streptokoklar olarak adlandırılan bu suşlar arasında (6) pH 9.2'de, 40°C'de ve % 4 NaCl'de gelişebilmeleri açısından farklılıklar tespit edilmiştir. En sonunda, arjininden amonyak oluşturulması bu iki türün ayırt edilmesinde (alttür *cremoris* arjinini kullanmaz) bir kriter olarak kabul edilmiştir. Ayrıca bazı *S. lactis* suşlarının süt ürünlerinde lezzet oluşumunda önemli bir özellik olan sitratı, asetoin, diasetil ve CO<sub>2</sub>'e metabolize etme yeteneğinde olduğu anlaşılmıştır (9,35).

Bu laktik streptokoklar üzerine yapılan nükleik asit tabanlı testler neticesinde Schleifer ve arkadaşları (21) "*Lactococcus*" adı altında yeni bir soy oluşturulması gerektiğini önermişlerdir. Bu hücreler, küre ya da oval olup 0.5–1.2 x 0.5–1.5 µm büyüklüğündedir. Sıvı besi yerlerinde çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunurlar. Gram

pozitif olup endo spor oluşturmazlar. Hareketsiz ve kapsülsüzdürler. Fakültatif anaerobturular. Fermantatif metabolizma ile birtakım karbonhidratları fermente eder ve başlıca L(+)- laktik asit oluştururken gaz oluşturmazlar. Katalaz ve oksidaz negatiftirler. Optimal gelişme ısısı 30°C olup 10°C'de gelişebilirken 45°C'de gelişmemektedirler. Genellikle Lancefield serolojik Grup N'de yer almaktadırlar.

*Lactococcus* cinsi, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinsleri ile birlikte LAB grubunda yer almaktadır (8,36,37).

Homofermantatif ya da heterofermantatif metabolizmaları sırasında laktik asit üretebilme yeteneğindeki bir grup mikroorganizma olan LAB (6,7), Gram pozitif, düşük guanin (G) ve sitozin (C) bazlarına sahip katalaz ve oksidaz negatif, spor oluşturmeyen ve nitratı nitrite indirgemeyen mikroorganizmalardır (7,38–40). Bunlardan başlıca *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* ticari starter kültür olarak kullanılmaktadır (41). DNA'sında % 55 G + C içeriği bulduran Bifidobakterilerin bu özelliği bakımından LAB grubunda yer almadığına (36,42) ve diğer özellikleri bakımından LAB benzediği için bu gruba dahil eden bildirimlerin bulunmasına rağmen (41,42) bifidobakteriler, “*Actinomyces*” grubuna dahil edilmektedir (36,42). Bir mikroorganizmalar grubu olarak LAB deyimi 1900'lerin başlangıcında kullanılmaya başlanmıştır. Bu konuda ilk önemli çalışmalara 1857 yılında Pasteur'ün laktik asit fermantasyonu üzerinde çalışmaya başlaması ve bunu Lister'in 1873 yılında *Bacterium lactis* olarak adlandırılan ilk saf bir bakteriyel kültürün izolasyonu izlemiştir. Peynir için ise starter kültür kullanımı ilk olarak 1890 yılında Weigman tarafından Kopenhag'ta uygulanmıştır. LAB'nin ilk olarak bir grup altında toplanması sütü fermente ve koagüle etmesi yetenekleri göz önüne alınarak yapılmış ve bu gruba koliformlar da dahil edilmiştir. 1901 yılında Beijerinck tarafından laktobasillerin Gram pozitif olarak belirlenmesi üzerine koliformlar LAB grubundan ayrılmıştır. 1919 yılında Orla-Jensen'e göre “Gerçek Laktik Asit Bakterileri” adı altında tanımlamaları yapılmış (tablo 2) ve bunların, Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen rod veya kok şeklinde olduğu bildirilip karbonhidratları başlıca laktik aside fermente ettikleri ifade edilmiştir (36,42). LAB içinde kuşkusuz büyük önemi olan türler, *S. thermophilus*, *L. lactis*, *Lb. helveticus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'tur (43).



**Tablo:2** LAB'nin Orla-Jensen'e göre sınıflandırılması (36).

Soy	Katalaz	Şekil	Fermantasyon	Şimdiki Sınıflandırma
Betabacterium	-	Rod	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
Thermobacterium	-	Rod	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
Streptobacterium	-	Rod	Homo-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
Streptococcus	-	Kok	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
Betacoccus	-	Kok	Hetero-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
Microbacterium	+	Rod	Homo-	<i>Brochothrix</i>
Tetracoccus	+ -		Homo-	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

\* : Bazı Pediokoklar, pseudokatalaz üretme yeteneğinde olup yanlış pozitif reaksiyon

verebilmektedirler.

LAB, asidofilus süt, yoğurt, yumuşak ve sert peynirlerin yapımı gibi süt ürünlerinin yapımında starter kültür olarak kullanımında başrol oynayan mikroorganizmalardır. Bu laktik organizmalar ayrıca etlerde, alkollü içeceklerde ve sebzelerde de ticari suş olarak kullanılmaktadır. Bu grup organizmalar, glukozu fermente etme esasına ve fermantasyonlarına göre oluşturdukları son ürünler baz alınarak başlıca homofermantatif ve heterofermantatif olarak 2 kısımda incelenmektedir. Homofermantatif olanlar, glukozun fermantasyonunda başlıca son ürün olarak laktik asit oluştururken heterofermantatif olanlar, laktik asidin yanı sıra karbondioksit, asetik asit ve etanol oluştururlar. Homofermantatif olanlar, aldolaz enzimine sahip oldukları için heterofermantatif olanlara nazaran direk olarak laktik asit oluşturabilmektedirler. Heterofermantatif olanlar ise 6 karbonlu şekerleri (heksoz), 5 karbonlu şekerlere (pentoz) dönüştüren ve bu arada aldehit ve diasetil gibi aroma bileşiklerinin oluşmasını sağlayan fosfoketolaz enzimine sahiptir (7). Bazı homofermantatif ve heterofermantatif LAB, tablo 3'te belirtilmiştir.

**Tablo 3:** Homofermantatif ve Heterofermantatif Laktik Asit Bakterileri (66).

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

Pediokoklar, diğerk homofermantatif LAB'den sıvı besi yerlerinde dominant olarak L(+) ve DL laktat oluşturmasından ve laktokoklardan da Lancefield Grup N streptokok antiserumları ile reaksiyon vermemesiyle ayırt edilebilmektedir. Birçok LAB, asidotoleranttır. pH 4.5 laktobasiller ve pediokoklar ile leukonostokların ayırt edilmesinde kriter olabilmektedir. Bu pH'nın altında laktobasiller ve pediokoklar üreyebilirken leukonostoklar üreyememektedir (7). Sütün fermantasyonunda *L. lactis*, süt pH'sı 4.5 oluncaya kadar gelişir. Bu noktadan sonra gerek düşük pH'nın etkisi gerekse de yüksek laktat konsantrasyonu sonucu *L. lactis*'in gelişmesi durmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda laktokokların düşük pH'larda yaşamlarını devam ettirmelerini sağlayan "asit tolerans cevap" sistemine sahip olduğu bildirilmiştir (44,45). Düşük pH ve yüksek NaCl gibi kendilerine aleyhine olan şartlara karşı, kendilerini bu şartlara çabuk adapte edebilmekte ve metabolizmasını değiştirebilmektedir (34,46). LAB, diğerk peynir bakterilerine göre daha yüksek bir minimal  $a_w$  değerine sahiptir. *L. lactis*, *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* ve *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* için bu değerler sırası ile 0.93, >0.98, >0.96 ve 0.96'dır (46).

Peynirde bulunan başlıca LAB, laktokoklar, leukonostoklar, enterokoklar ve homofermantatif ya da heterofermantatif laktobasillerdir. Gram pozitif, katalaz negatif, arjinini hidrolize edemeyen heterofermantatif koklar *Leuconostoc*, Gram pozitif, katalaz negatif rodlar ise *Lactobacillus* olarak kabul edilebilmektedir (40).

*Lactococcus* cinsi, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* ve *L. raffinolactis* olmak üzere 5 tür içermektedir (10,38,42). *L. lactis* suşları arasından da sadece *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* peynir, yoğurt, tereyağı gibi fermente süt ürünleri yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadır (10).

Mevcut taksonomik verilere göre *L. lactis* türünün altında *lactis*, *cremoris* ve *hordniae* alttürleri olmak üzere üç adet alttür bulunmaktadır. Bu alttürlerin zaman içinde değişen isimlendirilmeleri şekil 1'de verilmiştir. Bunlardan ilk ikisi özellikle süt endüstrisi açısından önem arz etmekteyken sonuncu türün insektlerde bulunduğu rapor edilmiştir (38). *L. lactis* subsp. *lactis*, riboz, laktoz, maltoz, trehaloz ve eskulin fermantasyonlarını ve arjininden amonyak oluşumunu gerçekteştirebilirken, *L. lactis* subsp. *cremoris*, sadece laktoz fermantasyonunu sağlayabilmektedir (47). *L. lactis* subsp. *lactis* ile *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarının birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılan fenotipik özellikler, pH 9.2'de, 40°C'de ve % 4 tuz varlığında gelişme durumları olarak sıralanmaktadır (1,48). Bunun yanı sıra *L. lactis* subsp. *lactis* çok çeşitli çevreden izole edilebilirken, *L. lactis*

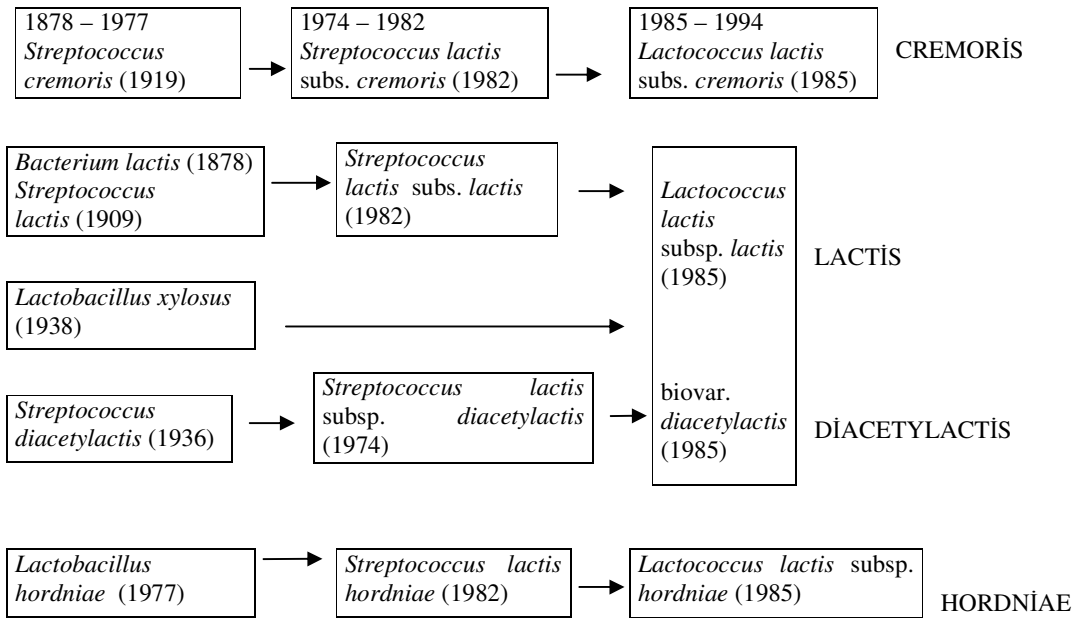
subsp. *cremoris* sadece süt ile ilgili çevreden, özellikle de fermente süt ürünlerinden izole edilebilmektedir (1). *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* için doğal ortamlarının yeşil bitkiler olduğu bildirilmektedir (48). Chen ve arkadaşları (49) *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını topraktan da izole etmişlerdir. Nomura ve arkadaşları (50) *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*'i hem bitkilerden hem de süttten izole ederken *L. lactis* subsp. *cremoris*, sadece süttten izole edilebilmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* ise cottage peynirinin, kremanın ve tereyağının aromasına katkıda bulunmaktadır (48,51). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, sitratı kullanan bir LAB'sidir. Sitratın kullanılması ile birlikte CO<sub>2</sub> ve diasetil oluşmaktadır. Oluşan CO<sub>2</sub> ile bazı ürünlerin tekstürüne, diasetil ise aromaya katkıda bulunmaktadır (51). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*'ten sitrattan karbondioksit oluşturması ile ayırt edilebilmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*'in her ikisi de arjinini kullanır. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, arjinini hidrolize ettiğinde daha yoğun bir şekilde amonyak oluşturabilmektedir (7).

Süt, ortalama 1750 mg/l miktarında sitrat içermektedir. Bunun çok büyük bir kısmı çözülmüş olduğu için peynir altı suyu ile bir miktar kaybolmaktadır. Peynir pıhtısındaki sitrat miktarı, peynir altı suyundakine oranla yaklaşık 3 kat daha fazladır. Cheddar peyniri ortalama % 0.2–0.5 düzeyinde sitrat içermektedir. Sitrat, mezofil starter kültürlerince yapılan birtakım ürünlerde aroma bileşiklerinin öncüsüdür. Sitrat, bir sitrat transport plazmidi içeren *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* tarafından metabolize edilebilmektedir. *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* ve *Ln. lactis* de sitratı metabolize edebilmektedir. Sitrat, diğer LAB tarafından metabolize edilememektedir. Sitrat metabolizması sonucu oluşan CO<sub>2</sub>, küçük gözeneklerin ve diasetil de aromanın oluşmasından sorumludur (52).

*Lactococcus garvieae* ve *L. piscium*, balıklarda yer alan önemli zoonozlardır. *L. garvieae* ayrıca sığır mastitisleri ile insan enfeksiyonlarından sorumlu tutulmuştur. Çalışmalar, *L. garvieae* ile *Enterococcus seriolicida*'nın benzer olduğunu göstermiştir. *L. plantarum* izolatları, erimiş dondurulmuş bezelyelerin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. *L. raffinolactis*, pastörize edilmemiş sütlerden, havuçlardan, kaz ve sığır gastro–intestinal bölgelerinden ve süt çiftliği ile ilgili çevreden izole edilmiştir (38). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* Voges–Proskauer reaksiyonu ile sitrattan asetoin oluşturabilmektedir. *L. raffinolactis* ise rafinoz ve sorbitolden asit oluşturabilirken, arjinini hidrolize

edememektedir (40). *L. raffinolactis*, laktokoklar içinde % 40–43 ile en yüksek G + C nükleik asitlerine sahiptir (20).

Poznanski ve arkadaşları (53) çiğ süttten, Fortina ve arkadaşları (54) peynirden *L. garviae* suşları izole etmiş, Poznanski ve arkadaşları (53) bu süttten yapılan peynirlerin birinci gününde ise bu suşa rastlayamamıştır. *L. garviae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum* ve *L. hordinae* fermente süt teknolojisinde kullanılmamaktadır. *L. garviae*, *L. lactis* subsp. *hordniae* ve *L. raffinolactis*'ten sadece *L. raffinolactis* rafinozu fermente ederken diğer ikisi arjinini hidrolize eder. *L. hordiae*'de galaktoz, laktoz, maltoz, riboz negatiftir. *L. raffinolactis* diğer laktokoklardan melibiyoz ve rafinozu fermente etmesiyle ayırt edilmektedir. *L. plantarium*, salisin, sükroz, sorbitol, trehaloz, mannitol, ve melezitoz gibi karbonhidratları fermente etmektedir. *L. plantarium* ve *L. piscium*'un her ikisi de melezituzu fermente eder fakat *L. piscium*, *L. plantarium*'dan melibiozu fermente etmesiyle ayırt edilmektedir. *L. plantarium* diğer laktokoklardan melezitoz ve sorbitolu fermente etmesiyle ayırt edilebilmektedir (7).



Şekil 1: *L. lactis*'in sınıflandırılmasına tarihsel bir bakış (55).

Laktokokların izolasyon ve identifikasyonlarında çok çeşitli moleküler tekniklere başvurulmuştur (10,38,56). Bunlar arasında, Sodyum dodesil sülfat (SDS)–Poliakrilamid jel elektroforez ve spesifik problemler ile DNA hibritlemesi, plazmid dijestiyon örnekleme,

rRNA analizleri, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment–Length Polymorphism (RFLP), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) ve PZR kökenli olmayan bir teknik olan Floresans in situ hibridizasyonu (FISH) yer almaktadır. Bu gibi metotlar, iyi kontrol altındaki çalışmalarda kullanışlıdır ve yüksek sayıdaki izolatların izlenmesinde uygundur. Bununla birlikte bu teknikler, standardize olamamış veya çalışılan izolatların sayısı düşük olduğu veya nadiren çalışılacağı durumlardaki tarım, endüstri, veteriner ya da medikal laboratuvarlarında uygun olmamaktadır. Bu gibi durumlarda Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çalışmaların daha uygun olduğu bildirilmiştir (38,57–65).

### **Laktokokların Süt Endüstrisindeki Yeri ve Önemi**

Laktokoklar süt ürünlerinin fermantasyonunda özellikle de birçok peynir çeşidinin yapımında ve olgunlaşmasında endüstriyel bazda önem arz eden mikroorganizmalardır (9,12,15,19,34,35,51,55,59,67,68). Peynir teknolojisi açısından bu familyanın içerisinde yer alan *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* teknolojik öneme sahip mikroorganizmalar olarak tanımlanmışlardır. Bu şekilde tanımlanmalarında; aroma oluşturma yeteneğinde olması (15, 42,69–84), bakteriyosin (8,42,85–90) ve ekzopolisakkarit (EPS) oluşturmaları (91–99), bakteriyofajlara olan dirençliliği (6,19,42,68,82,98,100–106), laktoz ve sitrat metabolizması (19,102), endotoksin üretmemeleri (107), invaze–kolonize olmama (86) özellikleri, strese yanıtları, antibiyotik ve ağır metallerle dirençliliği (68) olarak sıralanabilmektedir. Laktokoklar 2–11 arasında plazmid içermekle birlikte (42) bu sayı genellikle 4–7 arasında ve büyüklükleri 2–80 kb (19,102) ya da 3–130 kb arasında değişmektedir (42). Laktokokların laktoz fermantasyonu, proteoliz, diasetil oluşturulması ve faj dirençliliği gibi moleküler fonksiyonları işte bu plazmidlerde kodlanmıştır (108).

### **Asidifikasyon Özellikleri**

Mezofilik özelliğe sahip bu mikroorganizmaların peynirlerin olgunlaşmasındaki birincil rolleri laktik asit üreterek asidifikasyonu sağlamaktır (4,16,48,81,82,109–113). Sütteki laktozu kullanarak başlıca L(+) laktik asit ve ayrıca kullanılan suşun niteliğine göre sitratın parçalanması sonucu asetaldehit, diasetil ve asetoin gibi aromatik ürünler açığa çıkaran bu mikroorganizmalar, sağladıkları asit ortam dolayısıyla istenmeyen

mikroorganizmaların üremesini engellerler ve güvenilir ürün üretimine katkıda bulunurlar (114,115). Starter bakteriler, 6.6 olan normal pH'ı 30–37°C'de, 6 saat içinde, 5.3 ve altına düşürebildiği takdirde iyi bir izolat olarak kabul edilebilmekte (46,116) ve bu kültürler, üretimin ilk birkaç saati içinde ortalama  $10^8$  kob/g düzeyinde olabilmektedir. Bu bağlamda starter kültür olarak kabul edilen soylar; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus*'tur. *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* mezofilik; *S. thermophilus* ile *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *Lb. helveticus* termofilik suşlara örnektir (46,117). Ballesteros ve arkadaşları (109) izole ettikleri başlıca mikroflorayı ve bu floranın içinde de en güçlü asit üreticisi ve proteolitik aktivitedeki mikroorganizma türü olarak laktokokları tespit etmişlerdir. Herreros ve arkadaşları (110) rastgele seçtikleri 31 suşun 8'ini *L. lactis* subsp. *lactis*, 4'ünü *L. lactis* subsp. *cremoris*, 2'sini ise *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* olarak tespit etmiştir. Asitleştirme özellikleri bakımından *L. lactis* subsp. *lactis*, en yüksek kapasitede olduğu tespit ettiklerini bildirmiştir. Peynir starterlerinin büyük kısmı termofilik ve mezofilik LAB karışımlarından oluşmaktadır (93).

### **Proteoliz ve Aroma Oluşturma Etkisi**

Birçok peynir çeşidinin olgunlaşması sırasında en kompleks, belki de en önemli biyokimyasal olay proteolizdir. Sütün kendi proteazları, süt koagulantları ve sütte doğal olarak bulunan ya da starter olarak ilave edilen mikroorganizmalar sayesinde kazein, peptidlere ve serbest amino asitlere hidrolize olur. Bu proteolitik ürünler, direkt peynir aromasını sağlar ya da peynir aromasının gelişmesine öncü olur (67). Laktokoklar sahip oldukları proteaz ve aminopeptidazlar sayesinde, süt proteinlerini birinci aşamada oligopeptidlere, ardından di-tri peptidlere daha sonraki basamaklarda ise amino asitlere ve daha alt birimlere parçalayarak ürünün olgunlaşmasını ve istenen aromanın şekillenmesini sağlarlar (3,74,84,118). Bu proteolitik süreçte, starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların proteinazları ve peptidazları ile, yaklaşık olarak % 6–10 oranında residü olarak bulunan rennet ile endojen süt proteazları ve plasmin de önemli bir rol oynamaktadır (74). Lezzet oluşumunda önemli bileşiklerden olan dallı zincirli aldehit bileşiklerinin oluşumu, alfa-keto asit dekarboksilaz olarak bilinen ve bazı *L. lactis* suşlarında tespit edilen bir transaminaz tarafından sağlanmaktadır (119–125). Bir amino grup alıcısı olan  $\alpha$ -ketoasit varlığında gerçekleşen bu reaksiyon, laktokoklar, mezofilik laktobasiller ve termofilik LAB'de gösterilmiştir.  $\alpha$ -ketoglutarat, *L. lactis* tarafından gerçekleştirilecek amino asit transaminasyonu için en iyi  $\alpha$ -ketoasit alıcısıdır (120,121).

Pirüvat gibi diğer  $\alpha$ -ketoasitler de kullanılabilen fakat bu durumda amino asit transferaz aktivitesi 40 kat daha düşük olmaktadır. Bazı laktobasiller için de pirüvat çok daha iyi bir  $\alpha$ -ketoasit alıcısı olabilmektedir (121).

Bakteriyel otoliz, otolizin olarak adlandırılan endojen peptidoglikan hidrolazların hücre duvarını enzimatik olarak yıkımlanması olarak tanımlanmaktadır (126). Laktokok suşları hayli yüksek düzeyde otolitik olmalarından dolayı peynirlerin olgunlaşmasında yararlı etkileri vardır (14,15,67,126–129). Peynirde starter kültür olarak bulunan laktokokların otolize olması dolayısı ile peynir aromasında olumlu etkileri olan peptidazlar ve diğer hücre içi bileşikler olgunlaşma sırasında serbest kalmaktadır. Bakteriyel peptidoglikan hidrolazları (otolizinler) hücre duvarının peptidoglikan yapısını yıkımlayarak hücre lizisine sebep olmaktadır (14).

Amino asitlerin laktokoklar tarafından yıkımlanmasında 2 yol belirlenmiştir. Birincisi, başlıca metiyonin aminoasidinde belirlenmiş olup amino asit liyazları tarafından bir eliminasyon reaksiyonu ile başlatılır ve sonuçta başlıca sülfürlü aroma bileşiği oluşmaktadır. İkincisi ise, başlıca aromatik amino asitler, dallı zincirli amino asitler ve metiyoninde gözlemlenen aminotransferazlar tarafından katalize edilen bir transaminasyon ile başlatılmaktadır. Sonuç olarak,  $\alpha$  -ketoasitler daha sonrasında aldehitlere, alkollere, karboksilik asitlere, esterlere, metanetiollere ve diğer sülfür bileşiklerine indirgenmektedir (127).

Genellikle, LAB tarafından kazeinin kullanılması hücre dışı proteinazları tarafından başlatılır ve sırasıyla oligopeptidler ve bu oligopeptidlerin de özel peptid transport sistemleri ile hücre içine alınarak hücre içi peptidazları tarafından daha küçük yapıları peptidler ve amino asitler oluşturulur (43). *L. lactis* dışında *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Propionibacterium* soyları da güçlü aroma oluşturma yeteneğindedir (83).

Çiğ süttten yapılan peynirler, pastörize süttten yapılanlara göre daha kısa sürede olgunlaşmakta ve daha keskin bir aromaya sahip olmaktadır. Bunun altında da pastörizasyon ile süttün endojen mikroflorasının, birtakım endojen enzimlerinin kısmen ya da tamamen etkilenmesi ya da peynir suyu proteinlerinin az da olsa denatüre olmasından kaynaklanmaktadır (109,130–132). Bununla birlikte pastörize edilip starter kültür kullanılarak yapılan peynirler daha üniform bir yapıya ve aromaya sahiptir (57,130). Bu aromanın oluşması kompleks bir yapıdır ve peynirin olgunlaşması, süt bileşenlerinin kimyasal ve biyokimyasal değişimlerini izleyen uzun bir süreci içermektedir. Aroma bileşikleri, laktoz ve sitrat (glükolik ve sitrat metabolizması), yağ (lipoliz) ve kazein (proteoliz) dönüşümlerinden oluşa gelmektedir (70,72,75,77–79,133). Laktoz, LAB



tarafından başlıca laktata dönüştürülmesine rağmen, ara ürün olan pirüvat, diasetil, asetoin, asetaldehit ya da asetik asit gibi çeşitli aroma veren bileşikleri açığa çıkarabilmektedir. Lipoliz, metil ketonlar, alkoller, laktonlar ve esterler gibi aroma bileşiklerinin öncüsü olan serbest yağ asitlerinin oluşması ile sonuçlanır. Lipoliz başlıca maya ve küf çok daha az olarak da LAB tarafından meydana gelmektedir. Yağ hidrolizi, Camembert ve Blue peynirleri gibi yumuşak peynirlerde önemlilik arz etmektedir (70). Proteoliz ise birçok peynirin özellikle de yarı sert ve sert peynirlerinin aromasının ve tekstürünün oluşmasında kuşkusuz en önemli süreçtir (67,70,72,73,109,134). Rennet enzimlerinin aktivitesi ile kazeinin degradasyonu ve LAB proteinazları ve peptidazları ile küçük peptidler ve serbest amino asitler meydana getirilir. Proteoliz ve peptidoliz arasındaki güzel bir denge peynirde acı aromanın önüne geçmektedir (70). Bu reaksiyonlardan özellikle kazeinin proteolizi en önemli reaksiyondur. Çünkü proteoliz, çeşitli alkoller, aldehytler, asitler, esterler ve sülfür bileşikleri gibi aroma oluşturan bileşiklerin başlıca öncüsüdür (43).

Öner ve arkadaşları (30) tulum peynirlerinde tiramin ve triptamin düzeyleri hakkında yaptıkları çalışmada, substratın pH'sı, tuz içeriği, sıcaklık ve piridoksal fosfat varlığı gibi uygun ortam bulunduğu biyojen amin üreten türler arasında laktokokların da olduğunu bildirmiştir.

Tulum peynirinde bulunan aroma maddelerini araştıran Hayaloğlu ve arkadaşları (22) asitlerden; etanoik ve butanoik asitleri, esterlerden; başta etil ester olmak üzere propil ve butil esterleri, metil ketonlardan; 2-butanon ve diasetili, alkollerden; etanol, metil propanol, metil butanol, butanol, pentanol, metoksi propanol ve fenetil alkolü, sülfür bileşiklerinden; dimetil sülfid ve dimetil sülfonu, terpenlerden;  $\alpha$ -pinene, carane ve *p*-cymene'i dominant olarak bulmuşlardır. Düşük miktarlarda da fenolik bileşikler, hidrokarbonlar, *p*-metil anisol, benzen, toluen, stiren, dietil eter, kloroform ve bromoform tespit edilmiştir.

### **Ekzopolisakkarit (EPS) Oluşturma Özellikleri**

Bazı LAB'nin sütte fermantasyon sırasında EPS oluşturma yetenekleri, süt endüstrisi için önemli bir özelliktir. Çünkü süt ürünlerinde bu biyopolimerler, vizkozitenin, tekstürün ve ağızda bıraktığı hissin geliştirilmesinde etkilidirler (91). Bazı bakteriler, enerjisinin % 70'in, çevre şartlarına karşı önemli fonksiyonu olan EPS oluşturmak için kullanmaktadır (98). Birçok bakteride olduğu gibi LAB; kurumaya, fagositoza, faj ataklarına, antibiyotiklere ve toksik bileşiklere karşı kendisini koruduğuna inanılan EPS oluşturabilmektedir (93,98). Bu EPS, ya besi yeri vasatlarında çamurumsu-

sümüğümsü formda salgılanır (rop benzeri form) ya da bakteri hücre duvarına bağlanmış şekilde kalmaktadır (kapsüler form). Bu maddelerin, hem teknolojik hem de sağlık yararına özellikler taşıdığına inanılmaktadır. Süt endüstrisinde, EPS oluşturan LAB, su kaybını arttırarak peynir altı su miktarının azaltmasını sağlarlar. Bu arada EPS, sağlık yararına olumlu etkiler verebilmekte ve prebiyotik olarak kabul edilmekte ve antitümöral, bağışıklık sistemini uyarıcı, kolesterol düşürücü ve antimutajenik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. EPS oluşturan termofilik LAB başlıca *Streptococcus* ve *Lactobacillus* soylarına aittir (93). EPS oluşturan mezofilik suşlar grubuna dahil olan *Lactococcus* türleri, yumuşak ve sert peynirlerin yanı sıra özellikle yarı sert peynirlerin yapımında kullanılmaktadır (58,68,70,72,81,93,119,134). Tulum peyniri yarı sert bir peynir türüdür (23,25,27,29–31,135). EPS, muhtemel başka görevleri, hücreyi katyonlardan korumak, adezyonu sağlama ve biofilm oluşturma olarak bildirilmektedir (98). LAB'ince oluşturulan EPS, ortamdaki şeker kompozisyonuna bağlı olmaktadır. EPS üretimi, ortam kompozisyonuna (karbon/nitrojen kaynakları), kültür şartlarına (pH, sıcaklık, O<sub>2</sub> konsantrasyonu) ve LAB suşunun tipine bağlı olarak değişmektedir. Bu karbon/nitrojen oranı ya da bu maddelerin yetersizlikleri, aynı suşların kullanılması durumunda bile farklı EPS üretimine neden olmaktadır (91). *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ4010 suşu tarafından oluşturulan EPS, glukoz, ramnoz, galaktoz ve fosfatı sırasıyla 2:2:1:1 oranlarında içermektedir (98).

*L. lactis*'te EPS üretimi, spesifik *eps* genleri tarafından 20 kb'dan büyük plazmidlerde kodlanmış olup bu özellik konjugasyon yolu ile aktarılabilmektedir (136).

### **Bakteriyosin Oluşturma Özelliği**

Bakteriyosin üreten LAB, peynirlerde istenmeyen mikroorganizmaların kontrol altına alınmasında etkili rollere sahiptir (137). Bakteriyosinler, mikroorganizmalara karşı bakterisidal etki gösteren protein benzeri antagonist bileşiklerdir (85,88,138–140). LAB tarafından oluşturulan ve lantibiyotik adı verilen antimikrobiyel bileşikler başlıca 3 kısımda incelenmektedir: Lantibiyotikler (Sınıf I), lantibiyotik olmayan ve ısıya düşük dayanıklılık gösteren peptidler (Sınıf II) ve ısıya oldukça duyarlı olan protein (Sınıf III) şeklinde sıralanmaktadır (8). Bu bağlamda endüstriyel olarak en önemlilerinden biri, bazı *L. lactis* suşlarınca oluşturulan nisindir (141,142). Nisin, içinde *Listeria monocytogenes*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* ve *Lactobacillus* gibi patojenlerin ya da bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların yer aldığı birçok Gram pozitif bakterilere karşı aktiftir (8,85,137). Nisin için *nisA*, *nisB*, *nisC*, *nisT*, *nisI*, *nisP*,

*nisR*, *nisK*, *nisF*, *nisE* ve *nisG* sırasında 11 tane gen sırası tanımlanmıştır. Nisin, *nisA* ile kodlanmış 57 amino asitten oluşan prepeptid ve 34 amino asitten oluşan katyonik, hidrofobik bir propeptiddir (86,143).

Lactococcin Q, lactococcin A, lactococcin B, lactococcin M, lactococcin 972, LsbA, ve LsbB, sadece *L. lactis* suşlarına karşı aktiftir. Bunlar sadece laktokokların ve çok az düzeyde bazı soyların gelişimini inhibe etmektedir (138).

Nisin, bakteri hücreleri üzerine porlar oluşturacak şekilde etkimektedir. Bu da iyonların ve küçük moleküler ağırlıktaki moleküllerin hücreden ayrılmasına ve sonuçta membran potansiyelinin çöküşüne ve proton teşvik edici sistemin etkisizleşmesine neden olmaktadır (8,86,89). Bu lantibiyotik, etkili bir por oluşumu için hedef membranda kenetleneyeceği molekül olarak lipid II'yi kullanmaktadır. Nisinin lipid II'e tutunması ile ayrıca bakteri hücre duvarı sentezi de inhibe olmaktadır. Bu da bakteri hücrelerinin ölümüne sebep olan bir diğer olaydır. Nisine karşı geliştirilen dirençlilik, fosfolipidlerin yağ asitlerinin kompozisyonunda ya da sitoplazmik membranın fosfolipid kompozisyonunda değişiklik olması ile ilişkilendirilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus bovis*'te bulunabilen lipoteikoik asit, nisine karşı dirençlilikte önemli bir rol oynamaktadır. *Staphylococcus aureus*'da ayrıca, lipoteikoik asit gibi işlev görebilen D-alanil esterler de hücrenin, çeşitli antimikrobiyel peptidlere karşı daha az duyarlı olmasını sağlamaktadır. *S. bovis* hücre duvarında, nisine duyarlı olan bakterilere oranla daha fazla lipoteikoik asit bulunmaktadır. *Listeria monocytogenes*'de nisine karşı kendiliğinden oluşan dirençlilikte ise penisilin bağlayıcı protein düzeyi önemli derecede artmıştır. Bu spontan Nis suşu, penisilin bağlayıcı proteinleri bağlayan diğer beta-laktam antibiyotiklerine karşı duyarlıdır. Bu suş ayrıca nisine benzer bir lantibiyotik olan ve lipid II molekülüne bağlanan mersasidin'e duyarlılıkta da önemli bir düşüş göstermektedir (89). Nisin, por oluşturarak etkisini gösterdiği bakteri hücrelerinde katyonik antimikrobiyal peptidler ile benzerlik göstermektedir. Yapısında lizin ve arjinin gibi katyonik aminoasitleri içermektedir (90). Yapısal olarak subtiline benzer bir polipeptit olan nisin, subtilinden farklı olarak triptofan kalıntılarından yoksun olup (144) 1954 yılında İngiltere'de peynirlerde *Clostridium*'lardan ileri gelen defektlerin önlenmesi için patent almıştır. İlk olarak Hurst tarafından Swiss peynirlerinin *Clostridium butyricum* tarafından bozulmasının önlenmesi için kullanılan nisin (145), Bugün 50'yi aşkın ülkede kullanımına belli dozlarda izin verilen ve E234 olarak simgelenen bir gıda koruyucusudur (8). 1988 yılında FDA (Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç Kurulu) tarafından pastörize peynirlerde nisinin kullanımı onaylanmıştır (85).

Nisin, hidrofobik bir bileşik olup metabisülfid, titanyum oksit ve bir takım proteolitik enzimler tarafından yıkılmaktadır. Gıda koruyucusu olarak kullanılmasındaki avantajları arasında, toksik olmaması, bazı *L. lactis* suşları tarafından doğal olarak üretilmesi, ısıya dayanıklı olması, sindirim enzimleri tarafından yıkılmaması, gıdada kötü kokuya ve kötü aromaya sebep olmaması, dar spektrumlu bir antibiyotik aktivitesinde olması olarak sıralanabilir (144,146).

Nisin, pH 2’de dayanıklıdır. 121°C’de otoklav edilebilir. Alkali şartlar altında stabilitesi bozulmakta, tam olarak inaktivasyonu ise pH 11’de 63°C’de 30 dakikada gerçekleşmektedir. Nisin ve EDTA’nın birlikte Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyel bir etkisi bildirilmiştir (147).

İn vitro çalışmalarda nisin üretimi, durgunluk safhasının ilk aşamasında yani geç ekponensiyal faz ya da erken stasyoner fazda maksimal değerine ulaşmaktadır (85,148,149). Nisin aktivitesi laktozun tamamına yakınının tüketildiği ve pH’nın 5.5 olması durumunda en yüksek seviyede olmaktadır. Maksimal nisin aktivitesi ve laktik asit üretimi için sıcaklığın 31°C olması gerekmektedir. Nisin aktivitesi, laktoz tüketimi ve laktik asit üretimi, önemli derecede besiyerinin başlangıçta içermiş olduğu laktoz konsantrasyonuna bağlıdır. Nisin oluşumunun optimal olması için besi yerinin 30 g/L oranında laktoz içermesi gerekmektedir (85).

Gram pozitif bir bakteri olarak *L. lactis* de nisine duyarlıdır. Nisinin kendi hücre membranlarında por oluşturmasından korumak için, nisin oluşturan suşlar, “nisin bağışıklık sistemi” olarak adlandırılan bir takım proteinleri oluştururlar. Bu sistem, Nis F/E/G ve membran bağlayıcı lipoprotein NisI taşıyıcı komplekslerinden oluşmaktadır (150).

Bakteriyosin oluşturan laktik kültürlerin kullanılması, ortamda bulunan proteolitik, lipolitik bakterilerin lizisine sebep olmakta ve proteolizin daha hızlı ilerlemesine dolaylı yoldan katkıda bulunmaktadır. Bu amaçla *Enterococcus faecalis* ve *L. lactis* subsp. *lactis*’in kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (134).

Gıdaların prezervasyonunda dünyada ve Türkiye’de kullanımına izin verilen antibiyotiklerden biri olan nisinin kimyasal formülü  $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$  olup Gıda Kodeksinde E234 olarak simgelenmiştir (151).

Bazı pediokok suşları tarafından oluşturulan Pediocin PA-1, sınıf II bakteriyosinleri içinde yer alan ve kuvvetli antilisterial aktiviteye sahip bir bakteriyosindir. Laktozu hızlı bir şekilde kullanamadıklarından pediokokların sütte gelişmeleri yavaştır. Bu da genellikle et orjinli olan pediokokların, süt endüstrisinde kullanılmalarını

kısıtlamıştır. Bunun üzerine, pediosin üreten plazmidin *L. lactis*'te klonlanması sonucu pediosin üretme yeteneğinde laktokoklar elde edilmiş, sonuçta da bu bakteriyosini üreten suşlar, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* O157:H7'e karşı antimikrobiyal etki göstermiştir (87,137). Son on yılda *L. lactis*'in genom zinciri belirlenmiş ve *L. lactis*'in heterolog olarak *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* ve *Helicobacter pylori* gibi birçok mikroorganizmaya karşı aşılama çalışmaları yapılmıştır (152). Genetik olarak modifiye *L. lactis* suşları canlı aşılama gibi çeşitli endüstri sahalarında kullanılması planlanmaktadır (107). Laktokoklar üzerine son yapılan çalışmalar ise, invaziv ve patojen olmayan suşlarının mukozal bağışıklığın sağlanması üzerine yoğunlaşmaktadır (153).

### **Bakteriyofaj Dirençliliği**

Bakteriyofajlar, özellikle de peynir endüstrisinde bakteriyel fermantasyonda büyük sorunlara neden olmaktadır (100,154–157). Fajlar, çiğ süt ile ya da hava yolu ile peynirde bulunabilmektedir. Starter kültür bir kez enfekte olursa fajlar hızlı bir şekilde çoğalır, bakteri hücresine her defasında daha şiddetli atak yapar. Bu tip ataklar, ürün kalitesinde düşmeye, fermantasyonun uzamasına ve belki de olmamasına neden olmaktadır (100,157). Sütte ya da peynir altı suyunda bulunan bu fajların inaktivasyonu, ısı ya da yüksek basınç uygulamaları ile minimal düzeylere çekilebilmektedir. Isıya ve yüksek basınca dayanıklı fajlar bulunabilmekte ve bu fajlar, kısa zaman pastörizasyonuna (72–75°C'de 15–30 saniye) dayanmaktadırlar. Bu sebepten dolayı, inaktivasyon kinetikleri genellikle, laktokokal suşlar dikkate alınarak yapılmaktadır (100). LAB fajları özellikle de laktokokal fajlar üzerine yapılan çalışmalar daha çok *Siphoviridae* cinsi ve bu cinste bulunan 12 tip üzerine yoğunlaşmıştır. Bu 12 tip içinde süt endüstrisinde en sıklıkla karşımıza çıkanları ise c2, 936 ve P335 tipleridir (101,155,157–159). Bu kuyruklu fajlar, 17–700 kb büyüklüğünde bir genoma ve 10–800 nm uzunluğunda bir kuyruğa sahiptir (159). *Siphoviridae* cinsi, *Myoviridae* ve *Podoviridae* ile birlikte *Caudovirales* familyasında yer almakta, laktokokal fajların çok daha az önemli kısmını *Podoviridae* cinsi oluşturmaktadır (160).

Fajlar tarafından enfeksiyon, kendileri için ortamda spesifik bir organizma olduğu zaman gerçekleştirilmektedir. Bu spesifite, faj reseptörünün bakteri reseptörü bölgesine uygunluğu bağlamında tam bir kilit–anahtar uyuşması olarak benzetilebilir. Faj adsorpsiyonu için konak reseptör bölgesi genellikle karbonhidratlardan oluşmaktadır (genellikle de ramnoz ve glukoz). Başlangıç adsorpsiyonu ve hücre yüzeyindeki faj

hareketinin “Brownian hareketi” tarzı olduğu ileri sür÷lmektedir. Fajın hücre yüzeyinde absorbe olmasından sonra faj adsorpsiyon proteini ile membran arasında dönüşümsüz bir yapışma olmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* C2 membranı 99 kDa büyüklüğünde bir protein taşımaktadır. Bu protein, c2 faj adsorpsiyon proteini ile bağlanır ve geri dönüşümsüz yapışma gerçekleşmektedir (156).

### **Probiyotik Özellikleri**

Bugünlerde, birçok probiyotik mikroorganizma *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittir. Fakat *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* ve *Propionibacterium* probiyotik mikroorganizma olarak kabul edilen soyları oluşturmakta ve *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da probiotik olarak kabul edilmektedir. Birçok LAB, mide–bağırsak sisteminin asitliğine zayıf dirençlilik göstermesinden dolayı probiyotik olarak kabul edilmemekle birlikte son yıllarda organizmaların probiyotik bakteri olarak kabul edilmesinde β–galaktosidaz enzimine sahip olup olmadığı baz alınmaktadır. *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, bu enzimi salgılamalarından dolayı probiyotik bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir. Vinderola ve Reinheimer (161) laktokokların bu enzime sahip olduklarını tespit edememişler, Ballesteros ve arkadaşları (109) laktokok izolatlarında bu enzimi ya bulamamış ya da zayıf olduğu tespit etmişler ve Herreros ve arkadaşları (110) sadece bir tek *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun β–galaktosidaz aktivite gösterdiğini tespit etmiş ve laktokoklarda bu açıdan dominant enzimin fosfo–β–galaktosidaz–galaktohidrolaz olduğu bildirmişlerdir.

Mide–bağırsak sisteminde uzun süre canlılığını koruyamadığı için laktokokların probiyotik özelliklerinin düşük olduğu bildirilmektedir (162). Bununla birlikte Obodai ve Dodd (163) pH’sı 3.49–4.25 arasında değişen geleneksel bir süt ürününde laktokokları  $10^7$  log<sub>10</sub> kob/ml düzeylerinde tespit etmişlerdir.

Laktokoklar üzerine son yapılan çalışmalar ise mukozal bağışıklığın sağlanması üzerine (86,153) alanin amino asidi ve vitamin folat üretmesi ile fonksiyonel gıdaların formülasyonu üzerine, kimyasal olarak kolitis oluşturulmuş farelerde canlı laktokok hücrelerin etkinliği ve heterolog *L. lactis* tarafından insan interleukin–10 sekresyonu ve daha sonrasında terapötik moleküllerin oral olarak bu organizma tarafından verilebilirliği üzerine yoğunlaşmaktadır (164).

Klasik biyokimyasal testler uzun yıllar boyunca laktokokların identifikasyonunda kullanılmış ancak bu testler laktokokların diğer yakın cinslerden ayırımında yeterince etkin

olamamıştır. Özellikle enterokoklar bu türlerle karışabilmektedir. Bu türün diğerlerinden kesin ve ayırıcı tanısında kullanılan moleküler teknikler rapor edilmiştir (165,166).

Bununla birlikte 16S rDNA zincirine ilişkin spesifik problemlerin geliştirilmesiyle *cremoris* ile *lactis* alttürlerinin de moleküler olarak ayırımı mümkün olmuştur (38).

Bu çalışma, Aydın ili ve çevresinde ilk sıralarda tercih edilen, geleneksel usullere göre yapılan İzmir Tulum peynirinden izole edilen *lactis* suşlarının karakterlerinin belirlenmesi ve elde edilen suşların gelecekteki tulum peyniri yapımlarında en uygun starter kültür tiplerinin belirlenmesine ve kullanımına bir ışık tutması amacıyla yapılmıştır. *L. lactis* subsp *lactis* ve *cremoris* alttürlerinin izolasyonu, biyokimyasal testler ve ardından moleküler olarak identifikasyonun PZR tekniği ile ortaya konulması amaçlanmıştır. İzole edilen suşların saklanıp değerlendirilmek üzere korunması da yerel peynir çeşitlerimize özgü mikrobiyal zenginliğin korunması açısından önem arz etmektedir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Mikrobiyolojik Testler

Çiğ süttten kültür kullanılmaksızın üretilmiş olan 90 adet İzmir Tulum peyniri, Aydın İli ve çevresindeki farklı mandıralar ve pazarlardan Mayıs 2005–Mayıs 2006 tarihleri arasında toplandı ve laboratuvara soğuk zincir altında getirildi. Homojenizasyon işlemi, % 2'lik sodyum sitratta yapıldıktan sonra (Bag Mixer), % 0.1 pepton (oxid) ve % 0.85 tuz (oxid) içeren dilüsyon sıvılarında sulandırma işlemi yapıp  $10^6$  ve  $10^7$ 'lik dilüsyonlardan, içersinde 40 µg/ml oranında nalidiksik asit (Sigma N4382) içeren M17 agara (Merck 1.15108) çift kat dökme plak tekniğine göre ekildi (1,167,168) ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu dozdaki nalidiksik asit özellikle stafilokokların ve mikrokokların gelişimini inhibe etmektedir (168). Bu süre sonunda her bir petri kutusunda üreyen tipik kolonilerden (beyaz–krem renkte, 2–3 mm çapında yuvarlak–eliptik koloni) bir tanesi seçilip 2 kez M17 agar ve M17 brothda (Merck 1.15029) saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi. Saflaştırılan bu izolatların fenotipik karakterlerinin ortaya konulması amacıyla Gram boyama, 10°C'de, ve 45°C'de üreme, % 2, % 4 ve % 6.5 NaCl içeren sıvı besi yerinde üreme testlerine tabi tutuldu. Bu testlerin ardından Gram pozitif, kok formunda, 10°C'de üreyen ancak 45°C'de üremeyen ayrıca % 6.5 NaCl içeren besi yerinde üremeyen koloniler laktokok olarak kabul edildi. Bu izolatlar, Bascomp ve Manafi (169)'e göre % 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren süspansiyonda katalaz testine tabi tutuldu.

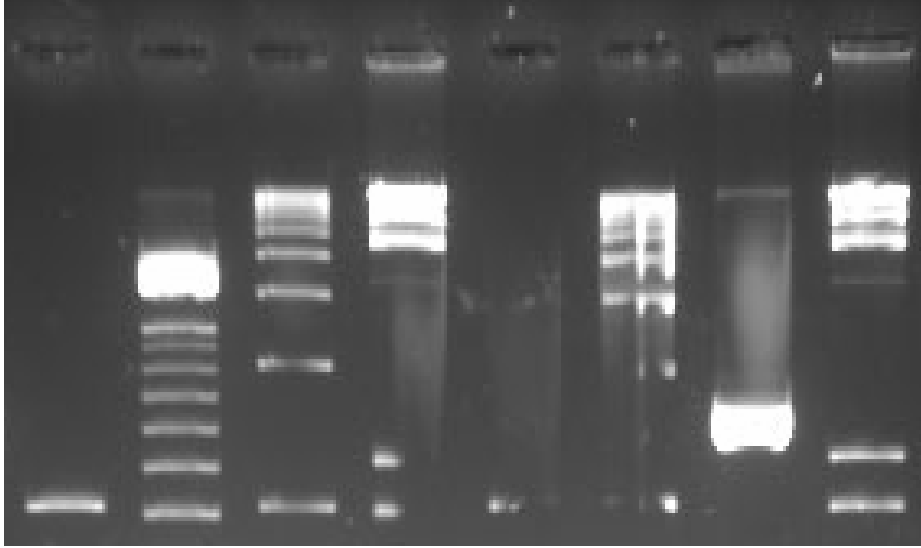
### DNA Ekstraksiyonu

İzolatlar gece boyunca 30°C'de sıvı M17 laktoz besi yerinde üretildi ve logaritmik fazda olan mikroorganizmanın üremiş olduğu sıvı besi yeri, 2 ml'lik eppendorf tüplerinde 5 dakika, 10.000 devir/sn santrifüj edildi (Eppendorf mini plus). Santrifüj sonrası üst kısımda kalan sıvı atıldı ve altta toplanan bakteri peleti, 2 defa soğuk (+4°C) distile su ile yıkanıp tekrar aynı devir ve sürede santrifüj yapıldı, üst sıvı atılıp altta kalan pelet, genomik DNA ayırma kiti (Fermentas, FE–K0512) ile izolasyona tabi tutuluncaya kadar –20°C'de saklandı.



## DNA Ayırma Protokolü

- 200 µl örnek, DNA ayırma kitindeki 400 µl lizis solüsyonu ile 65°C’de 5 d inkübe edildi. Sonrasında Vaid ve Bishop (170)’a göre, 15 U mutanolizin (Sigma M9901) içeren 50 mM sodyum fosfat buffer solüsyonu ile 37°C’de 30 d inkübe edildi.
- 600 µl kloroform ilave edilip 10.000 devirde 2 d santrifüj edildi.
- 720 µl nükleaz içermeyen bidistile su + 80 µl presipitasyon solüsyonu (10X) hazırlandı.
- 800 µl presipitasyon solüsyonu ile örneğimiz oda sıcaklığında 1–2 d bekletildi ve sonrasında 10.000 devirde 2 d santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst kısımdaki sıvı uzaklaştırıldı, DNA’nın eldesi için 100 µl 1.2 M NaCl solüsyonu ile işleme tabii tutuldu.
- 300 µl soğuk etanol ilave edilip –20°C’de 10 d presipitasyon için beklenildi. 10.000 devirde 3 d santrifüj edildi, etanol başka bir tüpe aktarıldı, pellet, % 70 soğuk etanol ile yıkandı. DNA, 100 µl nükleaz içermeyen distile suda toplandı ve –20°C’de saklandı.



**Şekil 2:** Ekstraksiyonlar sonucu elde edilmiş DNA'lar

## Referans Suşlar:

*L. lactis* subsp. *lactis* NRRL–B 1821, *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4432 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* NRRL–B 634, Yüksek Teknoloji Enstitüsünden (Urla–İzmir) temin edildi.

## Oligonükleotitler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmada kullanılan HPLC saflaştırılmış oligonükleotit primerleri Tablo 4’te verilmiştir. PZR reaksiyonları içerisinde:

PZR Buffer: 5µl, MgCl<sub>2</sub>: 3µl, dNTPMix (Fermentas, FE–R0191): 1µl, HPLC purifiye Primer LacreR: 2µl, Primer LacF: 2µl, Hot Start Taq DNA polimeraz (Fermentas,FE–EP0602): 0.2µl, Templeyt DNA: 5µl, toplam hacim: 50µl

**Tablo 4.** Çalışmada kullanılan primerler ve hedef mikroorganizmalarla hedef bölgeleri

Primer (Referans)	Hedef mikroorganizma	Baz sayısı	Hedef Bölge (rDNA)*	Oligonükleotit
LacreR (Pu ve arkadaşları) (38)	<i>L. lactis</i>	19	779–815	GGGATCATCTTTGAGTGAT
LacF (Pu ve arkadaşları) (38)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	19	217–341	GTACTTGTACCGACTGGAT
CreF (Pu ve arkadaşları) (38)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	19	217–341	GTGCTTGCACCGATTTGAA

\* DNA zincir pozisyonu “Ribosomal Database Project” e göre *E. coli* baz alınarak belirlenmiştir.

### **PZR Karışımının Hazırlanması:**

Kırık buz üzerinde 2.0 ml'lik reaksiyon tüpünde aşağıdaki karışım hazırlandı:

#### *L. lactis* subsp. *lactis* için:

Bidistile su	31.8 µl
PZR Buffer (10x konsantrasyonda)	5.0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3.0 µl
dNTP Mix (10 mM, Fermentas, FE-R0191)	1.0 µl
Primer 1 (LacreR, 10 pmol/ul)	2.0 µl
Primer 2 (LacF, 10 pmol/ul)	2.0 µl
Hot Start Taq polimeraz (5 U/ul, Fermentas, FE-EP0602)	0.2 µl
Örnek DNA	5.0 µl
<hr/>	
Toplam: 50 µl	

#### *L. lactis* subsp. *cremoris* için:

Bidistile su	31.8 µl
PZR Buffer (10x konsantrasyonda)	5.0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3.0 µl
dNTP (10 mM, Fermentas, FE-R0191)	1.0 µl
Primer 1 (LacreR, 10 pmol/ul)	2.0 µl
Primer 3 (CreF, 10 pmol/ul)	2.0 µl
Hot Start Taq polimeraz (5 U/ul, Fermentas, FE-EP0602)	0.2 µl
Örnek DNA	5.0 µl
<hr/>	
Toplam: 50 µl	

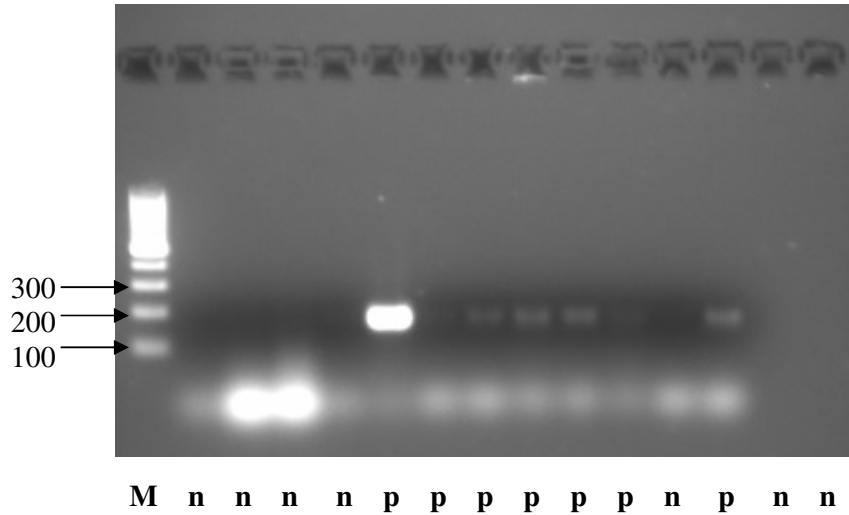
1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> , 20–100 µg DNA, 0.5 µmol/l primer (Fermentas, HPLC purifiye, HB–1000), 2.5 IU Hot Start Taq DNA polimeraz (Fermentas, FE–EP0602), 200 µmol/l dNTP ve 100 mmol/l Tris HCl bulunan 50 µl son hacimde gerçekleştirildi. Çoğaltım işlemi için Perkin Elmer termocycler (model 3600) kullanıldı.

## **PZR ve Jel Üzerinde Görüntüleme**

PZR için; her bir siklusu 94°C’de 40 s denatürasyon, 58°C’de 40 s hibridizasyon ve 72°C’de 1 d tamamlama işlemi 35 siklus olarak uygulandı (38). Bu siklusların başlamasından önce 94°C’de 5 d asıl denatürasyon gerçekleştirildi (Eppendorf Master Cycler Personal). Bunun ardından PZR ürünleri, TAE elektroforez buffer (Fermentas, FE–B49) içeren % 1’lik agaroz jel (Fermentas, Basica Le, HS–8012) üzerinde ilk 5 dakika 90 voltta, sonra 60–75 d 60 voltta göç ettirildi (ThermoEC 250–90) ve 0.03 µl/ml etidyum bromür (Fermentas, ZD–A1152) ile boyanarak görüntülendi. Görüntüleme Spectroline TC–312E/F UV transilluminator, kamera pulnix TM–7ETX ve Sony printer kullanıldı. 100 bp artış gösteren DNA marker (Fermentas, FE–SM1143) kullanıldı.

## BULGULAR

Toplanan peynir numunelerinin nalidiksik asit içeren M17 agar besiyeri ortamına ekilmesi sonucunda tüm numunelerde üreme şekillendiği tespit edildi. Üreyen mikroorganizma sayısının  $1.9 \times 10^7$ – $2.1 \times 10^8$  kob/g düzeyleri arasında değiştiği gözlemlendi. Her bir peynir numunesine ait üreyen kolonilerden biri seçilerek ileri identifikasyon işlemleri için M17 sıvı besi yerinde üretildi. Katı ve sıvı besi yerlerinde 2 kez saflaştırma çalışması yapıldı ve son saflaştırmadan sonra üreyen koloniler % 15–20 gliserol içeren kriyo tüplerde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Bu saf izolatlar, % 2, 4 ve 6.5 tuzda üreme ve  $10^{\circ}\text{C}$  ve  $45^{\circ}\text{C}$ 'de üreme testlerine tabii tutuldu. Bu gibi testler laktokokların, başta enterokoklardan ve diğer streptokoklardan fenotipik olarak ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (1,7,20,21,40). Gram boyamanın ardından  $10^{\circ}\text{C}$ 'de üreyen fakat  $45^{\circ}\text{C}$ 'de üremeyen, % 2 ve % 4 tuzda üreyen fakat % 6.5 tuzda üremeyen suş, fenotipik özelliklerine göre laktokok kabul edildi. Buna göre; daha sonra fenotipik özelliklerine göre laktokok profili gösterecek ya da göstermesin tüm izolatlar *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* ayrımı için PZR primerleri kullanılarak moleküler onaylama işlemine tabii tutuldu. 16S rDNA genine spesifik olarak tasarlanmış bu primerler vasıtasıyla, test edilen tüm izolatlardan 18 tanesinin (% 20) *L. lactis* subsp. *lactis* ve 11 tanesinin de (% 12) *L. lactis* subsp. *cremoris* alttürleri ile 161 bp boyutlarında bir bant verdiği gözlemlendi. Görüntü kalitesi iyi olmamakla birlikte, çıplak gözle daha net fark edilebiliyordu.



Şekil 3: 161 bp boyutunda pozitif bant veren suşlar.

M: Marker

n: Negatif

p: Pozitif

Fenotipik özelliklerine göre laktokok profili gösteren 17 adet suş (3, 6, 16, 20, 21, 31, 33, 47, 48, 51, 57, 60, 68, 71, 76, 77 ve 90 numaralı suşlar) PZR reaksiyonu sonucunda pozitif bant vermemiştir (Tablo 7). Diğer bir ilgi çekici nokta 1, 11, 25, 30, 34, 54, 59, 70, 74 ve 89 numaralı olmak üzere 10 adet suş fenotipik değerlendirmelere göre baştan laktokok profili göstermemesine rağmen PZR çalışmalarında *L. lactis* subsp. *lactis* olarak pozitif bant vermiştir. PZR sonucunda pozitif *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarından 4, 9, 35, 39, 53 numaralı olanlar, % 4 tuzda ve 45°C’de üreme göstermemiştir. Ayrıca *cremoris* olarak pozitif bant veren 17, 41, 56, 62 ve 84 numaralı suşların hepsi de % 4 tuz içeren besi yerinde üreme göstermiştir. 28 numaralı alttür *cremoris* suşu ise hem % 4 tuzda hem de 45°C’de gelişebilmiştir. Benzer şekilde PZR çalışmalarında pozitif bant veren *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarından 19, 27, 40, 43, 50,65 ve 78 numaralı olanlar, % 6.5 tuzda ve 45°C’de üreme göstermemiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* olarak pozitif bant veren 1, 11, 30, 54, 70, 74 ve 89 numaralı olan suşlar, % 6.5 tuzda, 34 numaralı suş ise 45°C’de ve 25 ve 59 numaralı suşlar ise hem % 6.5 tuzda hem de 45°C’de üreme göstermiştir. Bu özellikleri dolayısı ile bu izolatlar, atipik profil göstermiştir.

**Tablo 5:** İzole edilen suşların biyokimyasal ve fenotipik olarak belirlenmesi\*

	Gram	Şekil	Tuza dayanıklılık			10°C'de Gelişme	45°C'de Gelişme	Katalaz
			%2	%4	%6.5			
1	+	Kok	+	+	+	+	-	-
2	+	Kok	+	+	+	+	+	-
3	+	Kok	+	+	-	+	-	-
4	+	Kok	+	-	-	+	-	-
5	+	Rod	+	+	+	+	+	-
6	+	Kok	+	+	-	+	-	-
7	+	Kok	+	+	+	+	+	-
8	+	Rod	+	+	+	+	+	-
9	+	Kok	+	-	-	+	-	-
10	+	Rod	+	+	+	+	+	-
11	+	Kok	+	+	+	+	-	-
12	+	Kok	+	+	-	+	-	-
13	+	Rod	+	+	+	+	+	-
14	+	Kok	+	+	+	+	+	-
15	+	Rod	+	+	+	+	+	-
16	+	Kok	+	-	-	+	-	-
17	+	Kok	+	+	-	+	-	-
18	+	Rod	+	+	+	+	+	-
19	+	Kok	+	+	-	+	-	-
20	+	Kok	+	+	-	+	-	-
21	+	Kok	+	+	-	+	-	-
22	+	Kok	+	-	-	+	+	-
23	+	Rod	+	+	+	+	+	-
24	+	Kok	+	-	-	+	-	-
25	+	Kok	+	+	+	+	+	-
26	+	Rod	+	+	+	+	+	-
27	+	Kok	+	+	-	+	-	-
28	+	Kok	+	+	-	+	+	-
29	+	Rod	+	+	+	+	+	-
30	+	Kok	+	+	+	+	-	-
31	+	Kok	+	+	-	+	-	-
32	+	Kok	+	+	+	+	+	-
33	+	Kok	+	-	-	+	-	-
34	+	Kok	+	+	-	+	+	-
35	+	Kok	+	-	-	+	-	-
36	+	Kok	+	+	-	+	+	-
37	+	Rod	+	+	+	+	+	-
38	+	Rod	+	+	+	+	+	-
39	+	Kok	+	-	-	+	-	-
40	+	Kok	+	+	-	+	-	-
41	+	Kok	+	+	-	+	-	-
42	+	Kok	+	-	-	+	+	-
43	+	Kok	+	+	-	+	-	-
44	+	Kok	+	+	-	+	+	-
45	+	Kok	+	+	+	+	+	-

46	+	Rod	+	+	+	+	+	-
47	+	Kok	+	+	-	+	-	-
48	+	Kok	+	-	-	+	-	-
49	+	Rod	+	+	+	+	+	-
50	+	Kok	+	+	-	+	-	-
51	+	Kok	+	-	-	+	-	-
52	+	Rod	+	+	+	+	+	-
53	+	Kok	+	-	-	+	-	-
54	+	Kok	+	+	+	+	-	-
55	+	Rod	+	+	+	+	+	-
56	+	Kok	+	+	-	+	-	-
57	+	Kok	+	+	-	+	-	-
58	+	Rod	+	+	+	+	+	-
59	+	Kok	+	+	+	+	+	-
60	+	Kok	+	-	-	+	-	-
61	+	Kok	+	+	+	+	+	-
62	+	Kok	+	+	-	+	-	-
63	+	Rod	+	+	+	+	+	-
64	+	Rod	+	+	+	+	+	-
65	+	Kok	+	+	-	+	-	-
66	+	Kok	+	+	+	+	+	-
67	+	Rod	+	+	+	+	+	-
68	+	Kok	+	+	-	+	-	-
69	+	Rod	+	+	+	+	+	-
70	+	Kok	+	+	+	+	-	-
71	+	Kok	+	+	-	+	-	-
72	+	Kok	+	+	+	+	+	-
73	+	Rod	+	+	+	+	+	-
74	+	Kok	+	+	+	+	-	-
75	+	Rod	+	+	+	+	+	-
76	+	Kok	+	+	-	+	-	-
77	+	Kok	+	+	-	+	-	-
78	+	Kok	+	+	-	+	-	-
79	+	Rod	+	+	+	+	+	-
80	+	Kok	+	+	+	+	+	-
81	+	Kok	+	+	+	+	+	-
82	+	Rod	+	+	-	+	+	-
83	+	Rod	+	+	+	+	+	-
84	+	Kok	+	+	-	+	-	-
85	+	Kok	+	+	+	+	+	-
86	+	Kok	+	+	+	+	+	-
87	+	Kok	+	+	+	+	+	-
88	+	Kok	+	+	+	+	-	-
89	+	Kok	+	+	+	+	-	-
90	+	Kok	+	+	-	+	-	-

\*: Fenotipik özelliklerine göre *Lactococcus lactis* profili gösteren suşlar koyu belirtilmiştir.



**Tablo 6:** Fenotipik değerlendirme, türe özgü PZR ve grupları

Suş	Fenotipik değerlendirme	PZR Sonuçları	
		<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
1	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
3	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
4	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
6	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
9	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
11	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
12	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
16	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
17	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
19	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
20	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
21	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
25	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
27	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
28	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
30	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
31	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
33	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
34	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
35	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
39	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
40	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
41	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
43	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
47	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
48	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
50	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
51	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
53	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
54	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
56	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
57	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
59	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
60	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
62	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
65	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
68	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
70	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
71	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
74	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
76	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
77	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-
78	<i>Lactococcus</i> (+)	+	-
84	<i>Lactococcus</i> (+)	-	+
89	<i>Lactococcus</i> (-)	+	-
90	<i>Lactococcus</i> (+)	-	-

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Tulum peyniri, beyaz ya da krem renkte ve yarı sert tekstüre sahiptir. Genellikle İzmir Tulum peyniri ve Erzincan Şavak Tulum peyniri olmak üzere 2 çeşit tulum peyniri söz konusudur. İkincisi, Erzincan, Erzurum, Tunceli, Bingöl, Elazığ ve çevresinde yapılmaktadır (22).

Bu çalışmada ülkemizde ekonomik açıdan önem arz eden İzmir Tulum peynirine özgü laktokok florasının identifikasyonu amaçlanmıştır.

Standartlarımızda homojenizasyon işleminde % 2'lik sodyum sitratın kullanılması gerektiği bildirilmiştir (26). LAB için ileri dilüsyon işlemlerinde ise soğuk % 0.1'lik peptonun kullanılması tavsiye edilmektedir. Fosfat buffer dilüentleri mikroorganizmaların yakalanma şansını azaltmaktadır (7). Laktokokların üremesine en elverişli besi yerinin saptanması amacıyla yapılan çalışmalarda M17 agarın en iyi olduğu belirlenmiş (1,149,171) ve M17 agar uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (172).

Fenotipik özellikleri göz önüne alınarak yapılan identifikasyon işlemleri oldukça zaman aldığı için (167), fenotipik ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde baştan laktokok olarak şüphelenilen izolatların hepsinin laktokok olarak tespit edilmemiş olmasından dolayı (173) nükleik asit tabanlı moleküler teknikler geliştirilmiştir (10,38,165–167).

Uzun yıllar boyunca *cremoris* ve *lactis* alttürlerinin birbirinden ayırımında biyokimyasal olarak arjininden amonyak üretim testi kullanılmıştır. Ancak bu test her zaman için güvenilir sonuçlar vermemektedir (62). Çalışmamızda kullandığımız primerler sadece kendi türlerine özgü DNA ile reaksiyon vermiştir. Bu sonuçlar bu iki alttürün ayırımında PZR'in etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada uygulanan fenotipik testlerle 36 izolat tipik *L. lactis* profili göstermesine rağmen bu izolatlardan 17 tanesi *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* alttürleri açısından spesifik primerler ile yapılan genetik testlerde negatif yanıt vermiştir. Bu cinste yer alan mikroorganizmaların diğer cinslerde, özellikle de enterokok cinsinde yer alan mikroorganizmalar ile fenotipik özelliklerine göre kolaylıkla karıştırılabileceği önceden de bildirilmişti (61,174). Negatif yanıt veren bu suşlar, laktokok cinsine ait diğer mikroorganizma gruplarından da olabilir. Bu durum ayrıca, tür seviyesinde ayırım için PZR gibi diğer ilave testlerin gerekli olduğunun bir göstergesidir. *L. lactis* subsp. *cremoris* genel olarak peynir çeşitlerinden daha nadir olarak izole edilen bir türdür (1). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 18 adet *lactis* alttürüne nazaran 11 adet

*cremoris* alttürü izole edildi. Delgado ve Mayo (175) starter kültür kullanılmadan üretilmiş çiftlik peynirlerinden, Gaya ve arkadaşları (176) çiğ süttten yapılmış koyun peynirlerinden, *L. lactis* subsp.*cremoris*'i % 14–25 arasında izole etmişlerdir. Peynir örneklerinden izole edilmesi güç olan bu suş, bu çalışmada rastgele seçilen suşlar arasında % 12 oranında tespit edilmiştir. Corroler ve arkadaşları (1) Cheddar peynirlerinde istenen aromanın oluşmasını sağlayan *L. lactis* subsp.*cremoris*'i (176) % 40 düzeylerinde tespit etmişlerdir. Herreros ve arkadaşları da (110) Armada peynirinden *L. lactis* subsp. *cremoris*'i daha az oranda izole etmişlerdir. Gerasi ve arkadaşları (111) çiğ süttten üretilen Manura peynirinden yaptıkları çalışmada laktokokları düşük oranda bulmuşlardır. Diğer birçok peynirlerde daha az sıklıkta izole edilen *L. lactis* subsp. *cremoris*, bu peynirde daha yoğun tespit edilmiştir.

Bu çalışmaya benzer şekilde Fortina ve arkadaşları (54) Garde ve arkadaşları (14) ile Bulut ve arkadaşları (116) da çalışmalarında atipik laktokokları izole etmişlerdir. Fortina ve arkadaşları (54) bir çeşit İtalyan peyniri örneklerinin % 67'sinin laktokoklar tarafından oluşturulduğu ve beklenenden yüksek olan bu oranın *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. garvieae* tarafından oluşturulduğunu ve aynı zamanda bu *L. lactis* subsp. *lactis*'lerin % 73'ünün % 6.5 tuzda üreme gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde Ward ve arkadaşları (17) çiğ süttten izole ettikleri 31 *Lactococcus* suşundan 21'ini 16S rRNA tekniğine göre *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tespit ederlerken bu suşların hepsi baştan *L. lactis* subsp. *lactis* profili göstermiştir. Benzer şekilde Mangin ve arkadaşları (16) Salama ve arkadaşları (178) ve Klijn ve arkadaşları (166) çiğ süttten yapmış oldukları çalışmalarda fenotipik özelliklerine göre *L. lactis* subsp. *lactis* denen suşlardan bazılarını, PZR sonucunda *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tespit etmişlerdir. Gene Mannu ve Pab (179) çiğ süttten yapılan Pecorino Sardo peynirinden % 6.5 tuzda üreyebilen *L. lactis* subsp. *lactis* suşları izole etmişler fakat olgunlaşmanın 2. ayında hiç *L. lactis* suşu tespit edememişlerdir. Ouzari ve arkadaşları (63) yerel fermente süt ürünlerinden yaptıkları PZR tabanlı çalışmalarında 36 *L. lactis* subsp. *lactis* ve 12 *L. lactis* subsp. *cremoris* izole etmişler ve izole ettikleri tüm *cremoris* suşları 40<sup>0</sup>C'de ve % 58'i, % 4 tuzda üreme göstermiştir. Nomura ve arkadaşları (50) çiğ süttten izole ettikleri *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının % 6.5 tuzda ve pH 9.6'da üreme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Obis ve arkadaşları (180) % 6.5 tuzda üreme gösteren *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının yanı sıra % 4 tuzda üreme göstermeyen *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarını deneysel olarak göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki laktokokların atipik özellik göstermesi, tamamen suşun kendisine bağlı olmakla birlikte sütün pastörize edilip edilmemesi, içermiş olduğu tuz miktarı gibi peynir yapım teknolojisi de bu konuda önemli bir etmen olabilmektedir.

Psoni ve arkadaşları (181) çiğ keçi sütünden yapılan Batzos peynirinde, Pisano ve arkadaşları (182) çiğ süttten yapılan Fiore Sardo peynirinde, laktokoklar arasında başlıca türü *L. lactis* subsp *lactis*'in oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Mangin ve arkadaşları (16) çiğ süttten yaptıkları incelemelerde *L. lactis* suşlarının % 60 gibi yüksek bir değerinde baskın florayı oluşturduğunu ve bunların tamamının *L. lactis* subsp *lactis*'e ait olduğunu belirlemişlerdir. Di Cagno ve arkadaşları (183) çalışmış oldukları 4 İtalyan peynirinin birinde *L. lactis* oldukça dominant bulunurken diğer 3 peynirde laktokok tespit edilememiştir. Florez ve arkadaşları (168) inek, koyun ve keçi sütleri karışımından yapılmış Cabrales peynirinde, Callon ve arkadaşları (167) çiğ süttten yapılan Salers peynirinde, LAB içinde dominant olarak *L. lactis* subsp. *lactis*'i izole etmişler ve ayrıca *L. lactis* subsp. *cremoris*'i tespit edememişlerdir. Zarate ve arkadaşları (184) Tenerife keçi peynirinden, Gerasi ve arkadaşları (111) çiğ koyun sütünden yapılan Manura peynirinden *L. lactis* subsp. *cremoris*'i düşük oranda tespit ederken Mannu ve arkadaşları (185) Pecorino Sardo peynirinden izole edilen 29 *Lactococcus* izolatından sadece 1 tanesini *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak belirlemişlerdir.

*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ya da *Ln. mesenteroides* gibi mezofilik suşlar, taze peynirlerin dominant florasını oluşturmaktadır. Peynirlerin olgunlaşması süresince yoğun olarak bulunan bakteri grubunu oluşturan LAB içersinde 48 saatlik peynir örneklerinde maksimum seviyede olduğu varsayılan laktokokların, 1 aylık bir olgunlaşma süresinde, sayıları oldukça düşmekte, hatta bazı zamanlarda tespit edilememektedir. Peynirlerin olgunlaşmalarındaki ilk evrelerde laktokokların dominant mikroflorayı oluşturdukları belirtilmektedir (140). Buna benzer şekilde Mannu ve arkadaşları (185) Pecorino Sardo peynirinin olgunlaşmanın birinci gününde laktokokları  $1.0 \times 10^9$  kob/g düzeyinde tespit etmiş ve % 6.5 tuzda üreme gösteren fakat 45°C'de üreyemeyen *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarını izole etmiş, olgunlaşma boyunca laktokok sayısında bir düşüşün olduğunu bildirmiştir. Poznanski ve arkadaşları (53) çiğ süttten yapılan Nostrano di Primiero peynirinde olgunlaşmanın ikinci gününde dominant floranın laktik koklar tarafından oluşturulduğunu ve olgunlaşmanın 30. gününde *L. lactis* subsp. *lactis* ve subsp. *cremoris* suşlarının düşük olduğunu bildirmiştir. Birçok çalışmadakine benzer şekilde de

laktokokların sayısı olgunlaşma periyodu boyunca bir azalma göstermiştir. Bu araştırmacılar bunun nedenini başlıca yüksek NaCl içeriğinin etkisinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca laktozun kullanılması sonucu oluşan asitliğin etkisi ile peynirde laktobasillerin olgunlaşma periyodu boyunca artış eğilimi göstermesi, laktobasillerin dominant florayı oluşturması ve leukonostoklar ve laktokokların asidurik mikroorganizmalar olması ve düşük pH'da yavaş metabolizmaya sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Laktokoklar, sütün pıhtılaşmasını sağlayan asidifikasyonunu gerçekleştirirken bu ilk aşamada gelişmekte ve yüksek sayıda olmaktadır (29). Ostlie ve arkadaşları (59) Norveç peynirinde laktokokların olgunlaşma periyodunda baştan 9 log kob/g düzeyinde olan sayılarının olgunlaşma sürecinde genellikle azaldığı, hatta bu periyodun 3-4 ay olması halinde pH ile tuz konsantrasyonuna bağlı olmakla birlikte tespit edilemeyecek miktarlarda olabildiğini bildirmiştir. Madrau ve arkadaşları (186) Pecorino Sardo peynirinin olgunlaşmasının ilk zamanlarda dominant florayı koklar oluştururken ilerleyen zamanla birlikte laktobasillerin sayılarının arttığını bildirmişlerdir. Gerasi ve arkadaşları (111) 3 aylık olgunlaşmasını tamamlamış çiğ süttten yapılan koyun peynirlerinde sayıca en büyük düşüşü laktokokların gösterdiğini bildirmiştir. Florez ve arkadaşları (168) üç günlük peynirlerde dominant florayı  $4.0 \times 10^9$  kob/g düzeyi gibi yüksek bir sayı ile laktokokların oluşturduğunu, olgunlaşma periyodu boyunca sayıca en yüksek soyu laktokokların oluşturduğunu ve laktobasillerin hiçbir zaman sayıca laktokoklardan üstün olmadığını bildirmiştir.

Gurses ve Erdogan (29), tulum peynirlerinin olgunlaşma süresince içerdiği LAB yükünde hakim floranın laktobasiller olduğunu tespit ederken enterokoklar, laktokoklar, leukonostoklar ve pediokokları olgunlaşma periyodu boyunca düşük oranlarda bulmuşlardır. *L. lactis* suşları, taze peynirler için izole edilen mikroorganizmalar arasında % 4.5 oranında ve 90 günlük olgunlaşma periyodu sonucunda da % 3 oranında tespit edilirken bu oran *Pediococcus acetilactici* için sırasıyla % 18.2 ve % 17.6, *Enterococcus faecalis* için % 13.6 ve % 3, *Leuconostoc mesenteroides* suşları için % 9.1 ve % 14.7 olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus*'lar içinde *Lb. parabuchneri*, *Lb. bifementas* ve *Lb. paracasei* suşları için taze peynirler için sırasıyla % 13.6, % 13.6 ve % 9.1 olan oranlar, 90 günlük olgunlaşmasını tamamlamış peynirler için sırasıyla % 17.6, % 14.7 ve % 14.7 olarak tespit edilmiştir.

Ülkemizde tulum peyniri ile ilgili çok çalışma yapılmıştır fakat bunların hemen hemen hepsi Erzincan Şavak Tulum peyniri üzerine ve genelde de olgunlaşma süresince paketleme materyalinin (plastik bidon, deri ve cam) duyu kalite üzerine etkisi

(22,23,187–197), mikrobiyolojik kaliteleri (31,187,194,196–205) ve starter kültür kullanımının kalite üzerine etkisi bakımından (206–210) incelenmiştir. Tulum peynirlerinin olgunlaşma süresi boyunca LAB florasını inceleyen (29,30) ve tulum peynirlerinde lipolizisin aroma üzerine etkisi (27) ile tulum peynirinde bulunan aroma maddelerini saptayan (22) çalışmalar da bulunmaktadır. Kılıç ve Gönç (211) İzmir Tulum peynirinden yapmış oldukları izolasyonlar sonucunda *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* türlerini yüksek oranda tespit etmişler ve üretimde starter kültür kullanılacaksa bu grup bakterilerden *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis* ve subsp. *cremoris* ile *Lb. casei* türlerinin seçilmesini uygun bulmuşlardır. Öner ve arkadaşları (30) tulum peynirlerinden yapmış oldukları çalışmada laktobasillerin dominant florayı oluşturduğunu tespit ederlerden laktokokları %15.8 oranında tespit etmişlerdir. Öksüztepe ve arkadaşları (212) tulum peynirlerinde *Streptococcaceae* ailesinde yer alan *Enterococcus* türlerinin, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* ile *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*'in olgunlaşmada başlıca sorumlu organizmalar olarak bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; Aydın İli ve çevresinde geleneksel olarak çiğ süttten üretilen 90 farklı İzmir Tulum peynirinden elde edilen 36 izolat, fenotipik değerlendirmeler sonucunda pozitif sonuç vermesine rağmen PZR analizi sonucu ancak 29 örneğin (% 32) *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen bu suşların 18 tanesi (% 20) *L. lactis* subsp. *lactis*, 11 tanesi (% 12) *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada laktokok alttürlerinin sağlıklı bir şekilde ayırt edilebilmesi için PZR tekniğinin gerekliliği ortaya konulmuştur. Ayrıca salamura tekniği ile geleneksel olarak üretilen olgunlaşma periyodunu tamamlamış İzmir Tulum peynirlerinde % 32 oranında *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*'in bulunması; olgunlaşma işleminin peynirdeki laktokok insidensini düşürme durumu da göz önüne alındığında, bu mikroorganizmaların tulum peynirinde aroma ve lezzet oluşumundaki rolünü belirlemektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda belirtildiği gibi İzmir Tulum peynirinde de *L. lactis* subsp. *lactis*'in bulunma oranı (% 20), *L. lactis* subsp. *cremoris*'e göre (% 12) daha fazladır.

Bu çalışma daha sonra İzmir Tulum peynirinin olgunlaşmasında önemli olan ve tulum peynirine özgü starter kültürün oluşturulmasında önemli olan mikroorganizmaların tespit edilmesinde bir ön çalışma olarak kabul edilebilir. Ayrıca elde ettiğimiz *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* izolatlarının asidifikasyon, proteoliz, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit oluşturma, bakteriyofaj ve antibiyotiklere direnç gibi teknolojik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara da baz oluşturacaktır. Bu şekilde bu

mikroorganizmaların İzmir Tulum peynirinin aroma ve lezzetinin oluşmasındaki ayırt edici özellikleri ortaya konulacaktır.

## KAYNAKLAR

- 1) CORROLER D, MANGUIN I, DESMASURES N, GUEGUEN M. An Ecological Study of Lactococci Isolated from Raw Milk in the Camembert Cheese Registered Designation of Origin Area. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4729–4735, 1998.
- 2) GIRAFFA G, ROSSETTI L, NEVIANI E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 175–184, 2000.
- 3) COGAN MT, BARBOSA M, BEUVIER E, SALVADORI BB, COCCONCELLI PS, FERNANDES I, GOMEZ J, GOMEZ R, KALANTZOPOULOS G, LEDDA A, MEDINA M, REA MC, RODRIGUEZ E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy Research*, 64: 409–421, 1997.
- 4) MUFANDAEDZA J, VILJOEN BC, FERESU SB, GADAGA TH. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 147–152, 2006.
- 5) ROSSETTI L, GIORGIO G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63: 135–144, 2005.
- 6) KLAENHAMMER T, ALTERMANN E, ARIGONI F, BOLOTIN A, BREIDT F, BROADBENT J, CANO R, CHAILLOU S, DEUTSCHER J, GASSON M, VAN DE GUCHTE M, GUZZO J, HARTKE A, HAWKINS T, HOLS P, HUTKINS R, KLEEREBEZEM M, KOK J, KUIPERS O, LUBBERS M, MAGUIN E, MCKAY L, MILLS D, NAUTA A, OVERBEEK R, PEL H, PRIDMORE D, SAIER M, VAN SINDEREN D, SOROKIN A, STEELE J, O’SULLIVAN D, DE VOS W, WEIMER B, ZAGOREC M, SIEZEN R. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 29–58, 2002.
- 7) CARR FJ, CHILL D, MIADA N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28: 281–370, 2002.
- 8) BEASLEY S. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Doctoral thesis, Helsinki, Finland, 2004.
- 9) TAILLIEZ P, TREMBLAY J, EHRLICH SD, CHOPIN A. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 530–538, 1998.
- 10) BASARAN P, BASARAN N, CAKIR I. Molecular Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by Ribotyping and Site Specific-PCR. *Current Microbiology*, 42: 45–48, 2001.
- 11) GODON JJ, DELORME C, EHRLICH SD, RENAULT P. Divergence of Genomic Sequences between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4045–4047, Dec. 1992.
- 12) ENDO A, OKADA S. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during Shochu fermentation by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 216–221, 2005.
- 13) PERRETEN V, FRANZISKA V, TEUBER SM, LEVY SB. Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1109–1114, 2001.



- 14) GARDE S, BABIN M, GAYA P, NUNEZ M, MEDINA M. PCR Amplification of the Gene *acmA* Differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5151–5153, 1999.
- 15) HANNONA JA, KILCAWLEYA KN, WILKINSONC MG, DELAHUNTY CM, BERESFORD TP. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. International Dairy Journal, 17: 316–327, 2007.
- 16) MANGIN I, CORROLER D, REINHARDT A, GUEGUEN M. Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. Journal of Applied Microbiology, 86: 514–520, 1999.
- 17) WARD LJH, BROWN JCS, DAVEY GP. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. FEMS Microbiology Letters, 166: 15–20, 1998.
- 18) WASSILL L, LUDWIG W, SCHLEIFER KH. Development of a modified subtraction hybridization technique and its application for the design of strain specific PCR systems for lactococci. FEMS Microbiology Letters, 166: 63–70, 1998.
- 19) SANCHEZ C, MAYO B. Sequence and analysis of pBM02, a novel RCR cryptic plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* P8–2–47. Plasmid, 49: 118–129, 2003.
- 20) SCHLEIFER KH BALZ RK. Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A review Systematic and Applied Microbiology, 10: 1–19, 1987.
- 21) SCHLEIFER KH, KRAUS J, DVORAK C, BALZ RK, COLLINS MD FISCHER W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology 6, 183–195, 1985.
- 22) HAYALOGLU AA, CAKMAKCI S, BRECHANY EY, DEEGAN KC, MCSWEENEY PLH. microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. Journal of Dairy Science, 90: 1102–1121, 2007.
- 23) KELEŞ A. Çiğ ve pastörize süttten üretilen tulum peynirinin farklı ambalajlarda olgunlaştırılmasının kaliteye etkisi üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1995.
- 24) TEKİNŞEN OC. Süt Ürünleri Teknolojisi, 3. baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, sayfa 217–218, 2000.
- 25) MUSTAFA ÜÇÜNCÜ. A'dan Z'ye peynir teknolojisi, cilt 2, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, sayfa 905–915, 2004.
- 26) Salamura Tulum Peyniri (İzmir Tulum Peyniri), Türk Standardı TS ICS 67.100.30 TS 11966, Mart 1996.
- 27) YILMAZ G, AYAR A, AKIN N. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. Journal of Food Engineering, 69: 269–274, 2005.
- 28) HAYALOGLU AA, GUVEN M, FOX PF. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese “Beyaz Peynir”. International Dairy Journal, 12: 635–648, 2002.
- 29) GURSES M, ERDOGAN A. Identification Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Tulum Cheese During Ripening Period. International Journal of Food Properties, 9: 551–557, 2006.

- 30) ÖNER Z, SAĞDIÇ O, ŞİMŞEK B. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *European Food Research and Technology*, 219: 455–459, 2004.
- 31) ÇOLAK H, HAMPIKYAN H, BINGÖL EB, ULUSOY B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control*, 18: 576–579, 2007.
- 32) RAHA A, ROSS E, YUSOFF K, MANAP MY, IDERIS A. Characterisation and Molecular Cloning of an Erythromycin Resistance Plasmid of *Lactococcus lactis* Isolated from Chicken Cecum. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, Vol. 6(1): 7–11, 2002.
- 33) BEYER NH, ROEPSTORFF P, HAMMER K, KILSTRUP M. Proteome analysis of the purine stimulon from *Lactococcus lactis*. *Proteomics*, 3:786–797, 2003.
- 34) SAMARZIJA D, SIKORA S, REDZEPOVIC S, ANTUNAC N, HAVRANEK J. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures. *Microbiology Reserach*, 157: 13–17, 2002.
- 35) SALAMA MS, SANDINE WE, GIOVANNONI SJ. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by Colony Hybridization with rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3941–3945, 1993.
- 36) STILES ME, HOLZAPFEL WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1–29, 1997.
- 37) DALEZIOS I, SIEBERT KJ. Comparison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 225–236, 2001.
- 38) PU ZY, DOBOS M, LIMSOWTIN GKY, POWELL IB. Integrated polymerase chain reaction–based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram–positive bacterial genus *Lactococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 353–361, 2002.
- 39) URBACH E, SCHINDLER C, GIOVANNONI SJ. A PCR fingerprinting technique to distinguish isolates of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 162: 111–115, 1998.
- 40) PEREZ G, CARDELL E, ZARATE V. Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait*, 80: 589–600, 2000.
- 41) ZAMFIR M, VANCANNEYT M, MAKRAS L, VANINGELGEM F, LEFEBVRE K, POT B, SWINGS J, DE VUYST L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 487–495, 2006.
- 42) SHARECK J, CHOI Y, LEE B, MIGUEZ CB. Cloning Vectors Based on Cryptic Plasmids Isolated from Lactic Acid Bacteria: Their Characteristics and Potential Applications in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(4): 155–208, 2004.
- 43) SAVIJOKI K, INGMER H, VARMANEN P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394–406, 2006.
- 44) FREES D, VOGENSEN FK, INGMER H. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 293–300, 2003.
- 45) ALEMAYEHU D, O’SULLIVAN E, CONDON S. Changes in acid tolerance of *Lactococcus lactis* during growth at constant Ph. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 215–221, 2000.

- 46) BERESFORD TP, FITZSIMONS NA, BRENNAN NL, COGAN TM. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11: 259–274, 2001.
- 47) GHODDUSI HB, ROBINSON RK. Enumeration of starter cultures in fermented milks. *Journal of Dairy Research*, 63: 151–158, 1996.
- 48) SALAMA MS, MUSAFIJAJEKNIC T, SANDINE WE, GIOVANNONI SC. An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 78: 1004–1017, 1995.
- 49) CHEN YS, YANAGIDA F, SHINOHARA T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 195–200, 2005.
- 50) NOMURA M, KOBAYASHI M, NARITA T, NIRA HK, OKAMOTO T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 396–405, 2006.
- 51) KIMOTO H, NOMURA M, SUZUKI I. Growth energetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in cometabolism of citrate and glucose. *International Dairy Journal*, 9: 857–863, 1999.
- 52) MCSWEENEY MLH. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 57, No 2/3 May/August 2004.
- 53) POZNANSKI E, CAVAZZA A, CAPPÀ F, COCCONCELLI PS. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 141–151, 2004.
- 54) FORTINA MG, RICCI G, ACQUATI A, ZEPPA G, GANDINI A, MANACHINI PL. Genetic characterisation of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20: 397–404, 2003.
- 55) ET VAN HYLCKAMA JV, RADEMAKER JLV, BACHMANN H, MOLENAAR D, KELLY WJ, SIEZEN RJ. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 183–190, 2006.
- 56) Kunji ERS, Slotboom DJ, Poolman B. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610: 97–108, 2003.
- 57) PELAEZ C, REQUENA T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15: 831–844, 2005.
- 58) RANDAZZO CL, VAUGHAN EE, CAGGIA C. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR–DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 1–8, 2006.
- 59) OSTLIE HM, ELIASSEN L, FLORVAAG A, SKEIE S. Phenotypic and PCR–based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 287–299, 2004.
- 60) SANCHEZ JI, ROSSETTI L, MARTINEZ B, RODRIGUEZ A, GIRAFFA G. Application of reverse transcriptase PCR–based T–RFLP to perform semi–quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal of Microbiological Methods*, 65: 268–277, 2006.
- 61) DEASY BM, REA MC, FITZGERALD GF, COGAN TM, BERESFORD TP. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 510–522, 2000.

- 62) GARDE S, BABIN M, GAYA P, NUNEZ M, MEDINA M. PCR amplification of the gene *acmA* differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5151–5153, 1999.
- 63) OUZARI H, HASSEN A, NAJJARI A, ETTOUMI B, DAFFONCHIO D, ZAGOREC M, BOUDABOUS A, MORA D. A novel phenotype based on esterase electrophoretic polymorphism for the differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris*. Letters in Applied Microbiology, 43: 351–359, 2006.
- 64) ZAKOUR NB, GRIMALDI C, GAUTIER M, LANGELLA P, AZEVEDO V, MAGUIN E, LE LOIR Y. Testing of a whole genome PCR scanning approach to identify genomic variability in four different species of lactic acid bacteria. Research in Microbiology, 157: 386–394, 2006.
- 65) MORI S, MORI K, SUZUKI I, KASUMI T. Phylogenetic analysis of *Lactococcus lactis* subspecies based on decoding the sequence of the *pept* tripeptidase gene, the *pepv* dipeptidase gene and 16S rRNA. Systematic and Applied Microbiology, 27: 414–422, 2004.
- 66) JAY JM. Modern Food Microbiology, sixth edition, page 116, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- 67) PICON A, DE TORRES B, GAYA P, NUNEZ M. Cheesemaking with a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein as starter results in a different peptide profile. International Journal of Food Microbiology, 104 (3): 299–307, 2005.
- 68) AWAD S. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. Food Chemistry, 97: 394–400, 2006.
- 69) AMARITA F, DE LA PLAZA M, DE PALENCIA PF, REQUENA T, PELAEZ C. Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. Food Chemistry, 94: 240–246, 2006.
- 70) KRANENBURG RV, KLEEREBEZEM M, Vlieg JVH, URSING BM, BOEKHORST J, SMIT BA, AYAD EHE, SMIT G, SIEZEN RJ. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. International Dairy Journal, 12: 111–121, 2002.
- 71) CENTENO JA, TOMILLO FJ, GARCIA EF, GAYA P, NUNEZ M. Effect of Wild Strains of *Lactococcus lactis* on the Volatile Profile and the Sensory Characteristics of Ewes' Raw Milk Cheese. Journal of Dairy Science, 85: 3164–3172, 2002.
- 72) YVON M, RIJNEN L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal, 11: 185–201, 2001.
- 73) PRIPP AH, SKEIE S, ISAKSSON T, BERGE GI, SORHAUG T. Multivariate modelling of relationships between proteolysis and sensory quality of Prast cheese. International Dairy Journal, 16: 225–235, 2006.
- 74) CAYOT N. Sensory quality of traditional foods. Food Chemistry, 101 (1): 154–162, 2007.
- 75) HOLLAND R, LIU SQ, CROW VL, DELABRE ML, LUBBERS M, BENNETT M, NORRIS G. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. International Dairy Journal, 15: 711–718, 2005.
- 76) HICKEY DK, KILCAWLEY KN, BERESFORD TP, SHEEHAN EM, WILKINSON ME. The influence of a seasonal milk supply on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 16: 679–690, 2006.
- 77) PELAEZ C, REQUENA T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. International Dairy Journal, 15: 831–844, 2005.

- 78) WILKINSON MG, KILCAWLEY KN. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15:817–830, 2005.
- 79) HANNON JA, KILCAWLEY KN, WILKINSON MG, DELAHUNTY CM, BERESFORD TP. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 17: 316–327, 2007.
- 80) ARDÖ Y. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24: 238–242, 2006.
- 81) AYAD EHE, VERHEUL A, DE JONG C, WOUTERS JTM, SMIT G. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*, 9: 725–735, 1999.
- 82) AYAD EHE, VERHEUL A, WOUTERS JTM, SMIT G. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. *International Dairy Journal*, 11: 51–61, 2001.
- 83) SMIT G, SMIT BA, ENGELS WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 591–610, 2005.
- 84) MORALES P, GARCIA EF, GAYA P, NUNEZ M. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 13: 201–209, 2003.
- 85) LIU X, CHUNG YK, YANG ST, YOUSEF AE. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, 40: 13–24, 2005.
- 86) NGA BH. Genome analysis of lactic acid bacteria in food fermentations and biotechnological applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 307–312, 2005.
- 87) REVIRIEGO C, FERNANDEZ A, HORN N, RODRIGUEZ E, MARIN ML, FERNANDEZ L, RODRIGUEZ JM. Production of pediocin PA–1, and coproduction of nisin A and pediocin PA–1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. *International Dairy Journal*, 15: 45–49, 2005.
- 88) VAZQUEZ JA, CABO ML, GONZALEZ MP, MURADO MA. The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria A factorial study. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 319–325, 2004.
- 89) KRAMER NE, VAN HIJUM SAFT, KNOL J, KOK J, KUIPERS OP. Transcriptome Analysis Reveals Mechanisms by Which *Lactococcus lactis* Acquires Nisin Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 50: 1753–1761, 2006.
- 90) KUWANO K, TANAKA N, SHIMIZU T, NAGATOSHI K, NOU S, SONOMOTO K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 396–402, 2005.
- 91) MADIEDO PR, ALTING AC, ZOON P. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *International Dairy Journal*, 15: 155–164, 2005.
- 92) CHAMPAGNE CP, BARRETTE J, ROY D, RODRIGUE N. Fresh-cheesemilk formulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. *Food Research International*, 39: 651–659, 2006.

- 93) DABOURA N, LAPOINTE G, BENHAMOU N, FLISS I, KHEADR EE. Application of ruthenium red and colloidal gold–labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *International Dairy Journal*, 15: 1044–1055, 2005.
- 94) VAN CASTEREN VHM, DIJKEMA C, SCHOLS HA, BELDMAN G, VORAGEN AGJ. Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydrate Polymers*, 37: 123–130, 1998.
- 95) MOZZI F, VANINGELGEM F, HEBERT EM, VAN DER MEULEN R, MORENO MRF, DE VALDEZ GF, DE VUYST L. Diversity of Heteropolysaccharide–Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4431–4435, 2006.
- 96) LIN TY, CHIEN MFC. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100: 1419–1423, 2007.
- 97) KOÇER E, TEKEL Ç, AKÇELİK M. Conjugal transfer and stability of the plasmids determining exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* strains. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 481–487, 2004.
- 98) LOOIJESTEIJN PJ, TRAPET L, DE VRIES E, ABEE T, HUGENHOLTZ J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 71–80, 2001.
- 99) CANQUIL N, VILLARROEL M, BRAVO S, RUBILAR M, SHENE C. Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 68: 270–279, 2007.
- 100) MERBACH MM, RAUSCHER T, HINRICHS J. Inactivation of bacteriophages by thermal and high–pressure treatment. *International Dairy Journal*, 15: 777–784, 2005.
- 101) TROTTER M, MCAULIFFE O, CALLANAN M, EDWARDS R, FITZGERALD GF, COFFEY A, ROSS RP. Genome analysis of the obligately lytic bacteriophage 4268 of *Lactococcus lactis* provides insight into its adaptable nature. *Gene* 366, 189–199, 2006.
- 102) RAHA AR, HOOI WY, MARIANA NS, RADU S, VARMA NRS, YUSOFF K. DNA sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M14. *Plasmid*, 56: 53–61, 2006.
- 103) SANCHEZ MM, DELGADO T, ALONSO L, MAYO B. Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter–free farmhouse cheese. *Food Microbiology*, 17: 449–460, 2000.
- 104) COFFEY A, ROSS RP. Bacteriophage–resistance systems in dairy starter strains: Molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 303–321, 2002.
- 105) SANLIBABA P, AKÇELİK M. Çiğ Süt ve Peynir altı Sularından İzole Edilen Laktokokların Faj Duyarlılıkları. *Turkish Journal of Biology*, 24: 425–435, 2000.
- 106) AKÇELİK M, ŞANLIBABA P. Characterisation of an exopolysaccharide preventing phage adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MA39. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26: 1151–1156, 2002.
- 107) JEONG DW, LEE JH, KIM KH, LEE HJ. A food–grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an a–galactosidase gene as a selection marker. *Food Microbiology*, 23 (5): 468–475, 2006.
- 108) KOBAYASHI M, NOMURA M, FUJITA Y, OHMOMO S, OKAMOTO T. Molecular characterization of a lactococcal plasmid reducing the growth rate of host cells. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37(1): 53–57, 2003.

- 109) BALLESTEROS C, POVEDA JM, VINAS MAG, CABEZAS L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17: 249–255, 2006.
- 110) HERREROS MA, FRESNO JM, PRIETO MJG, TORNADIJO ME. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13: 469–479, 2003.
- 111) GERASI E, TZANETAKI EL TZANETAKIS N. Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek island Sifnos. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 56, No 2, May 2003.
- 112) AUBERT C, CAPELLE N, JEANSON S, ECKERT H, DIVIÈS C, CACHON R, Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Science des Aliments*, 22: 177–187, 2002.
- 113) BEAL C, CORRIEU G. Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398 at the different steps of their production. *Lebensmittel–Wissenschaft Technologie.*, 27: 86–92, 1994.
- 114) CHAMBA JF, PROST F. Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite, *Lait*, 69: 417–431, 1989.
- 115) FONSECA F, BÉAL C, CORRIEU G. Method for quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, 67: 63–80, 2000.
- 116) BULUT C, GUNES H, OKUKLU B, HARSA S, KILIC S, COBAN HS, YENIDUNYA AF. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*, 72: 19–24, 2005.
- 117) SAVIJOKI K, INGMER H, ANEN PV. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394–406, 2006.
- 118) BOUTROU R, SEPULCHRE A, PITEL G, DURIER C, VASSAL L, GRIPON JC, MONNET V. Lactococcal lysis and curd proteolysis: two predictable events important for the development of cheese flavour. *International Dairy Journal*, 8: 609–616, 1998.
- 119) DE LA PLAZA M, RODRIGUEZ A, DE PALENCIA PF, CUESTA MCM, PELAEZ C, REQUENA T. Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Applied Microbiology*, 43: 637–644, 2006.
- 120) DE PALENCIA PF, DE LA PLAZA M, AMARITA F, REQUENA T, PELAEZ C. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 88–93, 2006.
- 121) TANOUS C, GORI A, RIJNEN L, CHAMBELLON E, YVON M. Pathways for α-ketoglutarate formation by *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 15: 759–770, 2005.
- 122) LYNCH CM., MCSWEENEY PLH, FOX PF, COGAN TM, DRINAN FD. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*, 77: 441–459, 1997.
- 123) TANOUS C, CHAMBELLON E, LE BARS D, DELESPAUL G, YVON M. Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1402–1409, 2006.

- 124) SMIT BA, VLIEG J, ENGELS WJM, MEIJER L, WOUTERS JTM, SMIT G. Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain alpha-keto acid decarboxylase involved in flavor formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 303–311, 2005.
- 125) CUESTA MCM, REQUENA T, PELAEZ C. Permeabilization and lysis induced by bacteriocins and its effect on aldehyde formation by *Lactococcus lactis* *Biotechnology Letters*, 28: 1573–1580, 2006.
- 126) LORTAL S, CHARTIER MPC. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15: 857–871, 2005.
- 127) DESCHAMPS MB, LE BARS D, YVON M, CHARTIER MPC. Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *International Dairy Journal*, 14: 791–800, 2004.
- 128) PILLIDGE CJ, RALLABHANDI PSVS, TONG XZ, GOPAL PK, FARLEY PC, SULLIVAN PA. Autolysis of *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 12: 133–140, 2002.
- 129) GAUDREAU H, FLISS I, CHAMPAGNE CP. Stability of autolytic lactococci during starter production and storage in commercial whey-based media. *International Dairy Journal*, 16: 200–206, 2006.
- 130) PSONI L, TZANETAKIS N, TZANETAKI EL. Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food Control*, 17: 533–539, 2006.
- 131) TAVARIA FK, TAVARES TG, FERREIRA ACS, MALCATA FX. Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese. *International Dairy Journal*, 16: 886–894, 2006.
- 132) FALLICO V, TUMINELLO L, PEDILIGGIERI C, HORNE J, CARPINO S, LICITRA G. Proteolysis and microstructure of piacentinu ennese cheese made using different farm technologies. *Journal of Dairy Science*, 89: 37–48, 2006.
- 133) GARDE S, AVILA M, MEDINA M, NUNEZ M. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on the volatile compounds, odour and aroma of Hispanico cheese. *International Dairy Journal*, 15: 1034–1043, 2005.
- 134) YVON M, BERTHELOT S, GRIPON JC. Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal*, 8: 889–898, 1998.
- 135) Tulum Peyniri yapım kuralları, Türk Standardı TS 10936 ICS 67.100.30, Nisan 1993.
- 136) KLEEREBEZEM M, HOLS P, HUGENHOLTZ J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 840–848, 2000.
- 137) RODRIGUEZ E, CALZADA J, ARQUES JL, RODRIGUEZ JM, NUNEZ M, MEDINA M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15: 51–57, 2005.
- 138) ZENDO T, KOGA S, SHIGERI Y, NAKAYAMA J, SONOMOTO K. Lactococcin Q, a Novel Two-Peptide Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3383–3389, 2006.
- 139) MATARAGAS M, METAXOPOULOS J, GALIOTOU M, DROSINOS EH. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64: 265–271, 2003.



- 140) GRATTEPANCHE F, AUDET P, LACROIX C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*, 17 (2): 123–132, 2007.
- 141) HERNANDEZ D, CARDELL E, ZARATE E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 77–84, 2005.
- 142) CHANDRAPATI S, O’SULLIVAN DJ. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*, 63: 229–233, 1998.
- 143) CHANDRAPATI S, O’SULLIVAN DJ. Nisin independent induction of the nisA promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 191–198, 1999.
- 144) JAY JM. *Modern Food Microbiology*, sixth edition, page 269–270, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- 145) HURST A. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27: 85–123, 1981.
- 146) JAY JM. *Modern Food Microbiology*, sixth edition, page 184, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 2000.
- 147) JOZALA AF, DE LENCASTRE NLC, CHOLEWA O, MORAES D, PENA TCV. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African Journal of Biotechnology*, 4 (3): 262–265, 2005.
- 148) WARDANI AK, EGAWA S, NAGAHISA K, SHIMIZU H, SHIOYA S. Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 28 (3): 220–230, 2006.
- 149) CHEIG CI, CHOI HJ, PARK H, KIM SB, KOOK MC, KIM TS, HWANG JK, PYUN YR. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95: 225–235, 2002.
- 150) TAKALA TM. Nisin Immunity and Food-Grade Transformation in Lactic Acid Bacteria. doctoral thesis, Helsinki 2005.
- 151) Gıda Maddelerinde Kullanılan Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Katkı Maddelerinin Sağlık Kriterleri Tebliği, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 10.04.2002–24722 R.Gazete, Tebliğ No 2002/ 28.
- 152) LE LOIR Y, AZEVEDO V, OLIVEIRA SC, FREITAS DA, MIYOSHI A, HUMARÁN LGB, NOUAILLE S, RIBEIRO LA, LECLERCQ S, GABRIEL JE, GUIMARAES VD, OLIVEIRA MN, CHARLIER C, GAUTIER M, LANGELLA P. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories*, 4:2, 2005.
- 153) JEONG DW, CHOI YC, LEE JM, KIM JH, LEE JH, KIM KH, LEE HJ. Isolation and characterization of promoters from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LM0230. *Food Microbiology*, 23: 82–89, 2006.
- 154) GELLER BL, NGO HT, MOONEY DT, SU P, DUNN N. Lactococcal 936-Species Phage Attachment to Surface of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*. 88: 900–907, 2005.
- 155) MADERA C, GARCIA P, JANZEN T, RODRIGUEZ A, SUAREZ JE. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 213–222, 2003.

- 156) HICKS CL, SAFKO PAC, SURJAWAN I, LEARY JO. Use of bacteriophage-derived peptides to delay phage infections. *Food Research International*, 37: 115–122, 2004.
- 157) RIO BD, BINETTI AG, MARTIN MC, FERNANDEZ M, MAGADAN AH, ALVAREZ MA. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology*, 24: 75–81, 2007.
- 158) LE COQ AMC, CANTELE F, LANZAVECCHIA S, MARCO S. Insights into structural proteins of 936-type virulent lactococcal bacteriophages. *Archives of Virology*, 151: 1039–1053, 2006.
- 159) SEEGERS JFML, MC GRATH S, O’CONNELL MM, ARENDT EK, VAN DE GUCHTE M, CREA VEN M, FITZGERALD GF, VAN SINDEREN D. Molecular and transcriptional analysis of the temperate lactococcal bacteriophage Tuc2009. *Virology* 329: 40–52, 2004.
- 160) DEVEAU H, LABRIE SJ, CHOPIN MC, MOINEAU S. Biodiversity and Classification of Lactococcal Phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4338–4346, 2006.
- 161) VINDEROLA CG, REINHEIMER JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36: 895–904, 2003.
- 162) CHAMPAGNE CP, GARDNER NJ. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 61–84, 2005.
- 163) OBODAI M, DODD CER. Characterization of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, nyarmie, by culture- and nonculture-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1355–1363, 2006.
- 164) KOK J, BUIST G, ZOMER AL, VAN HIJUM SAFT, KUIPERS OP. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 411–433, 2005.
- 165) POT B, DEVRIESE LA, URSI D, VANDAMME P, HAESEBROUCK F, KERSTERS K. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 213–222, 1996.
- 166) KLIJN N, WEERKAMP AH DE VOS WM. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 788–792, 1995.
- 167) CALLON C, MILLET L, CHRISTINE M. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese Montel. *Journal of Dairy Research*, 71: 231–244, 2004.
- 168) FLOREZ AB, DIAZ TML, ALVAREZ P, MAYO B. Microbial characterisation of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 223: 503–508, 2006.
- 169) BASCOMB S, MANAFI M. Use of enzyme tests in characterization and Identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 318–340, 1998.
- 170) VAID A, BISHOP AH. Amplification of fluorescently labelled DNA within Gram-positive and acid-fast bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 38: 53–62, 1999.
- 171) ADAMBERG K, KASK S, LAHT TM, PAALME T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 171–183, 2003.

- 172) GUILLOT A, GITTON C, ANGLADE P, MISTOU MY. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics*, 3: 337–354, 2003.
- 173) LLANEZ MJT, CORDOBA BV, CINCO MED, MANZANO MAM, CORDOVA AFG. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*, 17 (9): 683–690, 2006.
- 174) TEIXEIRA LM, MERQUIOR VLC, VIANNI MCE, CARVALHO MGS, FRACALANZZA SEL, STEIGERWALT AG, BRENNER DJ, FACKLAM RR. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 664–668, 1996.
- 175) DELGADO S, MAYO M. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 309–319, 2004.
- 176) GAYA P, BABIN M, MEDINA M, NUNEZ M. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 849–855, 1999.
- 177) HEAP HA. Optimising starter culture performance in NZ cheese plants. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53: 74–78, 1998.
- 178) SALAMA M, SANDINE W, GIOVANNONI, SJ. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3941–3945, 1993.
- 179) MANNU L, PAB A. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 55–62, 2002.
- 180) OBIS D, GUILLOT A, MISTOU MY. Tolerance to high osmolality of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *FEMS Microbiology Letters*, 202: 39–44, 2001.
- 181) PSONI P, TZANETAKIS N, TZANETAKI EL. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greekcheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, 20: 575–582, 2003.
- 182) PISANO MB, FADDA ME, DEPLANO M, CORDA A, COSENTINO S. Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, Vol 59, No 3 August 2006.
- 183) DI CAGNO R, BUCHIN S, DE CANDIA S, DE ANGELIS M, FOX PF, GOBBETTI M. Characterization of Italian Cheeses ripened under nonconventional conditions. *Journal of Dairy Science*, 90: 2689–2704, 2007.
- 184) ZARATE V, BELDA F, PEREZ C, CARDELL E. Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7: 635–641, 1997.
- 185) MANNU L, PABA A, PES M, SCINTU MF. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 191–197, 2000.
- 186) MADRAU MA, MANGIA NP, MURGIA MA, SANNA MG, GARAU G, LECCIS L, CAREDDA M, DEIANA P. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International Dairy Journal*, 16: 876–885, 2006.

- 187) BOSTAN K, UĞUR M, AKSU H. Deri ve plastik bidonlar içinde satışı sunulan tulum peynirlerinin duysal, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Pendik Hayv. Hast. Merk. Araşt. Enst. Derg., 23 (1): 75–83, 1992.
- 188) TEKİNŞEN OC, NIZAMLIOĞLU M, KELEŞ A, ATASEVER M, GÜNER A. Tulum peyniri üretiminde yarı sentetik kılıfların kullanılabilme imkanları ve vakum ambalajlamanın kaliteye etkisi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 14 (2): 63–70, 1998.
- 189) GÜVEN M. İnek, koyun ve keçi sütlerinden üretilen ve farklı ambalajlarda olgunlaştırılan Tulum peynirlerinin özellikleri üzerine karşılaştırmalı bir araştırma. Doktora tezi, Çukurova Üniv., Adana, Türkiye, 1993.
- 190) GÜVEN M, KONAR A. Ankara, İstanbul ve Adana piyasalarında farklı ambalajlarda satılan Tulum peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri ve standarda uygunluğu. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 19: 287–291, 1995.
- 191) GÜVEN M, KONAR A. İnek sütlerinden üretilen ve farklı materyallerde olgunlaştırılan Tulum peynirlerinin fiziksel, kimyasal ve duysal özellikleri. Gıda, 19: 287–293, 1994b.
- 192) KURT A, ÇAKMAKCI S, ÇAĞLAR A, AKYÜZ N. Erzincan Tulum (Şavak) Peynirinin yapılışı, duysal, fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde bir araştırma. Gıda, 16: 295–302, 1991a.
- 193) ÖNER Z, ŞİMŞEK B, SAĞDIÇ O. Determination of some properties of Turkish Tulum cheeses. Milchwissenschaft, 58: 152–154, 2003.
- 194) PATIR B, ATEŞ G, DİNÇOĞLU AH. Geleneksel yöntemle üretilen Tulum peynirinin olgunlaştırılması sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve kimyasal değişimler üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 15: 1–8, 2001.
- 195) ŞENGÜL M, ÇAKMAKÇI S. Erzincan Tulum (Şavak) peynirinin bazı kalite kriterleri üzerine ambalaj materyali ve olgunlaşma süresinin etkisi. Doğu Anadolu Tarım Kongresi, Erzurum, Türkiye, sayfa, 1687–1698, 1998.
- 196) KELEŞ A, ATASEVER M. Divle Tulum Peynirinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duysal kalite nitelikleri. Süt Teknolojisi, 1(1): 47–53, 1996.
- 197) TARAKÇI Z, KÜÇÜKÖNER E, SANCAK H, EKICI K. İnek sütünden üretilerek cam kavanozlarda olgunlaştırılan tulum peynirinin bazı özellikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16 (1): 9–14, 2005.
- 198) GÜVEN M, KANAR A. İnek sütlerinden üretilen ve farklı ambalajlarda olgunlaştırılan tulum peynirlerinin mikrobiyolojik özellikleri. Gıda, 19 (3): 179–185, 1984.
- 199) ÖZTÜRK YG, NAZLI B. Deneysel olarak enfekte edilen sütle yapılan tulum peynirlerinde *Brucella melitensis*' in mevcudiyeti üzerine araştırmalar. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 27 (2): 123–142, 1996.
- 200) ÇAĞLAR A. Çiğ süttten üretilen ve farklı ambalajlama materyallerinde olgunlaştırılan Erzincan Tulum peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerindeki değişimler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 32: 285–292, 2001.
- 201) GÜVEN M, KONAR A, KLEEBERGER A. İnek, koyun ve keçi sütlerinden üretilen ve deri tulumlarda farklı sürelerde olgunlaştırılan Tulum peynirlerinin bazı mikrobiyolojik özelliklerinin saptanması üzerinde karşılaştırmalı bir araştırma. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 19: 293–298, 1995.
- 202) GÜVEN M, KONAR A. İnek sütlerinden üretilen ve farklı materyallerde olgunlaştırılan Tulum peynirlerinin mikrobiyolojik özellikleri. Gıda, 19: 179–185, 1994a.

- 203) KURT A, ÇAĞLAR Y, ÇAKMAKCI S, AKYÜZ N. Erzincan Tulum (Şavak) Peynirinin mikrobiyolojik özellikleri. Doğa Turkish Journal of Veterinary and Animals Sciences, 16: 41–50, 1991b.
- 204) ŞENGÜL M, TÜRKOĞLU H, ÇAKMAKÇI S, CON AH. Effect of casing materials and ripening period on some microbiological properties of Tulum cheese. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4: 854–857, 2001.
- 205) PATIR B, ATEŞ G, DINÇOĞLU AH, KÖK F. Elazığ'da tüketime sunulan Tulum peynirinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi ile laktik asit bakterileri üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 14: 75–83, 2000.
- 206) ARICI M, ŞİMŞEK O. Kültür kullanımının tulum peynirinin duyusal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi. Gıda, 16 (1): 53–62, 1991.
- 207) BOSTAN K. Tulum peynirlerinde starter kültür kullanılabilirliği üzerine bir araştırma. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi İstanbul, 1991.
- 208) ATEŞ G, PATIR B. Starter kültürlü tulum peynirinin olgunlaşması sırasında duyusal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 15(1): 45–56, 2001.
- 209) BOSTAN K, UĞUR M. Tulum peynirinde starter kültür kullanım olanakları. II. Uluslararası Gıda Sempozyumu, Bursa, Türkiye, sayfa 212–225, 2001.
- 210) ATEŞ G, PATIR B. Starter kültürlü tulum peynirinin olgunlaşması sırasında duyusal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 15(1): 45–56, 2001.
- 211) KILIÇ S, VE GÖNÇ S. İzmir Tulum peynirinin olgunlaşmasında rol oynayan mikroorganizma gruplarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. E.U. Ziraat Fak. Derg., 29: 71–78, 1992.
- 212) ÖKSÜZTEPE G, PATIR B, ÇALICIOĞLU M. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum Cheese. Turk J Vet Anim Sci., 29: 873–879, 2005.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın her döneminde bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Gül Ece SOYTEMİZ'e, çalışma süresince yardım ve katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Recep ÇIBİK'a, çalışma kısmında hep benimle beraber olan ADÜ–Veteriner Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Ergün Ömer GÖKSOY ve Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a, cihazlarını kullanmamda her zaman yardımcı olan ADÜ–Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA'ya ve Araş. Gör. Serten TEKBIYIK'a, referans starter kültürleri temin etmesinden dolayı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Araş. Gör. Burcu OKUKLU'ya, tezimin yapımında her zaman yanımda olduğunu maddi manevi hissettiren ADÜ Tıp Fakültesi genel sekreteri Sn. Orhan SAVAŞ'a, tüm desteğinden ve sabrından dolayı Şenay AKÇA'ya ve yardımları olan herkese çok teşekkür ederim.

Ve tabii ki siz ailem, her şey için çok teşekkürler, iyi ki varsınız...

## **ÖZGEÇMİŞ**

1977 yılında İzmir’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İzmir’in Selçuk ilçesinde tamamladım. 1995 yılında girmiş olduğum Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2000 yılında mezun oldum. 2001 yılında Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım.