T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÖRESEL BAZI PEYNİRLERDEKİ *ENTEROCOCCUS* CİNSİ BAKTERİLERİN MALDI-TOF-TOF-MS YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Furkan AYDIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ

AKSARAY, 2017

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 162324302 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, "Furkan AYDIN", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Yöresel Bazı Peynirlerdeki *Enterococcus* Cinsi Bakterilerin MALDI-TOF-TOF-MS Yöntemi ile Tanımlanması" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ**
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Özen ÖZBOY ÖZBAŞ**
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR**
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Teslim Tarihi : 16 Kasım 2017

Savunma Tarihi : 07 Aralık 2017

ÖNSÖZ

Peynir, insan beslenmesinde önemli yer tutan hayvansal gıdalar arasındadır. Pastörizasyon işlemi uygulanmaksızın çiğ sütten üretilen geleneksel peynirler birçok muhtemel gıda patojeni ve fırsatçı patojen için gerekli besin maddelerini içermektedir. Düşük pH ve yüksek konsantrasyonlarda tuz içeren salamurada canlılıklarını devam ettirebilen ve fırsatçı patojen olarak değerlendirilen enterokokların peynirdeki varlığı tartışmaya açık bir konudur. Starter kültür olarak kullanılma potansiyeli olan enterokokların izolasyonu ve tanımlanmasının yapılması çalışmanın ilk basamağını oluşturmaktadır. Tanımlamada geleneksel yöntemlerin uzun sürmesi ve bazı türlerin tanımlanmasında yetersiz kalması, genotipik yöntemlerin de altyapı ve deneyim gerektirmesinden ve pahalı olmasından dolayı alternatif bir yöntem olan kütle spektrometresi (MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper) kullanılmıştır. Ek olarak, birbirine benzer üretim yöntemleri ile üretilen 4 farklı geleneksel peynirin kimyasal özellikleri bakımından istatistiki açıdan benzerlikleri de araştırılmıştır.

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Furkan AYDIN



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, tezimin hazırlanmasında yardımlarını ve yönlendirmelerini esirgemeyerek büyük katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa ARDIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans süresince her aşamada destek olan Aksaray Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Prof. Dr. Özen ÖZBOY ÖZBAŞ'a teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca birçok aşamada desteğini benden esirgemeyen sevgili meslektaşım ve mesai arkadaşım Arş. Gör. H. İbrahim KAHVE'ye teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca beni destekleyen ve bilgilerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Deniz KOÇAN hocama teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgileriyle bana yön veren Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a ve Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

İstanbul Kültür Üniversitesi'nde görev yapan Arş. Gör. Damla YANMIŞ'a, İnşaat Mühendisliği Bölümü ve Harita Mühendisliği Bölümü mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Can ERENSON'a ve Arş. Gör. Cemil GEZGİN'e, teknik desteklerinden dolayı Aksaray Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü asistan ve hocalarına teşekkür ederim.

Son olarak, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve bana her konuda destek olan babam Ş. Adil AYDIN'a, annem Nuray AYDIN'a ve ailemin diğer fertlerine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ... **ii**
DOĞRULUK BEYANI ... **iii**
TEŞEKKÜR ... **iv**
İÇİNDEKİLER ... **v**
ÖZET ... **viii**
ABSTRACT ... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ... **x**
ÇİZELGELER DİZİNİ ... **xi**
SİMGELER DİZİNİ ... **xii**
KISALTMALAR DİZİNİ ... **xiii**
1. GİRİŞ ... **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ ... **4**
2.1 Geleneksel Peynirler ... 4
2.1.1 Antep peyniri ... 5
2.1.2 Urfa peyniri ... 6
2.1.3 Malatya peyniri ... 7
2.1.4 Maraş peyniri ... 8
2.2 Geleneksel Peynirler ve Laktik Asit Bakterileri ... 8
2.3 Enterokoklar ... 10
2.4 *Enterococcus* spp. Türü Bakterilerin Fonksiyonel Özellikleri ... 12
2.4.1 Aroma oluşturma ... 12
2.4.2 Proteolitik Aktivite ... 13
2.4.3 Lipolitik aktivite ... 14
2.4.4 Antimikrobiyal aktivite ... 15
2.4.4 Probiyotik özellikleri ... 16
2.5 Enterokokların Patojenitesi ... 16
2.5.1 Antibiyotik direnci ... 16
2.5.2 Virülens Faktörler ... 17
2.6 Enterokokları Tanımlama Yöntemleri ... 18
2.6.1 Fenotipik yöntemlere dayalı tanımlama ... 18

Sayfa

2.6.1.1 Morfolojik yöntemlere dayalı tanımlama 19
2.6.1.2 Biyokimyasal yöntemlere dayalı tanımlama..... 19
2.6.2 Moleküler Yöntemlere Dayalı Tanımlama 20
2.6.3. MALDI-TOF-MS ile tanımlama 21
3. MATERYAL VE METOT 26
3.1 Materyal..... 26
3.2 Metot 26
3.2.1 Enterokok suşlarının izolasyonu ve saflaştırılması..... 26
3.2.1.1 Enterokok suşlarının izolasyonu..... 26
3.2.1.2 İzolatların saflaştırılması 26
3.2.2 Enterokokların ön identifikasyonları 27
3.2.2.1 Katalaz reaksiyonu..... 27
3.2.2.2 Gram reaksiyonu..... 28
3.2.3 Saf kültürlerin muhafazası..... 28
3.2.4 *Enterococcus* spp. türlerinin MALDI-TOF-TOF-MS yöntemi ile tanımlanması..... 28
3.2.4.1 Kültürlerin aktifleştirilmesi 28
3.2.4.2 Organik çözücünün hazırlanması ve matriks ile karıştırılması..... 29
3.2.4.3 MALDI-TOF-TOF-MS plakasının hazırlanması..... 29
3.2.4.4 İzolatların tanımlanması 29
3.2.5 Peynir örneklerinin kimyasal analizleri 30
3.2.5.1 Kurumadde tayini 30
3.2.5.2 Protein tayini..... 30
3.2.5.3 Yağ tayini..... 30
3.2.5.4 Tuz tayini..... 31
3.2.5.5 Kül tayini 31
3.2.5.6 Asidite tayini..... 31
3.2.5.7 pH tayini 31
3.2.6 İstatistiksel analizler 31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 32
4.1 Enterokokların Sayım Sonuçları..... 32
4.2 *Enterococcus* spp. İzolasyon Sonuçları..... 34
4.3 MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper Tanımlama Sonuçları..... 34
4.4 Peynir Örneklerinin Kimyasal Analiz Sonuçları..... 44
4.4.1 Antep peynirlerinin kimyasal özellikleri 46
4.4.2 Urfa peynirlerinin kimyasal özellikleri..... 48

Sayfa

4.4.3 Malatya peynirlerinin kimyasal özellikleri 49
4.4.4 Maraş peynirlerinin kimyasal özellikleri 51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ..... 66

ÖZET

YÖRESEL BAZI PEYNİRLERDEKİ *ENTEROCOCCUS* CİNSİ BAKTERİLERİN MALDI-TOF-TOF-MS YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Bu çalışma kapsamında, geleneksel yollarla, çiğ sütten üretilen ve genel olarak sıkma peyniri olarak adlandırılan Antep, Urfa, Malatya ve Maraş peynirlerinden *Enterococcus* cinsi bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Ön identifikasyonları Gram ve katalaz reaksiyonları ve morfolojik testler ile yapılan izolatlar cins düzeyinde *Enterococcus* spp. olarak değerlendirilmiştir. Saflık kontrolü yapılan 84 izolat daha sonra -24˚C'de muhafaza edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanısı Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-TOF-MS) yöntemi ile yapılmıştır. Tanımlama sonucuna göre 84 izolattan 32'si *E. faecalis*, 31'i *E. faecium*, 13'ü *E. durans*, 4'ü *E. gallinarum*, 3'ü *E. casseliflavus* ve 1'i de *E. thailandicus* olarak tanımlanmıştır. Tanımlaması yapılan 84 izolatın 66 tanesi 3,000 ≥ GA ≥ 2,300 güven aralığında bulunurken tür düzeyinde %78,57'lik oranında bir tanımlama sağlanmıştır. Öte yandan, karşılaştırılması yapılan 4 peynir grubundan enterokok sayısı bakımından Antep ve Urfa peynirleri arasında anlamlı fark belirlenirken ($p<0,05$), Malatya ve Maraş peynirleri arasında istatistiki açıdan bir fark tespit edilememiş ve Antep peynir grubu, Malatya ve Maraş peynir gruplarıyla istatistiki açıdan enterokok sayıları bakımından benzer bulunmuştur. Peynir grupları kimyasal özellikleri bakımından değerlendirildiğinde ise kurumadde içeriği yönünden önemli bir farka rastlanmamış ($p>0,05$), kül değerlerinde ise Maraş peynirinin diğer üç grup ile önemli derecede farklılık gösterdiği ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. Protein içerikleri incelendiğinde Maraş ve Urfa, yağ değerleri incelendiğinde Antep ve Maraş, tuz içerikleri incelendiğinde Maraş ve Antep, titrasyon asitliği incelendiğinde Antep ve Urfa peynirleri istatistiki açıdan benzerlik gösterirken, pH değerleri bakımından Antep peynirinin diğer 3 peynir grubundan farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. ($p<0,05$).

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus*, MALDI-TOF-TOF-MS, Biotyper, Geleneksel peynirler.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *ENTEROCOCCUS* GENUS BY MALDI-TOF-TOF-MS IN SOME TRADITIONAL CHEESES

Within the scope of this study, isolation and identification of *Enterococcus* spp. from Antep, Urfa, Malatya and Maras cheeses, which are produced from raw milk by traditional methods and generally called as squeezed cheeses, were studied. Isolates whose pre-identifications made by Gram, katalaz and morphological tests were evaluated to be *Enterococcus* spp according to specifications. 84 isolates were then stored at -24°C after purity control. Identification on species level was done by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight- Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-TOF-MS) method. Out of 84 isolates, 32 *E. faecalis*, 31 *E. faecium*, 13 *E. durans*, 4 *E. gallinarum*, 3 *E. casseliflavus* and 1 *E. thailandicus* were identified. Sixty six of the identified 84 isolates were found at a confidence interval of $3.000 \geq ID \geq 2.300$, and a correct identification of 78.57% was achieved on species level. On the other hand, there was a statistically significant difference between the Antep and Urfa cheeses in terms of the number of enterococci ($p < 0.05$), whereas, no statistically significant difference was found between Malatya and Maraş cheeses. In addition, Antep cheeses were statistically found similar with Malatya and Maraş cheeses. When the cheese groups were evaluated according to chemical compositions, there was no significant difference in terms of dry matter content ($p > 0.05$), whereas ash values of Maraş cheese group differ significantly from the other three groups ($p<0.05$). In terms of protein contents, Maraş and Urfa cheeses, in terms of fat content Antep and Maraş cheeses, in terms of salt content Maraş and Antep cheeses, in terms of total acidity Antep and Urfa cheeses were found statistically similar. Lastly, in terms of pH values, Antep cheeses were found to be statistically different from other 3 cheese groups ($p<0.05$).

Key Words: *Enterococcus*, MALDI-TOF-TOF-MS, Biotyper, Traditional cheeses.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1: KEA üzerinde tipik enterokok kolonileri ve saflaştırma basamakları..... 27
Şekil 3.2: Saflaştırılmış izolatların gram reaksiyonlarının mikroskoptaki görüntüsü. 28
Şekil 3.3: MALDI-TOF-TOF-MS plakası ve cihaza yerleştirilmesi..... 29
Şekil 4.2: *Enterococcus faecalis* DSM 20478T suşuna ve P_4E_1 izolatına ait spektrum..... 41
Şekil 4.3: *Enterococcus faecium* 11037 CHB suşuna ve P_6E_4 izolatına ait spektrum..... 42
Şekil 4.4: *Enterococcus durans* DSM 20633T suşuna ve P_20E_4 izolatına ait spektrum..... 42
Şekil 4.5: *Enterococcus gallinarum* DSM 20628T suşuna ve $P_{12}E_2$ izolatına ait spektrum..... 43
Şekil 4.6: *Enterococcus casseliflavus* DSM 20628T suşuna ve $P_{18}E_3$ izolatına ait spektrum..... 43
Şekil 4.7: *Enterococcus thailandicus* DSM 21767T suşuna ve P_3E_5 izoaltına ait spektrum..... 44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Antep peynirine ait bazı kimyasal özellikler. 5
Çizelge 2.2: Urfa peynirine ait bazı kimyasal özellikler. 7
Çizelge 2.3: Maraş peynirine ait bazı kimyasal özellikler. 8
Çizelge 2.4: Enterokok gruplarına ait bakteri türleri. 11
Çizelge 2.5: Bazı enterokok türlerinin biyokimyasal özellikleri. 19
Çizelge 2.6: MALDI-TOF-MS yönteminin bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlama etkinliği. 23
Çizelge 2.7: Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan metodların karşılaştırılması. 23
Çizelge 2.8: Geleneksel yollarla üretilen peynirlerin enterokok mikroflorası. 24
Çizelge 3.1:İzolasyon materyalleri. 26
Çizelge 4.1: Peynir örneklerinin enterokok sayım sonuçları ve peynir gruplarının Duncan testi sonuçları (log kob/g). 32
Çizelge 4.2: Çalışma kapsamında izole edilen enterokokların izolasyon kaynağı ve sayısı 34
Çizelge 4.3: Enterokokların MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper tanımlama sonuçları ve güven aralıkları 35
Çizelge 4.4: Tanımlanan enterokok türleri ve toplamdaki sayı ve yüzdeleri. 36
Çizelge 4.5: Peynir grupları ve enterokok dağılımları. 37
Çizelge 4.6: MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper cihazının güven aralıklarının anlamları. 40
Çizelge 4.7: MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper cihazının güven aralıklarına göre tanımlanan izolat sayıları. 41
Çizelge 4.8: Peynir örneklerinin kimyasal analiz sonuçları. 45
Çizelge 4.9: Peynir gruplarına ait bazı kimyasal özelliklerin Duncan testi ile karşılaştırılması. 45
Çizelge 4.10: Antep peynirinin bazı kimyasal özellikleri. 46
Çizelge 4.11: Urfa peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri. 48
Çizelge 4.12: Malatya peynirinin bazı kimyasal özellikleri. 50
Çizelge 4.13: Maraş peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri. 51

SİMGELER DİZİNİ

˚C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
g	Gram
Hz	Hertz
KOB	Koloni oluşturan birim
mL	Mililitre
N	Normalite

KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril solüsyonu
agg	Agregasyon faktörü
$AgNO_3$	Gümüş nitrat
API 20 CH	20 Karbonhidratlı API biyokimyasal test kiti
API 50 CH	50 Karbonhidratlı API biyokimyasal test kiti
API ZYM	API enzimatik test kiti
bp	Baz çifti
CASO Agar	Casein-peptone Soymeal-peptone Agar
CASO Broth	Casein-peptone Soymeal-peptone Broth
Cob	Cinsiyet hormonu
***cyl*A**	Sitolizin A
***cyl*B**	Sitolizin B
ddH2O	Çift distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
e*fa*A*fm*	Adezyon A proteini fm
e*fa*A*fs*	Adezyon A proteini fs
esp	Enterokok yüzey proteini
gelE	Jelatinaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
HCCA	α-Siyano-4-Hidroksisinnamik Asit
HCl	Hidroklorik asit
K_2CrO_4	Potasyum kromat
KEA Agar	Kanamisin Eskulin Azid Agar
KOB	Koloni oluşturan birim
LRA Zym	LRA Hızlı enzimatik test kiti

MALDI-TOF-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight- Time of Flight-Mass Spectrometry
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	Sodyum hidroksit
NSLAB	Starter olmayan laktik asit bakterileri
PDO	Orijini korunan peynirler
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD-PZR	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rep-PZR	Tekrarlanan Palindromlara Dayalı- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP-PZR	Fragment Uzunluk Polimorfizmi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Taq	*Thermus aquaticus*
TFA	Trifluoroasetik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Peynir, çiğ sütün direkt olarak veya pastörize sütün starter kültür eklenerek rennet gibi proteolitik enzimler ile pıhtılaştırılmasıyla elde edilen fermente bir süt ürünüdür. İçerdiği protein, yağ, mineral maddeler ve probiyotik karakterdeki laktik asit bakterilerini barındırmasından dolayı insan beslenmesinde oldukça önemli bir gıda ürünüdür.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) süt ve süt ürünleri üretimi Temmuz 2017 verilerine göre, inek sütünden peynir üretimi 53.675 ton ile bir önceki yılın Temmuz ayına göre %10 oranında artış gösterirken koyun, keçi, manda ve karışık sütlerden elde edilen peynir çeşitleri ise 3.422 ton üretim ile %26,7 oranında artış göstermiştir (TÜİK, 2017). Türkiye'de üretilen peynirlerin genel anlamda tüketim oranlarını yaklaşık olarak %60'ını beyaz peynir, %17'sini kaşar peyniri, %12'sini tulum ve Mihaliç peynirleri ve geri kalan %11'ini ise yerel olarak üretilen geleneksel peynirler oluşturmaktadır (Kamber, 2015). Destek Patent A.Ş. tarafından yapılmış olan çalışmaya göre Türkiye'de 193 peynir çeşidinin üretildiği bildirilmektedir (URL-1).

Türkiye'de starter kültür kullanılmadan, geleneksel yollarla üretilen birçok yöresel peynir çeşidi mevcuttur. Bu peynirlerin üretiminde belli bir standardın olmaması son ürünün kalitesini ustanın becerisine bağlı bırakmaktadır. Ülkemizde geleneksel yollarla üretilen peynirlerin ne yazık ki çok az bir kısmı kendisine endüstriyel boyutta yer bulabilmektedir (Özer vd., 2002). Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde sıklıkla tüketilen Gaziantep sıkma, Maraş parmak/sıkma, Malatya kaynamış ve Urfa peynirleri pasta filata (telemesi haşlanan) grubu peynirlere örnektir. Bu tip yöresel peynirler, kullanılan çiğ sütün türü, telemenin baskılanma ve haşlanma aşamaları ile salamurada muhafazaları bakımından birbirlerine benzer özellik gösterir (Tekinşen, 2001).

Enterococcus cinsi bakteriler Gram (+), katalaz (-), morfolojik olarak kok şeklinde bulunup laktik asit bakterileri grubunda yer almaktadır (Klein vd., 1998). Bu bakteriler insan ve hayvan bağırsak mikroflorasının birer parçası olmasına karşın

aynı zamanda geleneksel yollarla üretilen fermente ürünlerde de yaygın olarak bulunmaktadır (Tuncer vd., 2013). Fermente süt ürünlerinde enterokok cinsi bakteriler arasında sıklıkla rastlanan türler arasında *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* yer almaktadır (Giraffa, 2003). Bağırsak kökenli olan enterokokların süt ve ürünlerinde bulunmaları her ne kadar pastorizasyondan sonra gerçekleşen bir kontaminasyonu gösterse de peynirin aromasının oluşmasına katkıda bulunmaları, bakteriyosin üretmeleri gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı son yıllarda probiyotik etkileri ve virülens faktörleri araştırılmış ve birçok araştırmanın konusu olmuştur.

Enterococcus cinsi bakterilerin tanımlanmasında fenotipik, serolojik veya genotipik, yöntemler ile kütle spektrometresi kullanılabilir. Fakat klasik yöntemlerin uzun sürmesi, güvenilirliliğinin daha düşük olması ve ciddi zaman alıcı özelliklerinden dolayı genotipik yöntemlere göre dezavantajları bulunmaktadır (Çakır ve Çakmakçı, 2005). Özellikle 2000'li yılların başından beri gün geçtikçe kullanımı artan genotipik yöntemler, biyokimyasal yöntemlere göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve türleri birbirinden ayırma konularında daha üstündür. Ayrıca, geleneksel yöntemlerde moleküler yöntemlere göre istatistiksel ve metodolojik hata olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bunlara ek olarak geleneksel analiz yöntemleri uygulandığında izolasyon ve identifikasyon için gerekli süre bir hayli uzun olup laboratuvar yükünün arttığı da bilinmektedir. Bütün bu sorunlara cevap olarak başta Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) olmak üzere genotipik yöntemler bu tür dezavantajları gidermede kilit rol oynamaktadır. PZR moleküler biyolojide uygulanılan bir teknik olup, basitçe uygun koşullar altında nükleik asit çoğaltılması olarak tanımlanmaktadır (Aydın ve Sudağıdan, 2016).

Öte yandan, bir kütle spektrometre yöntemi olan Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) yönteminde saf kültürden protein parmak izi üretilerek tanımlama yapılmaktadır. Son yıllarda genotipik metotların pahalı ve laboratuvar yükünün çok olması araştırmacıları tanımlamada alternatif yöntemler geliştirme çabası içerisine sokmuştur (Steensels vd., 2011). MALDI-TOF-MS cihazının veritabanı metodun en büyük handikapını oluştursa da, veritabanının her geçen sene daha da iyileştirilmesiyle son yıllarda yapılan çalışmalar bu metodun laktik asit bakterilerinin tanısında uygulanabilir olduğunu ve biyokimyasal yöntemlerden çok daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir. Buna göre, 16S rRNA tanı yöntemi ve MALDI-TOF-MS tanı yöntemleri

karşılaştırılmış ve sonuçların %84,1 ile %100,0 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bareika vd. 2017, Carbonnelle vd. 2012, Angelakis vd. 2011; Nacef 2017; Han vd. 2014; Soro-Yao vd. 2014; Seng vd. 2009).

Bu çalışmada materyal olarak Gaziantep sıkma peyniri, Urfa peyniri, Malatya sıkma peyniri ve Maraş sıkma peyniri kullanılmıştır. İzole edilen suşların ön tanımlamaları, Gram reaksiyonu ve katalaz testi ile belirlenmiştir. *Enterococcus* spp. olarak adlandırılan ve saflık kontrolleri yapılan suşlar ise MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper yöntemiyle tür düzeyinde tanımlanmıştır. Enterokok izolasyonu için yapılan ekimlerden sonra peynirlerin her birinin kimyasal özellikleri de belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda kurumadde, protein, yağ, tuz, kül, laktik asit cinsinden toplam asitlik ile pH tayinleri yapılmıştır. Peynir gruplarının birbirine benzerliği istatistiki açıdan değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Geleneksel Peynirler

Peynir, içerdiği yüksek oranda protein, yağ ve mineral madde zenginliğiyle insanoğlu için elzem bir gıda maddesidir. Sahip olduğu esansiyel amino asitler, A vitamini, bazı B vitaminleri ile kalsiyum ve fosfor gibi mineral maddelerin zenginliğinden dolayı özellikle çocuk ve yetişkin beslenmesinde oldukça önemlidir (Metin, 2003).

Peynirlerin sınıflandırılması oldukça karmaşık ve zor bir konudur. Birçok ülkede değişik özellikteki peynirlerin üretilmesi, üretilen her peynirin kendi içinde şekil ve özellik bakımından birbirlerinden ayrılması, kullanılan süt türünün değişmesi gibi nedenler net bir sınıflandırmayı çok da mümkün kılmamaktadır (Üçüncü, 2013).

Birçok ülkede telemesi haşlanarak veya haşlanmadan üretilen yarı sert veya sert tipteki peynirler, farklı isimler altında çiğ sütten geleneksel yollarla üretilmektedir. Dünya'da ve Türkiye'de kültürel zenginliklere bağlı olarak çok fazla sayıda geleneksel peynir çeşidi mevcuttur. Bu tip peynirlerde, peynirin üretildiği yöre, kullanılan sütün çeşidi ve üretim tekniği son ürünün kalitesini etkileyen başlıca faktörler arasındadır (Kamber, 2015). Yapılan çalışmalara göre farklılıklar olsa da Türkiye'de üretilen yaklaşık olarak 130'un üzerinde peynir çeşidi olduğu fakat tüketimin yalnızca %11'inin geleneksel peynirlerden oluştuğu bildirilmektedir. (Kamber, 2005; Kamber, 2015).

Geleneksel peynirlerin büyük bir çoğunluğunda çiğ süt kullanılmaktadır. Çiğ süt sahip olduğu doğal mikroflora sayesinde pastörize süte kıyasla daha fazla miktarda tat ve aroma bileşenleri içermektedir. Bu sebeple çiğ sütten yapılan peynirler de karakteristik tat ve aroma bileşenleri bakımından daha zengindir. Bu yüzden çiğ sütten yapılan peynirler lezzet profili açısından daha zengin olmaktadır (Ocak vd., 2015).

Türkiye'de üretilen geleneksel peynirlere örnek olarak Antep sıkma, Erzincan tulum, Kelle peyniri, Mihaliç peyniri, Van otlu peyniri, Tomas peyniri, Urfa peyniri, Sepet peyniri, Abaza peyniri, Malatya peyniri, Sürk peyniri, Civil peyniri ve Maraş

peyniri verilebilir (Kamber, 2015). Bunların arasından Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde üretilen Gaziantep sıkma, Maraş parmak/sıkma, Malatya ve Urfa peynirleri telemesi haşlanan peynirlere örnektir (Tekinşen, 2001).

2.1.1 Antep peyniri

Pişken ve Kelle peyniri olarak da bilinen Antep sıkma peyniri koyun, keçi ve inek sütlerinden yapılan genellikle salamurada muhafaza edilen yarı sert özellikte bir geleneksel peynir çeşitidir. Antep peyniri telemeye uygulanan ısıl işlemden dolayı kaşar peynirine, salamurada saklanmasından dolayı ise beyaz peynire benzemektedir (Kamber ve Terzi, 2008).

Çiğ süt kullanılarak yapılan Antep peyniri ilk olarak rennet enzimi ile pıhtılaştırıldıktan sonra bez torbalara alınarak peynir altı suyundan uzaklaşması sağlanmaktadır. Süzme işlemi tamamlandıktan sonra 'şeşbezi veya cibinlik' adı verilen tülbentlere koyulan teleme iyice sıkılmaktadır. Daha sonra teleme 80-90 ℃'de 1 dakikayı geçmeyecek şekilde kaynatılmakta ve soğuduktan sonra elle sıkılarak şekil verilmektedir (Kamber ve Terzi, 2008; Hayaloğlu vd. 2008). Pastörizasyon etkisi gösterdiği kabul edilen haşlama işlemi bazı kaynaklarda 80℃'de 2 dakika ya da %12-18 NaCl içeren salamurada 72℃'de 30-35 saniye boyunca bekletmek olarak da geçmektedir (El-Salam ve Allchanldls, 2004).

Şekil verilen peynir daha sonra istek doğrultusunda, %20-25 tuz oranına sahip salamurada 1 yıla kadar bekletilebilmektedir (Hayaloğlu vd., 2008). Yüksek salamura konsantrasyonlarındaki muhafaza peynirin bazı yapısal, oksidatif ve ransidite problemlerini de beraberinde getirmektedir. Kaya vd. (1999) farklı tuz konsantrasyonlarının ransidite üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmada artan tuz konsantrasyonunun oksidatif ransiditeyi artırdığını, azalmasının ise hidrolitik ransiditeyi arttırdığını saptamıştır.

Çizelge 2.1: Antep peynirine ait bazı kimyasal özellikler.

Kurumadde (%)	Kül (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	Asidite (%)	pH	Kaynak
43,71	-	14,06	22,59	6,25	-	-	Kaya (2002)**
53,10	-	17,08	24,21	8,94	-	-	Kaya (2002)***
53,00	-	20,25	23,28	3,24	1,71	-	Çağlar vd. (1998)
50,35	-	26,13	19,14	3,78	-	-	Çelikbilek (2010)

* : Laktik asit cinsinden % asitlik
** : %15'lik NaCl içeren salamurada 90 günlük depolama sonunda
***: %20'lik NaCl içeren salamurada 90 günlük depolama sonunda

Peynirin mikroflorasının çeşitliliği, telemenin haşlanması ve salamura tuz konsantrasyonunun yanı sıra kuru maddede yağ oranı da peynirin reolojik ve fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir (Kahyaoğlu ve Kaya, 2003). Çizelge 2.1'de Antep peynirine ait bazı kimyasal özellikler verilmiştir.

2.1.2 Urfa peyniri

Urfa peyniri, Güney Doğu Anadolu Bölgesinde Şanlıurfa ili başta olmak üzere sıklıkla tüketilen, yapımında genellikle koyun ve/veya keçi sütlerinin kullanıldığı, telemesi haşlanan ve elle şekillendirilen yöresel bir peynir çeşididir (Ardıç ve Nizamlıoğlu, 2004).

Yapım aşaması olarak Antep, Malatya ve Maraş peynirlerine oldukça benzeyen Urfa peynirinin yapımında ilk olarak süt sağımdan sonra ısıl işlem uygulanmaksızın mayalanmaktadır. Pıhtı oluştuktan sonra 'Parzın' adı verilen tülbentlere doldurulmakta ve peynir altı suyunun süzülmesi sağlanmaktadır. Süzme işleminden sonra tülbentin ağzı bağlanmakta ve bir ağırlık ile baskıya alınmaktadır. Baskı işleminden sonra peynir yöresel halkın 'Deleme' olarak isimlendirdiği silindir veya koni şeklindeki yapıya büründürülmektedir (Yetişmeyen ve Yıldız, 2003). Daha sonra, istek doğrultusunda peynirlere ya 12-24 saat boyunca kuru tuzlama uygulanıp salamuraya alınmakta ya da peynirler 5 dakika boyunca yaklaşık 75℃'de haşlanıp daha sonra salamuraya alınmaktadır (Ardıç ve Nizamlıoğlu, 2004). Bazı kaynaklarda ise haşlama sıcaklığının 90-95℃'de 2-3 dakikada yapıldığı bildirilmektedir (Hayaloğlu vd., 2008).

Ardıç ve Nizamlıoğlu (2004), pastörizasyon ve farklı haşlama sıcaklıklarının Urfa peynirinin kalitesi üzerine etkisini araştırdığı çalışmada, pastörize sütten ve çiğ sütten üretilen Urfa peyniri gruplarına 65℃ ve 75℃'de beşer dakika olmak üzere iki farklı haşlama sıcaklığı denemiştir. Pastörize süt kullanılarak yapılan ve haşlama sıcaklığının 75℃ uygulandığı gruptaki mikrobiyal kalitenin diğer gruplara göre daha yüksek olduğunu ve duyusal analizlerde gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir fark görülmediğini bildirmiştir.

Türk Standartları Enstitüsü Urfa peynirinin standartlarına göre kimyasal bileşimleri: kuru madde minimum %45, tuz içeriği %10-15, titrasyon asitliği laktik asit cinsinden %0.6 olmalıdır (TSE, 2005). Çizelge 2.2'de Urfa peynirinin bazı kimyasal özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.2: Urfa peynirine ait bazı kimyasal özellikler.

Kurumadde (%)	Kül (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	Asidite* (%)	pH	Kaynak
46,48	5,09	16,78	22,06	3,95	0,73	-	(Çağlar vd., 1996)
50,09	-	16,98	23,29	8,12	0,69	5,31	(Atasoy, 1999)
48,33	2,11	17,53	22,96	6,80	1,23	5,44	(Yetişmeyen ve Yıldız, 2003)
44,70	9,21	-	18,50	8,04	0,39	5,11	(Özer vd., 2002)
46,86	7,37	26,96	15,92	8,98	0,31	5,80	(Ardıç ve Nizamlıoğlu, 2004)

*: Laktik asit cinsinden % asitlik

2.1.3 Malatya peyniri

Malatya peyniri, koyun ve/veya keçi sütü kullanılarak doğrudan çiğ sütün mayalanmasıyla ve daha sonra telemenin haşlanmasıyla üretilen yöresel bir peynirdir (Hayaloğlu vd., 2008).

Yapım aşamasında ilk olarak çiğ süt 32℃'de mayalanmakta ve Urfa peynirinde olduğu gibi peynir altı suyu uzaklaştırıldıktan sonra baskılama aşaması gelmektedir. Telemenin haşlanması ise 85-90℃'de 3-5 dakika arasında gerçekleşmekte ve daha sonrasında %10-12 konsantrasyonlarında NaCl içeren salamurada olgunlaşmaya bırakılmaktadır (Hayaloğlu vd., 2008). Son yıllarda pastörize süt kullanılarak yapılan Malatya peynirleri de mevcuttur (Hayaloğlu vd., 2010). Fakat pastörize süt kullanılarak yapılan peynirlerde aroma gelişiminin çiğ sütten yapılanlara göre daha zayıf ve geç geliştiği bilinmektedir (Lynch vd., 1997). Yöresel peynirlerde aroma bir hayli önemli kalite parametresi olduğundan üretimi mahalli koşullarda yapılan peynirlerde daha çok çiğ süt kullanılmaktadır.

Hayaloğlu vd. (2010) pastörizasyonun ve teleme haşlama sıcaklıklarının olgunlaşma sürecindeki aroma gelişimine etkilerini incelediği çalışmada, farklı sıcaklıklardaki haşlama suyunun proteoliz üzerindeki etkisinin pastörizasyondan daha az olduğunu belirlemiştir.

Karatekin (2014), yaptığı çalışmanın bir bölümünde olgunlaşma sonunda kuru madde değerini %42,56, protein içeriğini %19,00, yağ oranını %20,75, tuz içeriğini %7,02, toplam asitliği laktik asit cinsinden %0,93 ve pH değerini ise 5,57 olarak bulmuştur.

2.1.4 Maraş peyniri

Maraş peyniri, özellikle Kahramanmaraş ilinde keçi, koyun ve inek sütlerinin veya bunların karışımlarının rennet ile mayalanması sonucu oluşan, telemenin haşlanması, baskılanması ve şekil verilmesiyle elde edilen, yarı sert özellikte yöresel bir peynir çeşididir (Turgay vd., 2011).

Yapım aşaması olarak Urfa, Malatya, Antep peynirlerine çok benzeyen Maraş peyniri kullanılan sütün türü, telemenin baskılanma aşaması, haşlama sıcaklık ve süresi ve muhafazası bakımından küçük farklılıklar taşımaktadır (Tekinşen, 2001).

Özellikle 2000'li yıllarda çalışmaları artan 'geleneksel peynirlerin starter kültür kullanılarak üretilmesi' çalışmalarına Maraş peyniri de dahil olmuştur. Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003), sütün 68℃'de 10 dakika ısıl işlem görmesinden sonra *Streptococus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* kültürlerini 1:0.5:0.5 oranında içeren karışım kültürü kullanarak Maraş peyniri üretmişlerdir.

Öte yandan, haşlama sıcaklığının artmasının telemesi haşlanan peynir gruplarında yağ kaybını arttırdığı ve peynirde sarı renk oluşumunu hızlandırdığı belirtilmektedir. Ayrıca, 70℃'de 5 dakika uygulanan haşlama işleminin peynirin kimyasal özelliklerinin korunması bakımından diğer ısı ve süre normlarına göre daha etkili olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Tekinşen, 2001). Çizelge 2.3'de Maraş peynirinin bazı kimyasal özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2. 3: Maraş peynirine ait bazı kimyasal özellikler.

Kurumadde (%)	Kül (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	Asidite* (%)	pH	Kaynak
55,32	-	-	24.43	7.22	0.43	-	(Tekinşen, 2005)
56,49	7,48	-	22,49	8,20	0,48	5,10	(Tekinşen ve Nizamlıoğlu, 2003)
53.00	-	20.25	23.25	3.28	1.71	-	(Çağlar vd., 1998)

*: Laktik asit cinsinden % asitlik

2.2 Geleneksel Peynirler ve Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri genel olarak; Gram pozitif, *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, katalaz negatif, morfolojik olarak kok veya çubuk şeklinde olan, karbonhidrat fermentasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit üreten bakteriler olarak tanımlanabilirler (Domingos-Lopes vd., 2017). Son yıllarda, gelişmiş moleküler tiplendirme teknikleri ile yapılan guplandırmaya göre 12 adet laktik asit bakterisi cinsi bulunmaktadır. Bunlar; *Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium,*

Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus ve *Weisella* cinsleridir. Fakat bu cinsler arasında sadece *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* ve *Streptococcus* süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Klein vd., 1998).

Birçok ülkede pıhtısı veya telemesi haşlanan veya haşlanmadan üretilen yarı sert veya sert peynirler, farklı isimlerle çiğ sütten geleneksel yollarla üretilmektedir. Bu tip peynirler Orijini Korunan Peynirler (PDO-Protected Designation of Origin) olarak da adlandırılmaktadır. Bu peynirlerde doğal laktik flora son ürünün karakteristik özellikleri açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Diğer bir ifadeyle, farklı tür çiğ sütlerden elde edilen peynirlerin biyokimyasal yapıları ve duyusal özelliklerinin farklı olmasının sebebi büyük oranda peynirlerin değişik mikrofloraya sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Callon vd., 2004; Kırmacı vd., 2016). Çiğ süt yapısında barındırdığı doğal mikroflora sayesinde pastörize süte kıyasla daha fazla miktarda tat ve aroma bileşenleri içermektedir. Bu sebeple çiğ sütten yapılan peynirler karakteristik tat ve aroma bileşenleri bakımından daha zengindir (Ocak vd., 2015).

Laktik asit bakterilerinin peynirin olgunlaşma aşamasında 5 temel görevi vardır (Hassan vd., 2013);

i) Laktozu parçalayarak uygun biyokimyasal yollarla laktik asit üretimi ve asitliğin yükselmesi,

ii) Sitrik asit metabolizması ve aroma oluşumu,

iii) Olgunlaşma esnasında proteinlerin parçalanması olarak adlandırılan proteoliz,

iv) Süt lipazlarının trigliseritleri parçalaması sonucu oluşan digliseritlerin parçalanması,

v) Bakteriyosinlere ek olarak hippurik asitin parçalanması sonucu benzoik asit oluşumu sonucu antimikrobiyal aktivitenin sağlanması.

Laktik asit bakterileri peynirde birincil ve ikincil mikroflora konumunda bulunmaktadır. Birincil mikroflora olarak adlandırılan starter kültürlerin temel görevi süt şekerini fermente ederek laktik asit üretmek ve bunun neticesinde pH'yı düşürmektir (Beresford vd. 2001; Gürsoy ve Kınık 2006).

Starter olmayan laktik asit bakterileri (NSLAB) olarak da adlandırılan ikincil mikroflora ise aroma oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. NSLAB'nin önemli bir kısmını *Enterococcus* spp. türleri oluşturmakta ve özellikle geleneksel peynirlerin

olgunlaşma aşamasında aromaya katkıda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra ürettikleri bakteriyosinler sayesinde *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* gibi gıda patojenlerini inhibe etme özelliğine sahiptir. *Enterococcus* spp. türleri bu özellikleri sayesinde koruyucu kültür olarak kullanılabilme potensiyeline de sahiptir (Giraffa, 2003).

NSLAB çiğ sütte ilk başlarda çok az bir oranda bulunsa da popülasyonları olgunlaşma esnasında bir hayli artmakta ve dominant flora haline gelmektedir (Mcsweeney ve Sousa, 2000). Enterokoklar, olgunlaşma süresi boyunca göstermiş oldukları lipolitik ve proteolitik faaliyetler sayesinde tat, aroma ve yapıya katkıda bulunma ve sentezledikleri bakteriyosinler sayesinde antimikrobiyal özellik göstermelerinden dolayı geleneksel peynirler için oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Fenolon vd. 1999; Giraffa 2003).

2.3 Enterokoklar

Enterococci grubu ilk olarak 19. yüzyılın sonunda Thiercelin tarafından tanımlanmıştır. *Enterococcus* cinsi ise insan bağırsağı kökenli, Gram pozitif diplokok olarak 1903 yılında Thiercelin ve Jouhaud tarafından adlandırılmıştır (Franz vd., 1999). Bu grup, 1906 yılına gelindiğinde endokardit hastalığı olan bir insandan izole edilen bakteri bazı bağırsak kökenli bakterilerle gösterdiği yüksek benzerlikten dolayı *Streptococcus faecalis* olarak önerilmiştir (Franz vd., 1999). Daha sonra Lancefield (1933), D grubu antijene sahip fekal streptokoklar için serolojik bir tiplendirme geliştirmiştir. Lancefield tarafından önerilen tiplendirme Sherman (1937) tarafından önerilen gruplandırmayla bağdaşmıştır. Bu gruplandırmada ise streptokoklar; piyojen, viridans, laktik ve enterokoklar olmak üzere 4'e ayrılmıştır. Daha sonra Sherman (1938), enterokokların 10℃ ve 45℃'de, pH 9.6'da ve %6.5 NaCl konsantrasyonlarında canlılıklarını sürdürdüğünü belirtmiş ve bunların *Streptococcus faecium*, *S. faecalis* ve *S. durans* olduğunu öne sürmüştür. Bütün bu uğraşlara rağmen moleküler tekniklerin gelişimine kadar enterokoklar 1906-1984 yılları arasında streptokokların içinde değerlendirilmeye devam etmiştir. Daha sonra 1984 yılında DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyonuyla *S. faecalis* ve *S. faecium* türlerinin *Enterococcus* cinsine transferi sağlanmıştır (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984; Kohler, 2007). Sonraki yıllarda moleküler tekniklerin iyice gelişmesiyle birlikte streptokoklar; *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* olmak üzere 3 cins altında değerlendirilmiştir (Hardie ve Whiley, 1997).

16S rRNA gen sekanslama sonuçlarına göre 35 enterokok türü olduğu ve bu türlerin 25 tanesinin 6 gruba ayrıldığı bilinmektedir. Bu gruplar Çizelge 2.4'de gösterilmiştir (Lemsaddek ve Tenreiro, 2012).

Çizelge 2. 4: Enterokok gruplarına ait bakteri türleri.

Grup	**Bakteri türleri**
E. avium	*E. avium, E. devriesei, E. gilvus, E. maloduratus, E. pseudoavium* ve *E. raffinosus*
E. cecorum	*E. cecorum* ve *E. columbae*
E. faecalis	*E. caccae, E. faecalis, E. haemoperoxidus, E. moraviensis, E. silesiacus ve E. termitis*
E. faecium	*E. canis, E. durans, E. faecium, E. hirae, E. mundtii, E. ratti* ve *E. villorum*
E. gallinarum	*E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*
E. italicus	*E. camelliae* ve *E. italicus*

Bu gruba dahil olmayan diğer türler arasında ise *E. aquimarinus, E. asini, E. canintestini, E. dispar, E. hermanniensis, E. pallens, E. phoeniculicola, E. saccharolyticus, E. sulureus* ve *E. thailandicus* yer almaktadır (Lemsaddek ve Tenreiro, 2012).

Enterococci grubu Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, büyük bir çoğunluğu hareketsiz, 10 ve 45℃ , pH 4.6 ve 9.6 gibi geniş pH aralığında gelişen ve eskulini hidrolize eden bakterilerdir (Klein, 2003). Bu özelliklerinden dolayı enterokoklar özellikle peynir başta olmak üzere birçok fermente ürünün mikroflorasında bulunmaktadır (Crespo ve Alves, 2012). Süt ve süt ürünlerindeki enterokok varlığının dışkı kökenli kontaminasyonlar olduğu bilinmektedir. *Enterococcus* spp. türleri arasında *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*'ın çiftlik hayvanlarıyla ilişkisinin az olduğu ve bunların arasında *E. faecium'*un diğer türlere göre daha sıklıkla sığırların bağırsağında bulunduğu bilinmektedir (Franz vd., 2003).

Peynirde enterokok varlığı geleneksel yollarla çiğ süt veya pastörize sütten üretilen peynirlerde görülmektedir. Sütün doğal mikroflorasında bulunmayan enterokoklar süte sağım esnasında dışkı ile kontamine olmuş hayvan memesinden veya alet ve ekipmanlardan bulaşarak telemeye ve sonrasında da peynire kadar geçmektedir (Giraffa, 2003). Enterokokların peynirde bulunan popülasyonları ise oldukça heterojen bir yapı göstermektedir. Telemede başlangıçta 10^4-10^6 kob/g arasında bulunan enterokoklar olgunlaşma periyodunda 10^5-10^7 kob/g'a kadar çıkmaktadır. Çünkü düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamlarını sürdürebilmeleri ve diğer laktik asit bakterilerine kıyasla ısıya göstermiş oldukları direnç sayesinde

geleneksel peynirlerde olgunlaşma aşamasında sayıca logaritmik olarak artış göstermektedir (Franz vd., 1999). Olgunlaşma periyodu esnasında ise peynirde tat ve aroma bileşenleri oluşturarak organoleptik özellikleri iyileştirmektedirler (Moreno vd., 2006). Bir *Enterococcus faecium* suşunun destek kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada *E. faecumun'*un starter olmayan laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklediği, proteolizi, tadı, aromayı geliştirdiği ve yapı ve diğer duyusal özellikler üzerinde de olumlu etkide bulunduğu belirtilmektedir (Sarantinopoulous vd., 2002).

Enterokoklar, kimi kaynaklarda hastane enfeksiyonlarından sorumlu fırsatçı patojenler olarak da tanımlanmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde bazı enterokok türleri hastalığa neden olabilmektedir (Crespo ve Alves, 2012). Bağışıklık sistemi zayıf hastalardan izole edilen ve *Enterococcus* spp. olarak tanımlanan türlerden %80'ini *Enterococcus faecalis*'in oluşturduğu belirtilmektedir (Franz vd., 2003). Hastalığa sebep olan türlerin antibiyotik direnci (özellikle vankomisin) ve/veya virülens faktörlerden en az birine sahip olduğu bilinmektedir (Crespo ve Alves, 2012). Patojenitenin yanı sıra bazı enterokok türleri gıda intoksikasyonuna da neden olmaktadır. Dekarboksilaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar amino asitleri parçalayarak biyojen amin oluşturmaktadır. Bu da hassas bireylerde çeşitli hastalıkları ve alerjik reaksiyonları beraberinde getirmektedir (Ertürkmen ve Öner, 2015). Bu yüzden fermente gıda üretimi için seçilecek suşların dekarboksilaz aktivitelerinin dikkatle belirlenmesi gerekmektedir. Enterokok türlerinin ise daha çok tirozin amino asitini parçalayarak tiramin oluşturduğu belirtilmektedir (Ertürkmen ve Öner, 2015).

2.4 *Enterococcus* spp. Türü Bakterilerin Fonksiyonel Özellikleri

Asitliği kayda değer miktarda arttırmayan fakat peynirin olgunlaşma periyodunda proteoliz, lipoliz ve sitrat metabolizması sayesinde tat ve aromaya katkıda bulunan, sentezledikleri enterosinler sayesinde *Listeria monocytogenes* gibi patojen özellikteki Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösteren ve probiyotik olarak da kullanılan enterokoklar çok yönlü bakterilerdir (Halender vd., 1997; Moreno vd., 2006; Barbosa vd., 2014).

2.4.1 Aroma oluşturma

Peynirde aroma oluşumu şekerin fermentasyonu ile başlamaktadır. Bu etki dolaylı olsa da sütün asitlenmesi olgunlaşma aşamasında yer alacak NSLAB'lerinin gelişmelerini ve bu sayede oluşacak aroma bileşiklerini de doğrudan etkilemektedir.

Aroma bileşenleri çoğunlukla olgunlaşma aşamasında meydana gelmektedir. Her ne kadar bazı suşlar amino asitleri parçalayıp aroma bileşenleri sentezleme yeteneğine sahip olsalar da peynir teknolojisinde aroma oluşumu için en önemli metabolik yol sitrat metabolizmasıdır (Hassan vd., 2013).

Sitrat sütte doğal olarak, kazein miselleri içerisinde bulunan bir bileşiktir (Üçüncü, 2013). Sitrat permeaz enzimine sahip olan ve Cit (+) olarak adlandırılan bazı laktik asit bakterileri sitratı metabolize ederek asetat, diasetil, asetoin ve 2,3-butanediol aroma bileşiklerini üretirler. Sitrat ağırlıklı olarak *Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. gibi mezofilik starterler tarafından metabolize edilse de bazı enterokok türleri tarafından da metabolize edilebilmektedir (Moreno vd., 2006; Hassan vd., 2013).

Sitrat, fermantasyon ortamında fermente edilebilir bir şeker kaynağının bulunması durumunda daha rahat bir şekilde metabolize edilmektedir (Özer, 2014). Fakat bakterinin türüne ve suşlar arasındaki farklılıklara göre karbonhidratın, ortamdaki oksijen varlığının ve ortamın asitliğinin sitrat kullanımı üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Sarantinopoulos vd., 2001a). Sarantinopoulos vd. (2001b) *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229 suşunu kullanarak sitrat kullanımını araştırdığı çalışmasında ortamda fazla miktarda bulunan sitratın son üründe asetat ve format konsantrasyonlarını artırdığını gözlemlemiştir.

Olgunlaşma periyodunda sayıları artan ve dominant mikroflora olarak göze çarpan enterokoklar (Franz vd., 1999) enerji kaynağı olarak olgunlaşma aşamasında sitratı kullandıkları zaman asetat, etanol, asetaldehit ve diasetil gibi peynirin tat ve aromasını doğrudan etkileyen bileşikler oluşturmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2005).

2.4.2 Proteolitik Aktivite

Proteoliz peynirin hem olgunlaşma öncesinde hem de olgunlaşma aşamasında oldukça önemlidir. Proteoliz ile peynirde meydana gelen değişiklikleri aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür.

i) Protein ağının yıkımlanması, serbest kalan amino ve karboksi gruplarının suyu bağlaması sonucu peynir pıhtısının oluşumu,
ii) Peptit ve serbest amino asitlerin oluşumuyla aromaya doğrudan etki,
iii) Olası ikincil katabolik reaksiyonlar için amino asitlerin salınımı (deaminasyon, dekarboksilasyon vb.) (Fox ve Sweeney, 1996).

Olgunlaşma esnasında proteoliz, koagüle edici enzim, sütün kendi bünyesinde barındırdığı enzimler ve laktik asit bakterileri tarafından gerçekleşmektedir. Çoğu

peynir çeşidinde parçalanma ilk olarak rennin benzeri enzimler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Daha sonra yıkımlanma sütün içerisinde bulunan enzimlerle devam etmekte ve sonunda suda çözünen ve çözünmeyen kazein fraksiyonları ayrılmaktadır. Daha sonra bu fraksiyonlar peynirde bulunan starter ve starter olmayan laktik asit bakterileri tarafından yıkımlanarak daha küçük peptitlere ve serbest amino asitlere parçalanmaktadır (Hassan vd., 2013). Orta ve küçük boyutlu serbest amino asitler ise birçok peynirin karakteristik aromasını oluşturmaktadır (Urbach, 1995).

Yıkımlanma ürünü olan serbest aminoasitlerin ise daha ileri boyutta parçalanması peynirin aromasını keskin bir şekilde etkilemektedir. Bakteri kültürlerinin proteolitik aktiviteleri Citti vd. (1963)'nin önerdiği yöntem dikkate alınarak yapıldığında sonuçlar tirozin eşdeğeri olarak verilmektedir. Laktik asit bakterilerinin üründe karakteristik tat, aroma ve yapı oluşturması açısından tespit edilen optimum proteolitik aktivite değeri 20 µg/mL olarak bildirilmiştir (Karakuş, 1994). Öte yandan 50 µg/mL ve üzerinde proteolitik aktivite içeren suşlar oluşturdukları yüksek miktarda protein kalıntıları ve serbest amino asitler sebebiyle son üründe istenmeyen tatların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Ertürkmen ve Öner, 2015).

Tunail vd. (2001), yaptığı çalışmada özellikle *Enterococcus faecium* suşlarının gösterdiği proteolitik aktivitenin laktokok ve laktobasillerden daha fazla olduğunu belirlemiştir. Benzer şekilde Ertürkmen ve Öner (2015), yaptıkları çalışmada benzer sonuçları elde ederek enterokok suşlarının gösterdiği proteolitik aktivite değerini izole edilen diğer starter laktik asit bakterilerine göre daha yüksek olduğunu belirlemiştir.

2.4.3 Lipolitik aktivite

Süt yağı, bünyesinde bulundurduğu kısa zincirli yağ asitleri sayesinde süt ve süt ürünlerine duyusal bir üstünlük kazandırmaktadır (Metin, 2003). Böylece süt yağı peynirin aromasında ve tekstürel özelliklerinde önemli bir yere sahiptir ve aroma üzerinde 3 farklı şekilde etkide bulunmaktadır;

i) Özellikle bütirik, kapronik, kaprilik ve kaprinik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerince zengin olup (Metin, 2003) bunların degredasyonu sonucu metil keton veya lakton gibi aroma maddelerinin oluşması,

ii) Oksidatif ransidite sonucu istenmeyen tat ve koku maddelerinin oluşması,

iii) Sentezlenen aroma maddeleri için iyi bir çözücü olması (Moreno vd., 2006).

Peynirin yapım ve olgunlaşma aşamalarında meydana gelebilen süt yağının hidrolizi, süt lipazı, laktik asit bakterileri ve psikrofil bakteriler tarafından sentezlenen lipolitik enzimler dolayısıyla meydana gelmektedir (El Soda vd., 1995).

Laktik asit bakterileri, diğer mikroorganizma gruplarına kıyasla daha zayıf lipolitik aktivite göstermektedir (El Soda vd., 1995). Laktik asit bakterileri arasında enterokoklar grubun diğer üyelerine kıyasla daha yüksek lipolitik aktivite göstermektedir (Giraffa, 2003). *Enterococcus* cinsi arasında ise en yüksek lipolitik aktiviteyi *Enterococcus faecium* göstermektedir (Sarantinopoulos vd., 2001b). Durlu-Özkaya vd. (2001) yaptığı çalışmada bazı *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının yeterli miktarda bulunmaları halinde gösterdiklerikleri lipolitik aktivite sayesinde aromaya olumlu katkıda bulunacağını belirtmiştir.

2.4.4 Antimikrobiyal aktivite

Laktik asit bakterilerinin mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal özellik göstermesinin başlıca nedeni süt şekerinin fermantasyonu sonucunda oluşan laktik asit ile birlikte yükselen asitliktir (Şanlıbaba ve Güçer, 2015). Üretilen laktik asite ek olarak, hidrojen peroksit, diasetil ve özellikle de bakteriyosinler antimikrobiyal aktivite açısından önemli bir rol oynamaktadır (Helander vd., 1997).

Laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen bakteriyosinler mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu bir antibiyotik rolü üstlenerek çoğu zaman Gram (+) patojenler üzerinde etkili olsa da, Gram (-) bakteriler ile maya ve küflere de bazı bakteriyosinler etki etmektedir.

Enterokoklar tarafından sentezlenen bakteriyosinlere enterosin adı verilmektedir. Enterosinler genellikle Grup II bakteriyosinler sınıfına aittir, yani küçük, ısıya dirençli, lantionin içermeyen ve genellikle kuvvetli antilisterial aktiviteye sahiptirler (Nalvuran, 2013). Enterokoklar arasında sıklıkla enterosin sentezleyen türler arasında *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* başta olmak üzere *E. casseliflacus, E. durans* ve *E. mundtii* türleri yer almaktadır (Abriouel vd., 2012).

Yapılan birçok çalışmada enterosinlerin özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde bakteriosid etki gösterdiği görülmüştür (Ananou vd., 2010; Abriouel vd., 2012). Fakat yapılan çalışmalarda enterokokların direkt olarak gıdaya katılmasıyla elde edilen bakteriyosidal etkinin direkt olarak enterosin

uygulanmasıyla elde edilen etkiden daha kuvvetli olduğu bildirilmektedir (Abriouel vd., 2012).

2.4.4 Probiyotik özellikleri

Probiyotik terimi günümüze kadar farklı tanımlamalarla anılmıştır. Günümüzdeki tanımıyla ise 'yeterli miktarlarda vücuda alındığı zaman birey üzerinde olumlu bir sağlık etkisi gösteren canlı mikroorganizmalar' olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik kültür dendiği zaman akla ilk olarak *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsleri gelse de virülens faktörlere sahip olmayan ve antimikrobiyal direnç göstermeyen enterokok türlerinden *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* da probiyotik özellikler göstermektedir (Gupta ve Garg, 2012).

Bazı *Enterococcus faecium* suşlarının ishali antibiyotik kullanımına gerek kalmadan tedavi ettiği yıllar öncesinde araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Belloma vd., 1980). Rossi vd. (1999) tarafından yapılan ve fermente soya sütü yapımında *Lactobacillus jugurti* ile birlikte kullanılan bir *Enterococcus faecium* suşunun *in-vitro* koşullarda kolesterolü çok ciddi bir oranda düşürdüğünü göstermiştir. Başka araştırmacılar tarafından yapılan ve yapımında *E. faecium* bakterisinin kullanıldığı fermente süt ürünlerinin serum kolesterolünü düşürdüğü de bildirilmektedir (Gupta ve Garg, 2012).

Olumlu sağlık etkilerinin olmasına rağmen fırsatçı patojen olarak değerlendirilen enterokok cinsi bakterilerin günümüzde probiyotik olarak kullanımı konusunda tartışmalar devam etmektedir.

2.5 Enterokokların Patojenitesi

Enterokokların teknolojik ve sağlık yararlarının yanı sıra fırsatçı patojen özellik taşımalarından dolayı detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Bunların en başında ise antibiyotik direnci ve virülens faktörleri gelmektedir.

2.5.1 Antibiyotik direnci

Antimikrobiyal direnç hastane enfeksiyonlarının tedavisinde oldukça önemli bir konudur. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç genetik veya sonradan kazanılmış olabilmektedir (Moreno vd., 2006). Son yıllarda antibiyotiklerin bilinçsiz ve fazla miktarlarda kullanılması sonucu aralarında enterokokların da bulunduğu birçok bakteri antibiyotiklere karşı direnç kazanmış, bu da hastalıkların iyileşmesini zorlaştırmıştır.

Enterokokların en fazla vankomisine direnç gösterdikleri bilinmektedir. Enterokoklar arasında ise 6 farklı vankomisin türüne karşı direnç olduğu bilinmektedir. Bunlar *Van*A, *Van*B, *Van*C, *Van*D, *Van*E, *Van*G olmakla birlikte *Van*A ve *Van*B operonları en büyük öneme sahip olanlarıdır (Araujo ve Ferreira, 2013). Fakat bakterinin vankomisine karşı göstermiş olduğu direnç tek başına enterokokların virülens özellik gösterdiği anlamına gelmemektedir (Moreno vd., 2006).

Bakteriler aynı zamanda birlikte yaşadığı mikrofloranın diğer üyelerini de etkilemektedir. Sonradan kazanılan antibiyotik direnci bir mikroorganizmadan diğerine aktarılabilmektedir. Vankomisin direncine sahip enterokoklara dair en büyük endişe kazanmış oldukları antibiyotik direncinin kodlu olduğu gen bölgesinin plazmitler aracılığıyla *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilere aktarılmasıdır (Armin vd., 2017). Çünkü antibiyotiklere karşı sonradan kazanılan direnç kromozomlarda değil, plazmitlerde saklanmaktadır. Bu da antibiyotik direncinin başka bakterilere konjugasyon yoluyla taşınmasını mümkün kılmaktadır (Araujo ve Ferreira, 2013).

Çıtak vd. (2004), 101 *Enterococcus* cinsinin (62 tane *E. faecalis*, 25 tane *E. faecium*, 7 tane *E. durans*, 5 tane *E. mundtii* ve 2 tane *E. dispar*) aralarında vankomisinin de bulunduğu 13 farklı antibiyotiğe karşı direncin incelendiği çalışmada *E. faecalis* izolatlarının yaklaşık %97'si ve *E. faecalis* suşlarının ise %76'sı vankomisine karşı direnç göstermiştir. En etkili antibiyotiklerin ise ampisilin ve imipenem olduğu tespit edilmiştir.

Franz vd. (2001) ise enterokok izolatlarının antibiyotik dirençlikleri ve virülens faktörlerini incelediği çalışmasında *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının penisiline karşı dirençli olduğunu gözlemlerken vankomisine ve ampisiline karşı olan direnç daha düşük bulunmuştur.

İspirli vd. (2017) beyaz peynirden izole ettiği enterokok izolatlarının antibiyotik direncini genel olarak düşük bulmuş fakat aralarından iki adet *Enterococcus durans* suşlarının vankomisine karşı direnç gösterdiğini tespit etmiştir.

2.5.2 Virülens Faktörler

Patojenite hastalık yapabilme yeteneği iken, virülens etki bunun şiddetini ifade etmektedir. Bir bakteri hücresi ne kadar fazla virülens faktöre sahipse o kadar ağır derecede enfeksiyona neden olmaktadır (Semedo-Lemsaddek ve Mato, 2012). Enterokoklar diğer Gram (+) patojenlere göre daha az sayıda virülens faktöre sahip

olasa da antibiyotiğe kazanılan direnç ile birlikte artan hastane enfeksiyonları enterokokların virülens faktörlerini de mercek altına almıştır (Franz vd., 1999). Enterokokların enfeksiyona sebep olması için gerekli ilk adım bakterinin hücre duvarına yapışabilmesi ve kolonize olmasıdır. Sonraki adım ise konak hücreyi invazyondur (Semedo-Lemsaddek ve Mato, 2012).

Enterokokların virülens faktörleri arasında ise adezyon faktörleri (e*f*aA*f*m, e*f*aA*f*s, esp), sitolitik aktivite (*cyl*A ve *cyl*B), jelatinaz aktivitesi (*gel*E) ve seks feromonu/agregasyon maddesi (*cob* ve *agg*) yer almaktadır (İspirli vd., 2017).

Adezyon faktörleri, bakterinin hücreye tutunmasını sağlamaktadır (Semedo-Lemsaddek ve Mato, 2012). Agregasyon maddeleri ise bakteri yapıştıktan sonra konjugasyon aşamasında rol alarak agregat oluşmasını sağlamaktadır.

Jelatinaz aktivitesiyle ilişkilendirilen bir virülens faktör olan jelatin; kazein, kollojen, hemoglobin ve diğer biyoaktif peptitlerin hidrolizine yol açan bir hücredışı metaloproteinazdır (Kayaoğlu ve Ørstavik, 2004). *Ge*lE üretimi *E. faecalis* suşları arasında oldukça yaygın olarak görülmektedir (Franz vd., 2001).

Öte yandan, sitolitik aktivite enterokok türleri arasında belirlenen ilk virülens faktördür. Sitolizin hemolizin ve bakteriyosin özelliği gösteren bir proteindir (Araujo ve Ferreira, 2013). Daha çok *E. faecalis* suşlarında görülen sitolitik aktivite antimikrobiyal aktivite göstermesinin yanı sıra ökaryot hücreleri de lize etme özelliğine sahiptir (Araujo ve Ferreira, 2013).

İspirli vd. (2017) tarafından beyaz peynirden izole edilen 12 *Enterococcus* cinsi bakterinin 8 adet virülens faktörüne bakıldığı çalışmada en çok rastlanan virülens faktörün jelatinaz aktivitesi ve adezyon faktörlerden e*f*aA*f*s ve e*f*aA*f*m olduğu belirlenmiştir. Adezyon maddelerinden *agg* ve *cob* gen bölgeleri belirlenmemiş fakat hücredışı yüzey proteini 9 izolatta belirlenmiştir.

2.6 Enterokokları Tanımlama Yöntemleri

Laktik asit bakterileri grubunda yer alan enterokokların tanımlanmasında fenotipik yöntemler, moleküler/genetik yöntemler (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011) veya MALDI-TOF-MS ve türevleri kullanılabilmektedir (Carbonnelle vd., 2012).

2.6.1 Fenotipik yöntemlere dayalı tanımlama

Bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmasına imkan sağlayan ve geleneksel yöntemler olarak da adlandırılan fenotipik yöntemler arasında mikroorganizmanın

morfolojik, metabolik, biyokimyasal ve serolojik karakterleri yer almaktadır (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

2.6.1.1 Morfolojik yöntemlere dayalı tanımlama

Bakterilerin tanımlanması için gerekli ilk adım bakteriyi saf bir şekilde elde etmektir (Sutherland ve Rafii, 2006). Daha sonraki aşamayı ise morfolojik karakterler oluşturmaktadır. Enterokoklar Gram pozitif, katalaz negatif, *Enterococcus casseliflavus* ve *E. gallinarum* hariç hareketsiz (Lemsaddek ve Tenreiro, 2012) olan, aerobik veya fakültatif anaerob olarak gelişebilen, mikroskobik olarak genellikle diplokok veya kısa zincirler halinde bulunan bakterilerdir (Kaleli ve Durlu-Özkaya, 2000).

2.6.1.2 Biyokimyasal yöntemlere dayalı tanımlama

Elde edilen saf kültürlerin cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için bazı fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Bu özellikler; farklı pH ve sıcaklık değerlerinde gelişebilme, oksijene karşı gösterilen tolerans, değişik şekerleri fermente edebilme yeteneği, hücre morfolojisi, hidrojen peroksit ile tepki verme durumları ve değişik tuz konsantrasyonlarında gelişme durumları olarak sıralanabilmektedir (Sutherland ve Rafii, 2006). Bunlar arasından farklı tuz konsantrasyonları, pH ve sıcaklık aralıklarında gelişme fizyolojik testler arasında yer alırken katalaz reaksiyonu ve şeker fermentasyonu gibi testler ise biyokimyasal testler grubunda yer almaktadır (Ertürkmen ve Öner, 2015).

Çizelge 2. 5: Bazı enterokok türlerinin biyokimyasal özellikleri.

	E. durans	***E. faecalis***	***E. faecium***	***E. casseliflavus***	***E. gallinarum***	***E. thailandicus***
10℃	+	+	+	+	+	-
45℃	+	+	+	+	+	+
pH: 9,6	+	+	+	+	+	+
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+
%0,04 Tellurite	-	+	-	+	+	-
%0,01 Tetrazolium	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	+	+	+

Çizelge. 2.5'de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'ye göre enterokokların bazı biyokimyasal özellikleri verilmiştir (Holt vd., 1994). *E.*

thailandicus türüne ait biyokimyasal sonuçlar ise Tanasupawat vd. (2008) referans alınarak verilmiştir.

Öte yandan, günümüzde moleküler tekniklerin gelişmesinden dolayı yaygın olarak kullanılmasa da hazır API 50 CH ve API 20 CH gibi karbonhidrat ve LRA Zym ve API AZM gibi enzimatik kitleri mevcuttur. Bu kitler saf kültürlerin karbonhidratları fermente edebilme özelliklerinden faydalanılarak özellikle laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Test kitinden alınan sonuçlar, bilgisayar programının veri tabanında yer alan bakteri türleri ile sınırlı bir şekilde tanımlanmaktadır ve sonuçlar '% tanımlama' şeklinde verilmektedir (Ertürkmen ve Öner, 2015).

Fenotipik ve biyokimyasal yöntemler hem çok zaman almakta hem de bakterileri tür ve alt-tür düzeyinde ayırmada bazen yetersiz kalmaktadır. Bunların yanı sıra faj dirençliliği, antimikrobiyal aktivite testleri, hücre duvarı kompozisyonlarının belirlenmesi ve protein profillerinin incelendiği elektroforetik yöntemler de (SDS-PAGE) fenotipik yöntemlere dahil olup daha kesin sonuçlar verebilmektedir (Coeuret vd., 2003). Fakat klasik yöntemlerin uzun sürmesi, güvenilirliğinin daha düşük olması ve ciddi zaman alıcı özelliklerinden dolayı moleküler yöntemlere göre dezavantajları bulunmaktadır (Aydın ve Sudağıdan, 2016).

2.6.2 Moleküler Yöntemlere Dayalı Tanımlama

Özellikle 2000'li yılların başından beri gün geçtikçe kullanımı artan moleküler yöntemler, biyokimyasal yöntemlere göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve türleri birbirinden ayırma konularında daha üstündür. Ayrıca, geleneksel yöntemlerde moleküler yöntemlere göre istatiksel ve metodolojik hata olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bunlara ek olarak geleneksel analiz yöntemleri uygulandığında izolasyon ve identifikasyon için gerekli süre bir hayli uzun olup laboratuvar yükünün arttığı da bilinmektedir. Bu nedenlerle, başta Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) olmak üzere genotipik yöntemler bu tür dezavantajları gidermede kilit rol oynamaktadır (Aydın ve Sudağıdan, 2016).

PZR, bir DNA amplifikasyon metodu olup hedef gen bölgesinin çoğaltılması prensibi esas alınmaktadır. Üç aşamada gerçekleşen reaksiyonda ilk olarak yüksek sıcaklıkta hücre DNA'sının denatürasyonu gerçekleşmektedir. Daha sonra, türe özgü primerlerin veya probların ilgili gen bölgesine bağlanması aşaması gelmektedir. Son olarak ise *Taq* polimeraz enzimi sayesinde ilgili bölgenin uzaması aşaması gelmektedir (Çakır ve Çakmakçı, 2005).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler PZR temelli yöntemler ve PZR temelli olmayan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmakta ve bunların arasında çok büyük çoğunlukla PZR temelli yöntemler günümüzde kullanılmaktadır. Bunların arasında Eş zamanlı PZR, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)-PZR, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA(RAPD)-PZR, Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tekrarlanan Palindromlara dayalı (Rep)-PZR, ve aralarında DNA sekans analizinin de bulunduğu PZR ribotiplendirme teknikleri bulunmaktadır (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Enterokokların diğer laktik asit bakterilerinden ayrılması moleküler yöntemlerden RAPD-PCR kullanılarak yapılabilir. Böylece enterokokların cins düzeyinde diğer laktik asit bakterileri kolonilerinden ayrımı sağlanmış olur. Bu amaç doğrultusunda evrensel primerler kullanılır. Bunlara örnek olarak, sıklıkla kullanılan M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT- 3') primeri verilebilir (İspirli vd., 2017). Öte yandan, bakterilerin tür ve alt tür bazında tanımlanabilmesi için 16S rRNA bölgesi çoğaltılmaktadır. 16S olarak adlandırılan ve nesillerce korunan bu bölge her bir bakteri türüne özgüdür ve bakterilerin jenerasyonu için gereklidir. Ek olarak, 1500 baz çifti (bp) uzunluğuna sahip olan bu bölge sekanslama işlemi açısından da bir avantaj sağlamaktadır (İspirli, 2016). PZR kullanılarak 16S rRNA bölgesinin çoğaltılmasından sonra ise sekanslama işlemi yapılarak elde edilen veriler veritabanındaki dizilerle karşılaştırılmaktadır. Böylece, tür ve alt-tür düzeyinde çok başarılı bir şekilde sonuç alınabilmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

2.6.3. MALDI-TOF-MS ile tanımlama

Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayalı fenotipik tanımlamalar ile moleküler tanımlama metotları mikroorganizmaların identifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların arasından moleküler yöntemler en güvenilir sonucu verse de süreyi, maliyeti ve iş yükünü azaltmak amacıyla başka alternatif yöntemler de kullanılmaktadır (Singhal vd., 2015). Alternatif yöntemlerden olan kütle spektrometresi, 1975 yılından bu yana bakteri karakterizasyonu amacıyla zaman zaman kullanılmış ancak MALDI-TOF-MS sistemi geliştirilene kadar pek etkili olamamıştır (Mazzeo vd., 2006).

MALDI-TOF-MS mikrobiyolojide katı besiyerinden saf bakteri ile maya ve küf kültürlerinden protein parmak izi üretmek için kullanılmaktadır. Tanımlamada ilk

adım kültürü saf bir şekilde elde ettikten sonra matriks ve örnek arasında bir kristal oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda kültür bir kürdan yardımıyla MALDI-TOF plakasına sürülüp üzerine uygun miktarda organik bir matriks çözeltisi eklenmekte ve böylece kurumaya bırakılmaktadır. Daha sonra plaka cihazın içine yerleştirilerek lazer ışıması gerçekleştirilmektedir. Işımadan sonra bakteri kültürü gaz iyon fazlarına ayrılarak bir tüp boyunca yürütülmektedir. Bunun sonucunda, iyonlar moleküler kütle (m) / yük (z) oranı ve bağıl yoğunluklarına göre bir detektör sayesinde ayrılmaktadır. Her bakteri türüne özgü olan bu karakteristik özellikler ise daha sonra cihazın veritabanındaki referans spektrumlarla karşılaştırılarak mikroorganizmanın tanısı dakikalar içinde gerçekleşmektedir (Steensels vd., 2011).

Bazı tekniklerde iyonların birbirlerinden tam olarak ayrılmasının sağlanması için iyonlar detektöre ulaşmadan önce elektrik alan kuvveti uygulayan iyon aynaları vasıtasıyla TOF tüpüne tekrar gönderilmektedir. Geri yansıtılan iyonlar tekrar tüp boyunca hareket ederek birbirlerinden tam olarak ayrılması sağlanmaktadır. Böylece daha doğru tanımlama sonuçları elde edilmektedir. Yöntemde iyonlar geri yansıtılır ve tekrar yürütülürse yöntem MALDI-TOF-TOF-MS adını alır (Hosseini ve Martinez-Chapa, 2017). Tanımlamada veritabanı olarak Biotyper veya Saramis veritabanları kullanılmaktadır. Eğer Biotyper veritabanı kullanılırsa yöntemin adı MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper olmaktadır.

MALDI-TOF-MS yönteminde saf kültür direkt olarak veya öncesinde proteini izole edilerek yapılabilmektedir (Bizzini vd., 2010). Bakteri kültürlerinde direkt yöntem genelde sonuç verirken, maya ve küflerde proteinin ekstraksiyon aşaması doğruluğu arttırmaktadır (Stenseels vd., 2011). Öte yandan, birbirine yakın türlerin veya alt türlerin tanımlanmasında ise genotipik yöntemlerin tercih edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Dušková vd., 2012).

Yapılan bazı çalışmalarda değişik bakteri kültürlerinin 16S rRNA sekans analizi baz alınarak MALDI-TOF-MS sonuçlarının cins ve tür düzeyinde doğruluğunun karşılaştırılması Çizelge 2.6'da verilmiştir.

MALDI-TOF-MS yönteminde veritabanı en büyük handikapı oluştursa da veritabanının her geçen sene daha da iyileştirilmesiyle son yıllarda yapılan çalışmalar bu metodun laktik asit bakterilerinde uygulanabilir olduğunu ve biyokimyasal yöntemlerden çok daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir. MALDI-TOF-MS, 16S rRNA bölgesinin çoğaltılmasıyla yapılan sekanslama sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve sonuçların yapılan çalışmalara göre %84,1 ile %100 arasında değiştiği belirlenmiştir

(Bareika vd., 2017; Carbonnelle vd., 2012; Angelakis vd., 2011; Nacef vd., 2017; Han vd., 2014; Soro-Yao vd., 2014; Seng vd., 2009).

Çizelge 2.6: MALDI-TOF-MS yönteminin bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlama etkinliği.

Cins düzeyinde tanımlama (%)	Tür düzeyinde tanımlama (%)	Bakteri grubu	Kaynak
95,4	84,1	Karışık	(Seng vd., 2009)
100	95,2	Karışık	(Eigner vd., 2009)
97,4	92,2	Karışık	(Van veen vd., 2010)
100	100	*Clostridium* spp.	(Chean vd., 2014)
95,2	90,5	Laktik asit bakterileri (LAB)	(Bareika vd., 2017)
100	92,3	(LAB)	(Angelakis vd., 2011)
100	96,7	(LAB)	(Nacef vd., 2017)
100	100	*Enterococcus* spp.	(Carbonnelle vd., 2012)

Çizelge 2.7'de laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan metotların yeterlilik düzeyleri, Çizelge 2.8'de ise geleneksel yollarla üretilen yerli ve yabancı bazı geleneksel peynirlerin *Enterococcus* spp. mikroflorası ve tanımlama yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 2.7: Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan metodların karşılaştırılması.

Yöntemler	Düzey	Sonuç
Fenotipik Yöntemler		
Morfolojik Yöntemler	Cins	Düşük
Fizyolojik Yöntemler	Cins	Düşük
Biyokimyasal Yöntemler	Cins/Tür	Orta
Protein Profilleri	Tür	Yüksek
Moleküler Yöntemler		
RFLP-PCR	Tür/Suş	Yüksek
RADP-PCR	Cins/Tür	Yüksek
AFLP-PCR	Tür/Suş	Yüksek
16S rRNA Sekanslama	Tür/Suş	Altın standart
Hibridizasyon	Cins/Tür	Yüksek
Kütle Spektrometrik Yöntemler		
MALDI-TOF-MS	Cins/Tür	Yüksek

Çizelge 2.8: Geleneksel yollarla üretilen peynirlerin enterokok mikroflorası.

Peynir Türü	**Laktik mikroflorada bulunan enterokoklar**	**Tanımlama Yöntemi**	**Kaynak**
Çömlek Peyniri	%33,64 : *Enterococcus faecium* *E. faecalis* *E. durans*	Biyokimyasal yöntemler ve PCR-RFLP	(Bulut vd., 2005)
Erzincan Tulum Peyniri	%41,48 : *Enterococcus faecium* *E. faecalis* *E. italicus* *E. thailandicus* *E. hirae* *E. mundtii*	16S rRNA	(İspirli, 2016)
Urfa Peyniri	%48,95: *Enterococcus faecium* *E. durans* *E. faecalis* *E. lactis* *E. hirae*	16S rRNA	(Kırmacı vd., 2016)
Salamura Beyaz Peyniri	%44,88 : *Enterococcus faecalis* *E. faecium* *E. avium* *E. durans*	Biyokimyasal yöntemler	(Dağdemir ve Özdemir, 2008)
Tomas Peyniri	%35,00: *Enterococcus faecium*	API 50 ve API 20 test kitleri	(Korucu, 2012)
Kargı Tulum Peyniri	%11,40: *Enterococcus durans,* *E. faecium*	16S rRNA	(Kunduhoğlu vd., 2012)

Çizelge 2.8 (devam): Geleneksel yollarla üretilen peynirlerin enterokok mikroflorası.

Beyaz Peynir (Ankara Yöresi)	%62,33: *Enterococcus faecium* *E. durans* *E. faecalis* *E. hirae*	Biyokimyasal yöntemler	(Durlu-Özkaya vd., 2001)
Beyaz Peynir (Isparta Yöresi)	%28,57: *Enterococcus faecalis* *E. durans* *E. avium*	Biyokimyasal yöntemler	(Ertürkmen ve Öner, 2015)
Piko peyniri (İtalyan)	%73,70: *Enterococcus faecalis,* *E. italicus,* *E. pseudoavium*	16S rRNA	(Domingos-Lopes vd., 2017)
Pecerino peyniri	%41,0: *Enterococcus faecium* *E. faecalis*	Biyokimyasal yöntemler	(Aquilanti vd., 2007)
İbores	%21,51: *E. faecium* *E. faecalis* *E. avium*	API 50 ve API 20 test kitleri	(Mas vd., 2002)
Pirot peyniri	%42,5: *E. faecalis* *E.faecium* *E. durans*	Rep-PZR	(Terzic-Vidojevic vd., 2009)
Maroille peyniri (Fransa)	%03,00: *Enterococcus devriesei*	MALDI-TOF-MS	(Nacef vd., 2017)

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmada Antep, Urfa, Malatya ve Maraş peynirlerinin her birinden 5'er adet olmak üzere toplam 20 adet peynir örneği materyal olarak kullanılmıştır. Numuneler, soğuk zincir kırılmadan laboratuvarlara getirilmiştir. Peynir örnekleri kitleyi temsil edebilmesi için her bir ilin farklı coğrafi bölgelerinden temin edilmiştir. Çizelge 3.1'de izolasyon örneklerine ilişkin bazı bilgiler verilmiştir.

Çizelge 3.1:İzolasyon materyalleri.

Örnek Kodu	Temin edildiği yer	Peynir adedi
P_1, P_2, P_3, P_4, P_5	Gaziantep	5
P_6, P_7, P_8, P_9, P_{10}	Şanlıurfa	5
P_{11}, P_{12}, P_{13}, P_{14}, P_{15}	Malatya	5
P_{16}, P_{17}, P_{18}, P_{19}, P_{20}	Kahramanmaraş	5

3.2 Metot

3.2.1 Enterokok suşlarının izolasyonu ve saflaştırılması

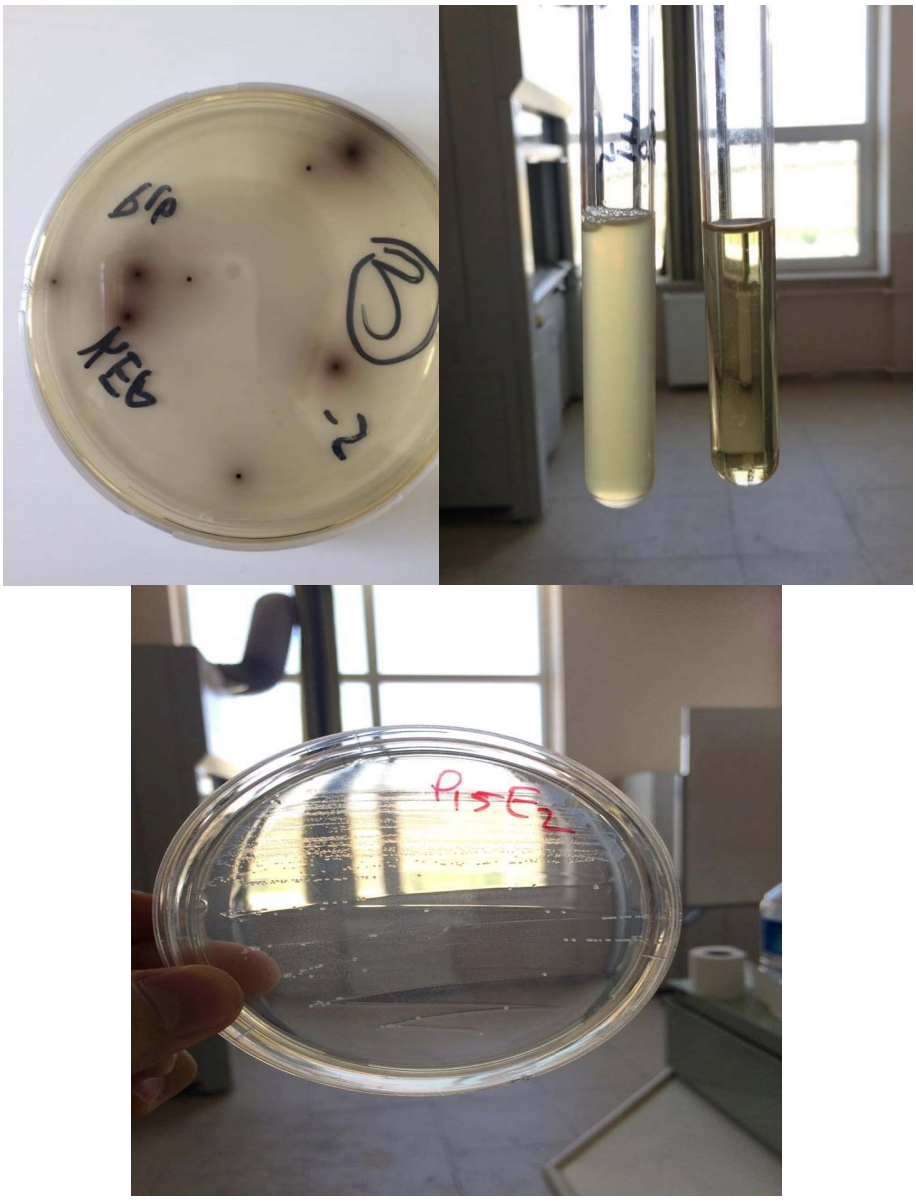
3.2.1.1 Enterokok suşlarının izolasyonu

Aseptik koşullar altında 10 g peynir örneği, 90 ml steril ¼ kuvvetinde Ringer solüsyonu ile karıştırılarak stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenize peynir örneğinden aseptik şartlar altında 10^{-7}'ye kadar seyreltme yapılıp Kanamycin Esculin Azide Agar'a (KEA) (Merck 1.05222) yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekimden sonra Petri kapları 37°C'de aerobik koşullar altında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ilk olarak, uygun sayım aralığındaki (30-300) koloniler sayılmıştır. Koloniler ilgili dilüsyon faktörü ile çarpılarak log kob/g olarak tespit edilmiştir. İkinci olarak, her bir peynir örneği için 4-5 adet olmak üzere etrafı siyah zonlu tipik enterokok kolonisi izolasyon için seçilmiştir (Harrigan, 1998).

3.2.1.2 İzolatların saflaştırılması

KEA üzerinde oluşan etrafı siyah zonlu enterokok kolonileri çift kademeli olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırmada ilk olarak enterokok kolonileri aseptik şartlar altında

bir öze ile alınarak Tryptic Soy Borth (CASO Broth) (Merck 1.05459) içerisinde 18-24 saat geliştirilmiştir. Daha sonra sürme yöntemi ile Tryptic Soy Agar (CASO Agar) (Merck 1.05458) üzerine ekim yapılmış ve tek koloni düşürülmeye çalışılmıştır (Şekil 3.1). Tek koloniye düşürülen kolonilerin tekrar CASO Broth besiyerine ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.1: KEA üzerinde tipik enterokok kolonileri ve saflaştırma basamakları.

3.2.2 Enterokokların ön identifikasyonları

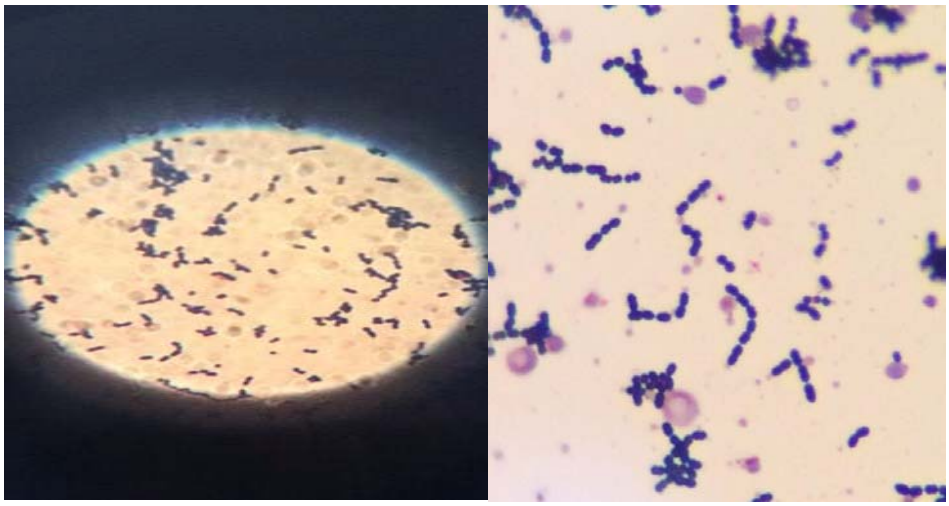
3.2.2.1 Katalaz reaksiyonu

Çift kademeli saflaştırma işlemi sonunda CASO Broth besiyerinde gelişen 18-24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alınarak üzerine %30'luk H_2O_2 çözeltisi

damlatılmıştır. Bu işlemin sonucunda, gaz çıkışı gözlenmeyen koloniler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Whittenburry, 1964).

3.2.2.2 Gram reaksiyonu

Gram reaksiyonu Norris vd. (1981) tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. CASO broth besiyerinde gelişen taze kültürler Gram boyamaya tabi tutulmuştur. Bakterilerin en geç 18-24 saatlik kültürler olmasına özen gösterilmiştir. Gram boyama sonucu menekşe moru olarak gözlenen koloniler Gram (+) olarak değerlendirilmiştir. Gram boyaması sonucu menekşe moru olan kok, diplokok ve/veya tetrakok yapıdaki kültürler saflık kontrolleri yapıldıktan sonra ayrılmıştır (Kaleli ve Durlu-Özkaya, 2000).



Şekil 3.2: Saflaştırılmış izolatların gram reaksiyonlarının mikroskoptaki görüntüsü.

3.2.3 Saf kültürlerin muhafazası

Ön tanımlama sonucu Gram (+) ve katalaz (-) izolatlar saflık kontrolleri yapıldıktan sonra %40 oranında steril gliserol içeren CASO Broth besiyerinde -24°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4 *Enterococcus* spp. türlerinin MALDI-TOF-TOF-MS yöntemi ile tanımlanması

3.2.4.1 Kültürlerin aktifleştirilmesi

Muhafaza edilen saf kültürler aktifleştirme amacıyla steril CASO Broth içeren tüplere inoküle edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda saf kültürlerin her birinden aseptik şartlar altında bir öze dolusu alınarak CASO Broth besiyerlerine aktarılmıştır. Daha sonra, kültürler 18-24 saat boyunca 37°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Aktifleştirilen kültürler CASO Agar besiyerine sürme yöntemiyle ekilerek her bir izolatın tek koloniye düşmesi sağlanmıştır.

3.2.4.2 Organik çözücünün hazırlanması ve matriks ile karıştırılması

İlk olarak, 2 mg HCCA (α-siyano-4-Hidroksisinnamik Asit) matriks kimyasalı 150 µl organik çözücü ile karıştırılmıştır. 1 ml organik çözücünün hazırlanması için ise 475 µl ddH_2O, 500 µl ACN (asetonitril solüsyonu) ve 25 µl TFA (Trifluoroasetik asit) çözeltilerinden alınmış ve steril bir eppendorf tüpü içerisinde iyice homojenize olana kadar karıştırılmıştır (Han vd., 2014).

3.2.4.3 MALDI-TOF-TOF-MS plakasının hazırlanması

Tek koloniye düşen saf kültürlerden aseptik şartlar altında steril bir kürdan yardımıyla alınarak MALDI-TOF plakasının (MTP 384; Bruker Daltonik GmbH, Karlsruhe, Germany) spotlarına sürülmüştür. Daha sonra, hazırlanan organik çözelti ve matriks karışımından 1 µl bakteri kültürünün üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Damlatılan solüsyonun sürülen bakteri kolonisini tamamen kaplamasına özen gösterilmiştir. Bu işlem her birinden iki paralelli olmak üzere toplam 84 enterokok izolatı için gerçekleştirilmiştir. Plaka son olarak MALDI-TOF-TOF-MS cihazının içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: MALDI-TOF-TOF-MS plakası ve cihaza yerleştirilmesi.

3.2.4.4 İzolatların tanımlanması

İlk olarak, cihazın mikrobiyolojik anlamda tanımlama yapabilmesi için uygun metot olan MBT-FC.par seçilmiştir. Daha sonra, yapılacak olan lazer ışımasının şiddeti %50 (50 Hz) olarak ayarlanmış ve ışıma başlatılmıştır. Her spotta yaklaşık olarak 4-5 farklı yere yapılan ışıma uygun pikler alınıncaya kadar devam etmiş ve bir sonraki spota geçilmiştir. İlk seferde sonuç alınamayan bakteri izolatları tekrar sürme

yöntemiyle geliştirilip aynı işlem basamakları tekrarlanmıştır. Sistem veritabanı olarak MALDI-BioTyper 3.0 kullanılmıştır (Bruker Daltonik, Karlsruhe, Germany).

3.2.5 Peynir örneklerinin kimyasal analizleri

Her bir peynir örneğinin 100 gramındaki kurumadde, kül, protein, yağ ve tuz miktarları ile laktik asit cinsinden % asitlik tayini ve pH değerleri belirlenmiştir.

3.2.5.1 Kurumadde tayini

Desikatörde saklanan sabit ağırlıktaki kurutma kapları içerisine yaklaşık 3 g ufalanmış peynir örneği tartılarak 105ºC'deki etüvün içerisine konulmuştur. Kurutma işlemi başladıktan sonra dördüncü ve beşinci saatlerde yapılan tartımlar sonucu sabit tartım ağırlığına gelmiş kurutma kapları desikatöre alınarak soğuması beklenmiştir. Son olarak ise 100 gram peynirdeki kurumadde miktarları hesaplanmıştır (Tekinşen vd., 2002).

3.2.5.2 Protein tayini

Protein miktarı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Bu bağlamda yaklaşık 1 g peynir örneği kjeldahl balonlarına aktarılarak üzerine 2 adet Kjeldahl tableti ve yaklaşık 15 ml H_2O_4 çözeltisinden eklenmiştir. Daha sonra saydam yeşil renk gözlemlenene kadar 420ºC'de yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işleminden sonra damıtma işleminde bir erlenmayere 25 ml %4'lük borik asit çözeltisi ve 1 ml bromo kserol yeşili indikatör olarak eklenmiştir. Kjeldahl tüpüne ise 50 ml saf su eklendikten sonra damıtma cihazına yerleştirilmiş ve üzerine 50 ml %40'lık NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra yaklaşık 100ºC'de damıtma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak 0.1 N HCl kullanılarak titrasyon işlemi yapılmıştır. Toplam protein hesaplandıktan sonra 6,38 faktörü ile çarpılarak % protein miktarı belirlenmiştir (Metin, 2008).

3.2.5.3 Yağ tayini

Yağ içeriğini belirlemek amacıyla %40'lık Van Gulik bütirometresinin kadehciğine rendelenmiş peynir örneğinden 3 g tartılarak bütirometreye yerleştirilmiştir. Daha sonra peynir hizasını geçene kadar yoğunluğu 1.50 g/cm^3 olan H_2SO_4 çözeltisinden eklenerek sıcak su banyosuna bırakılmıştır. Peynir örneği sülfirik asit çözeltisinde tamamen çözündükten sonra üzerine 1 ml isoamil alkol eklenmiş ve %35 taksimata kadar aynı yoğunluktaki sülfirik asit çözeltisinden eklenmiştir. Son olarak 65 ºC'ye ayarlanmış gerber santrifüjüne yerleştirilen bütirometreler 5 dakika boyunca 1200

devir/dakika şiddetinde santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra sonuçlar skaladan % olarak okunmuştur (Metin, 2008).

3.2.5.4 Tuz tayini

Tuz miktarını belirlemek amacıyla Mohr yöntemi uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 500 ml'lik balon jojeye 5 g peynir örneği tartılarak üzerine yaklaşık 200 ml distile su ilave edilmiştir. Daha sonra balon joje 60 ºC'deki su banyosuna konulmuş ve yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra 500 ml su çizgisine kadar distile su ile doldurulmuştur. Solüsyon süzgeç kağıdından süzdürüldükten sonra süzüntüden 25 ml alınmıştır. Daha sonra, 25 ml süzüntünün üzerine 1 ml %5'lik K_2CrO_4 eklenerek 0.1 N $AgNO_3$ ile titre edilmiştir. Harcanan $AgNO_3$ miktarı formülde yerine konularak tuz miktarı % cinsinden bulunmuştur (Tekinşen vd., 2002).

3.2.5.5 Kül tayini

Desikatörde saklanan sabit ağırlıktaki porselen krozelerin içerisine yaklaşık 1 g ufalanmış peynir örneği alınarak 550ºC'deki kül fırınının içerisine konulmuştur. Yaklaşık 3 saat sonra krozeler kül fırınından çıkarılıp desikatöre yerleştirilmiştir. İşlemin sonunda % kül miktarları hesaplanmıştır (Tekinşen vd., 2002).

3.2.5.6 Asidite tayini

Rendelenmiş peynir örneğinden 10 g bir erlenmayere alınarak üzerine 40 ºC'de bekletilen 105 ml su eklenmiştir. Peynirin dağılımı sağlandıktan sonra solüsyon süzgeç kağıdından süzülmüş ve süzüntüden 25 ml alınmıştır. Süzüntünün üzerine 2-3 damla %1'lik fenolftalein çözeltisi damlatıldıktan sonra 0.1 N NaOH ile titre edilmiştir. Son olarak laktik asit cinsinden asidite, sarfiyat miktarının formülde yerine koyulmasıyla elde edilmiştir (Tekinşen vd., 2002).

3.2.5.7 pH tayini

Peynirlerin pH'sını belirlemek için 10 g peynir örneği alınarak 10 ml su ile karıştırıldıktan sonra pH metre (Hanna pH 211 Instruments) ile direkt olarak ölçüm yapılmıştır (Tekinşen vd., 2002).

3.2.6 İstatistiksel analizler

Araştırmanın sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 22.0 paket programı kullanılarak varyans analizi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan testi ile değerlendirilmiştir (Duncan, 1955). Önem seviyesi $p<0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Enterokokların Sayım Sonuçları

Antep, Urfa, Malatya ve Maraş peynirlerinin enterokok sayıları ve istatistiksel karşılaştırılması Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde enterokok sayısı en düşük 3,18 ± 0,02 log kob/g olarak bulunurken en yüksek değer 8,25 ± 0,05 olarak saptanmıştır. Öte yandan, peynir grupları ayrı ayrı incelendiğinde enterokok sayısı en düşük Urfa peynirlerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1: Peynir örneklerinin enterokok sayım sonuçları ve peynir gruplarının Duncan testi sonuçları (log kob/g).

Antep Peyniri	**Enterokok**	**Malatya Peyniri**	**Enterokok**
P_1	7,34 ± 0,01	P_{11}	6,11 ± 0,05
P_2	8,25 ± 0,05	P_{12}	6,99 ± 0,13
P_3	4,67 ± 0,21	P_{13}	7,15 ± 0,04
P_4	6,25 ± 0,07	P_{14}	3,67 ± 0,15
P_5	7,15 ± 0,09	P_{15}	6,56 ± 0,03
Ortalama	6,73 ± 1,35[a]	**Ortalama**	6,09 ± 1,41[ab]
Urfa Peyniri	**Enterokok**	**Maraş Peyniri**	**Enterokok**
P_6	5,62 ± 0,04	P_{16}	6,99 ± 0,09
P_7	3,40 ± 0,03	P_{17}	6,72 ± 0,04
P_8	5,38 ± 0,14	P_{18}	7,15 ± 0,14
P_9	5,32 ± 0,07	P_{19}	4,11 ± 0,15
P_{10}	3,18 ± 0,02	P_{20}	6,73 ± 0,03
Ortalama	4,58 ± 1,18[b]	**Ortalama**	6,34 ± 1,26[ab]

* Farklı harflerle gösterilmiş sonuçlar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$).

Peynir grupları arasında enterokok sayısı bakımından Antep ve Urfa peynirleri arasında istatistiki açıdan önemli fark belirlenirken ($p<0,05$), Malatya ve Maraş peynirleri arasında istatistiki açıdan bir fark tespit edilmemiştir. Diğer taraftan, Antep ve Urfa peynir gruplarının enterokok sayıları istatistiki açıdan Malatya ve

Maraş peynir gruplarıyla benzer bulunmuştur. Peynir gruplarındaki enterokok sayılarının farklı olmasının nedenleri arasında kontaminasyon kaynakları ve düzeyleri, uygulanan haşlama sıcaklığı ve olgunlaşma koşulları olduğu düşünülmektedir.

Enterokoklar sütün doğal mikroflorasında bulunmadığından sayıları çoğunlukla kontaminasyona bağlı olarak oldukça heterojen bir dağılım göstermektedir (Giraffa, 2003). Çiğ sütten üretilen peynirlerde, enterokokların sayısının olgunlaşma periyodu sonucunda 5,00 – 7,00 log kob/g arasında değiştiği bildirilmektedir (Franz vd., 1999). Sonuçlar incelendiğinde peynir numunelerinde belirlenen enterokok sayılarının genellikle diğer çalışmalarda belirtilen aralıkta olduğu görülmektedir.

Kırmacı (2010), Şanlıurfa'nın değişik bölgelerinden topladığı 20 adet Urfa peyniri örneğinde enterokok sayısını ortalama 5,71 ± 0,90 log kob/g olarak bulurken bu değer tespit ettiğimiz değerlerden daha yüksektir. Diğer yandan, araştırmacının Şanlıurfan'nın Kısas yöresinden topladığı peynirlerde bu sayı ortalama olarak 4,78 ± 0,33 log kob/g bulunmuş olup çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Yapılan literatür araştırmasında Antep, Malatya ve Maraş peynirlerinde enterokok sayılarını belirten bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple elde edilen sonuçlar benzer peynirler baz alınarak değerlendirilmiştir.

Bulut (2011), salamurada olgunlaştırılan ve pastörizasyon işlemi uygulanarak üretilen beyaz peynirde olgunlaşma periyodu sonucunda enterokok sayısını 5,22 ± 0,14 log kob/g olarak bulmuştur. Bu sonuç tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında Urfa peynirinden elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Colombo vd. (2010), çiğ sütten geleneksel yollarla üretilmiş İtalyan keçi peynirindeki enterokok sayısını olgunlaşma periyodu sonunda 6.8 ± 0.6 log kob/g olarak belirlemiştir. Araştırmacının bildirdiği değer tez çalışmasında elde edilen Antep, Malatya ve Maraş peynirlerinden elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Diğer yandan, Renye vd. (2008) yarı-sert özellikteki Meksika peynirinde olgunlaşma sonunda enterokok sayısını ortalama olarak 7,49 ± 0,35 olarak tespit etmiş olup bu değerin çalışma sonuçlarından daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen değerler ile diğer çalışmalar arasındaki farklılıkların çiğ sütün başlangıçtaki mikroorganizma yükünün farklı olması, telemeye uygulanan haşlama işleminin ısı ve süresi ile salamuranın tuz miktarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir

4.2 *Enterococcus* spp. İzolasyon Sonuçları

Araştırma kapsamında 20 adet peynir örneğinden Antep peynirinden 23, Urfa peynirinden 22, Malatya peynirinden 21 ve Maraş peynirinden 18 adet olmak üzere toplam 84 suş izole edilmiş (Çizelge 4.2) ve yukarıdaki kriterlere göre seçilen 84 izolatın hepsi *Enterococcus* spp. olarak değerlendirilmiştir. İzolatların numaralandırılmasında ise peynirin numarası ve o peynire ait izolatın sırası dikkate alınmıştır. Örneğin 3 numaralı peynirden izole edilen ve *Enterococcus* spp. olarak değerlendirilen 2. izolat P_3E_2 şeklinde kodlanmıştır.

Çizelge 4.2: Çalışma kapsamında izole edilen enterokokların izolasyon kaynağı ve sayısı

İzolasyon kaynağı	İzolat Kodu	İzolat Sayısı
Antep peyniri	P_1E_1, P_1E_2, P_1E_3, P_1E_4, P_1E_5, P_2E_1, P_2E_2, P_2E_3, P_2E_4, P_2E_5, P_3E_1, P_3E_2, P_3E_3, P_4E_1, P_4E_2, P_4E_3, P_4E_4, P_4E_5, P_4E_5, P_5E_1, P_5E_2, P_5E_3, P_5E_4, P_5E_5	23
Urfa peyniri	P_6E_1, P_6E_2, P_6E_3, P_6E_4, P_6E_5, P_7E_1, P_7E_2, P_7E_3, P_7E_4, P_7E_5, P_8E_1, P_8E_2, P_8E_3, P_8E_4, P_8E_5, P_9E_1, P_9E_2, P_9E_3, P_9E_4, P_9E_5, $P_{10}E_1$, $P_{10}E_2$	22
Malatya peyniri	$P_{11}E_1$, $P_{11}E_2$, $P_{11}E_3$, $P_{11}E_4$, $P_{11}E_5$, $P_{12}E_1$, $P_{12}E_2$, $P_{12}E_3$, $P_{12}E_4$, $P_{13}E_1$, $P_{13}E_2$, $P_{13}E_3$, $P_{13}E_4$, $P_{13}E_5$, $P_{14}E_1$, $P_{14}E_2$, $P_{14}E_3$, $P_{14}E_4$, $P_{15}E_1$, $P_{15}E_2$, $P_{15}E_3$	21
Maraş peyniri	$P_{16}E_1$, $P_{16}E_2$, $P_{16}E_3$, $P_{16}E_4$, $P_{17}E_1$, $P_{17}E_2$, $P_{17}E_3$, $P_{17}E_4$, $P_{17}E_5$, $P_{18}E_1$, $P_{18}E_2$, $P_{18}E_3$, $P_{19}E_1$, $P_{19}E_2$, $P_{20}E_1$, $P_{20}E_2$, $P_{20}E_3$, $P_{20}E_4$	18

4.3 MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper Tanımlama Sonuçları

Ön tanımlaması yapılan ve cins bazında enterokok olarak tanımlanan 84 izolatın tamamı tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tamamı *Enterococcus* türleri olarak

tanımlanan izolatların MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper sonuçları detaylı olarak Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3: Enterokokların MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper tanımlama sonuçları ve güven aralıkları

	Tanımlama sonucu	**GA**		**Tanımlama sonucu**	**GA**
Antep peyniri	*E. faecium* (P_1E_1)	2,526	**Urfa peyniri**	*E. faecium* (P_6E_1)	2,165
	E. faecium (P_1E_2)	2,495		*E. faecium* (P_6E_2)	2,596
	E. faecium (P_1E_3)	2,327		*E. faecium* (P_6E_3)	2,376
	E. faecium (P_1E_4)	2,528		*E. faecium* (P_6E_4)	2,611
	E. faecium (P_1E_5)	2,573		*E. faecium* (P_6E_5)	2,441
	E. faecium (P_2E_1)	2,306		*E. durans* (P_7E_1)	2,334
	E. faecium (P_2E_2)	2,403		*E. faecium* (P_7E_2)	2,433
	E. faecium (P_2E_3)	2,585		*E. faecium* (P_7E_3)	2,523
	E. faecium (P_2E_4)	2,454		*E. faecium* (P_7E_4)	2,485
	E. faecium (P_2E_5)	2,467		*E. faecium* (P_7E_5)	2,498
	E. faecium (P_3E_1)	2,090		*E. durans* (P_8E_1)	2,303
	E. faecalis (P_3E_2)	2,196		*E. durans* (P_8E_2)	2,360
	E. thailandicus (P_3E_3)	2,083		*E. durans* (P_8E_3)	2,380
	E. faecalis (P_4E_1)	2,455		*E. durans* (P_8E_4)	2,370
	E. faecium (P_4E_2)	2.487		*E. faecium* (P_8E_5)	2,403
	E. faecium (P_4E_3)	2,470		*E. faecium* (P_9E_1)	2,313
	E. faecalis (P_4E_4)	2,352		*E. faecium* (P_9E_2)	2,358
	E. faecalis (P_4E_5)	2,008		*E. faecium* (P_9E_3)	2,346
	E. faecalis (P_5E_1)	2,349		*E. faecium* (P_9E_4)	2,367
	E. faecium (P_5E_2)	2,411		*E. faecium* (P_9E_5)	2,599
	E. faecalis (P_5E_3)	2,014		*E. durans* ($P_{10}E_1$)	2,405
	E. faecalis (P_5E_4)	2,330		*E. casseliflavus* ($P_{10}E_2$)	2,127
	E. faecium (P_5E_5)	2,408			
Malatya peyniri	*E. faecalis* ($P_{11}E_1$)	2,392	**Maraş peyniri**	*E. durans* ($P_{16}E_1$)	2,350
	E. faecalis ($P_{11}E_2$)	2,429		*E. durans* ($P_{16}E_2$)	2,384
	E. faecalis ($P_{11}E_3$)	2,385		*E. durans* ($P_{16}E_3$)	2,214
	E. faecalis ($P_{11}E_4$)	2,323		*E. faecium* ($P_{16}E_4$)	2,375
	E. faecalis ($P_{11}E_5$)	2,439		*E. faecalis* ($P_{17}E_1$)	2,152
	E. gallinarum ($P_{12}E_1$)	2,375		*E. faecalis* ($P_{17}E_2$)	2,429
	E. gallinarum ($P_{12}E_2$)	2,314		*E. faecalis* ($P_{17}E_3$)	2,335
	E. gallinarum ($P_{12}E_3$)	2,346		*E. faecalis* ($P_{17}E_4$)	2,301
	E. gallinarum ($P_{12}E_4$)	2,311		*E. faecalis* ($P_{17}E_5$)	2,234
	E. faecalis ($P_{13}E_1$)	2,366		*E. durans* ($P_{18}E_1$)	2,183
	E. faecalis ($P_{13}E_2$)	2,409		*E. casseliflavus* ($P_{18}E_2$)	2,336
	E. faecalis ($P_{13}E_3$)	2,377		*E. faecalis* ($P_{18}E_3$)	2,228
	E. faecalis ($P_{13}E_4$)	2,365		*E. faecalis* ($P_{19}E_1$)	2,424
	E. faecalis ($P_{13}E_5$)	2,397		*E. faecalis* ($P_{19}E_2$)	2,350

Çizelge 4.3 (devamı): Enterokokların MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper tanımlama sonuçları ve güven aralıkları

Malatya peyniri	*E. faecalis* ($P_{14}E_1$)	2,335	**Maraş peyniri**	*E. durans* ($P_{20}E_1$)	2,226
	E. faecalis ($P_{14}E_2$)	2,360		*E. durans* ($P_{20}E_2$)	2,326
	E. faecalis ($P_{14}E_3$)	2,300		*E. casseliflavus* ($P_{20}E_3$)	1,992
	E. faecalis ($P_{14}E_4$)	2,207		*E. durans* ($P_{20}E_4$)	2,414
	E. faecalis ($P_{15}E_1$)	2,219			
	E. faecalis ($P_{15}E_2$)	2,300			
	E. faecalis ($P_{15}E_3$)	2,184			

MALDI-TOF-TOF-MS sonuçlarına göre 84 izolatın 32'si *Enterococcus faecalis*, 31'i *E. faecium*, 13'ü *E. durans*, 4'ü *E. gallinarum*, 3'ü *E. casseliflavus* ve 1'i de *E. thailandicus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: Tanımlanan enterokok türleri ve toplamdaki sayı ve yüzdeleri.

Bakteri türü	**İzolat sayısı**	**İzolat oranı (%)**
Enterococcus faecalis	32	38,09
Enterococcus faecium	31	36,90
Enterococcus durans	13	15,48
Enterococcus gallinarum	4	4,76
Enterococcus casseliflavus	3	3,57
Enterococcus thailandicus	1	1,20

Her bir peynir farklı farklı değerlendirildiğinde ise en fazla tür çeşidi Maraş ve Antep peynirlerinde elde edilmiştir. Peynir gruplarına göre türlerin dağılımı ise Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Enterokokların peynir mikroflorasında canlılığını sürdürebilmesinin en büyük nedeni düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanabilmesidir (Klein, 2003). Geleneksel yollarla üretilen Antep, Urfa, Malatya ve Maraş peynirleri gibi sıkma peynirlerinin hijyenik olmayan koşullarda ve çiğ sütten üretilerek yüksek tuz konsantrasyonlarında olgunlaştırılması enterokokların gelişimini desteklemektedir (Giraffa, 2003). Olgunlaşma esnasında gelişimlerini sürdüren ve telemede ilk olarak 4-6 log kob/g düzeylerinde bulunan enterokoklar olgunlaşma periyodu sonunda 5-7 log kob/g düzeylerine kadar çıkabilmektedir (Franz vd., 1999). Enterokoklar, Akdeniz kuşağında özellikle çiğ sütten geleneksel yollarla üretilen peynirlerde bol miktarda bulunmaktadır (Giraffa, 2003). Peynirde bulunmaları her ne kadar fekal kontaminasyonu ifade etse de olgunlaşma periyodunda tat ve aroma bileşenleri oluşturarak peynirin organoleptik özelliklerini iyileştirmektedir (Moreno vd., 2006). Enterokoklar arasında peynirde en çok bulunan türler sırasıyla *Enterococcus*

faecium, *E. faecalis* ve *E. durans*'dır (Franz vd., 1999; Giraffa, 2003). Tez çalışması kapsamında da tanısı yapılan 84 izolatın 76 tanesinin bu üç türe ait suşlar olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5: Peynir grupları ve enterokok dağılımları.

Antep peyniri	**İzolat sayısı**	**İzolat oranı (%)**
Enterococcus faecium	15	65,22
Enterococcus faecalis	7	30,43
Enterococcus thailandicus	1	4,35
Urfa peyniri		
Enterococcus faecium	15	68,18
Enterococcus durans	6	27,27
Enterococcus casseliflavus	1	4,55
Malatya peyniri		
Enterococcus faecalis	17	80,95
Enterococcus gallinarum	4	19,05
Maraş peyniri		
Enterococcus faecalis	8	44,44
Enterococcus durans	7	38,89
Enterococcus casseliflavus	2	11,11
Enterococcus faecium	1	5,56

Enterokokların doğal yaşam ortamı memeli hayvanların bağırsaklarıdır. İnsan dışkısında enterokok türleri arasında dominant olarak bulunan *E. faecalis* dışında *E. faecium*, *E. hirae*, *E. avium* ve *E. durans* türlerinin de bulunduğu bildirilmektedir (Gelsemino vd., 2002). Ayrıca, memeli hayvanların dışkısından daha az sıklıklarla enterokoklar izole edilebilmektedir. Bunlar arasında *E. faecium* inek bağırsağından en çok izole edilen tür olup bunu *E. faecalis*, *E. hirae* ve *E. casseliflavus* türleri takip etmektedir (Devriese vd., 1992). *E. gallinarum* türü özellikle vankomisine karşı gösterdiği direnç nedeniyle birçok hastane enfeksiyonundan izolasyonu mümkündür ve zaman zaman insan bağırsak mikrobiyatasının da bir parçası olabilmektedir ve dolayısıyla dışkıdan izole edilebilmektedir (Narciso-Schiavon vd., 2015). Son olarak, *E. thailandicus* ilk olarak Tayland'da sosisten izole edilmiştir. İnsan dışkısı kaynaklı olduğu düşünülen *E. thailandicus* moleküler genetik olarak %99.3-%99.6 gibi büyük oranda *E. hirae* ile benzerlik gösterdiği bilinmektedir (Tanasupawat vd., 2008).

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgileri ile kıyaslandığında *E. faecalis, E. faecium* türlerinin hem insan dışkısından hem de memeli hayvan dışkısından bulaşma ihtimallerinin olmasından dolayı dominant mikrofloranın bu iki tür tarafından oluşması şaşırtıcı bir sonuç değildir. Öte yandan, baskın olmayan mikrofloranın başında gelen *E. durans, E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. thailandicus* türlerinin

insan kaynaklı bir fekal bulaşı olmasından dolayı direkt veya indirekt olarak insan dışkısından bulaşması sonucu süte, oradan telemeye, oradan da peynire geçtiği düşünülmektedir.

Geleneksel Urfa peynirinde yapılan bir çalışmada Uraz vd. (2008) elde ettiği 80 laktik asit bakterisi izolatının 37'sini *Enterococcus* spp. olarak tanımlarken, bunların 26'sını (%70,27) *E. faecalis*, 5'ini *E. faecium* (%13,51) ve 1'ini de *E. hirae* (%2,70) olarak tanımlamıştır. Uraz vd. (2008) tarafından elde edilen sonuçlar çalışma sonuçlarıyla benzerlik gösterse de hâkim enterokok florasını tez çalışmasında *E. faecium* ve *E. durans* oluşturması bakımından farklılık göstermektedir.

Urfa peynirinde yapılan bir başka çalışmada ise Kırmacı vd. (2016), izole ettiği laktik asit bakterilerini 16S rRNA dizi analizi ile tanımlamış ve aralarından izole ettiği 70 *Enterococcus* spp. türünde baskın florayı *E. faecium* (%40,00), *E. durans* (%32,85) ve *E. faecalis* (%18,57) türlerinin oluşturduğunu bildirmiş ve bunlara ek olarak da az sayıda izolatı *E. lactis* (%5,71) ve *E. hirae* (%2,81) olarak tanımlamıştır. Araştırmacının tespit ettiği sonuçlar tez sonuçlarıyla karşılaştırıldığında baskın mikroflora bakımından benzerlik gösterse de azınlığı oluşturan türler bakımından farklılıklar göstermektedir.

Literatürde Antep, Malatya ve Maraş peynirlerinden enterokok ve/veya laktik asit bakterisi izolasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple çalışma sonuçları benzer peynirler baz alınarak değerlendirilmiştir.

Geleneksel olarak inek sütü kullanılarak çiğ sütten elde edilen ve telemesi haşlanan Piko peynirinde sekanslama ile yapılan tanı sonucunda elde edilen 84 izolatın 81'inin *Enterococcus faecium*, 2'sinin *E. pseudoavium* ve 1'inin de *E. italicus* olarak tanımlandığı bildirilmektedir (Domingos-Lopes vd., 2017). Sonuçlar tez sonuçları ile karşılaştırıldığında hakim enterokok türü bakımından benzerlik göstermekte, diğer türler bakımından ise farklılık göstermektedir.

Aquilanti vd. (2007) Pecerino peynirinden izole ettiği 43 enterokok türünün fenotipik karakterler baz alınarak yapılan identifikasyonu sonucu 24'ünü *E. faecium* (%55,81) ve 19'unu ise *E. faecalis* (%44,19) olduğunu bildirmektedir. Sonuçlar tez sonuçları ile kıyaslandığında dominant türler bakımından benzerlik göstermektedir.

Durlu-Özkaya vd. (2001) Ankara ilinden toplanan ve geleneksel yollarla çiğ sütten üretilmiş beyaz peynir örneklerinden izole ettiği enterokokları SDS-PAGE yöntemi ile tanımlamış, baskın enterokok mikroflorasının sırasıyla *E. hirae* (%54,34), E. *faecium* (%32,60) türlerinden oluştuğunu ve baskın olmayan enterokok

mikroflorasının ise sırasıyla *E. faecalis* (%8,69*)* ve *E. durans* (%4,35) tarafından oluştuğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar tez sonuçlarıyla karşılaştırıldığında hem baskın hem baskın olmayan enterokok mikroflorası bakımından farklılık göstermektedir. Tez çalışmasında *E. hirae* hiç izole edilmezken baskın mikroflorayı *E. faecium, E. faecalis ve E. durans* oluşturmaktadır.

İspirli (2016) tarafından yapılan çalışmada Erzurum tulum peynirlerinden elde edilen enterokok izolatları 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanmış ve baskın mikrofloranın *E. faecium* (%61,61) ve *E. faecalis* (19,64) türlerinden oluştuğu, baskın olmayan mikrofloranın ise sırasıyla *E. italicus* (%8,03), *E. thailandicus* (%5,36), *E. hirae* (%3,57) ve *E. mundtii* (%1,78) türlerinden oluştuğu bildirilmiştir. Araştırmacının elde ettiği sonuçlar ile tez çalışma sonuçları kıyaslandığında baskın mikroflora bakımından *E. durans* türü hariç benzerlik gösterirken baskın olmayan mikrofloradaki en büyük benzerlik *E. thailandicus* türünün varlığı olmuştur.

İspirli vd. (2017) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise beyaz peynirden 12 adet enterokok izole edilerek sekanslama sonucunda tanımlanmış ve bunlar arasında baskın mikrofloranın *E. durans* (%41,67) ve *E. faecalis* (%33,33) türleri tarafından oluştuğu görülürken baskın olmayan türler arasında ise *E. faecium* (%8,33)*, E. gallinarum* ve *E. italicus* (%8,33) yer almıştır. Bu sonuçlar tez sonuçları ile kıyaslandığında en dikkat çekici bakteri türünün her iki çalışmada da baskın olmayan mikroflorada ortak olan *E. gallinarum* olduğu görülmektedir.

MALDI-TOF-MS veya MALDI-TOF-TOF-MS yöntemleri kullanılarak peynirden izole edilip tanımlanan sadece 2 çalışmaya rastlanmıştır. Nacef vd. (2017) peynirden izole ettiği 67 izolattan yalnızca 2 tanesini enterokok olarak tanımlarken iki izolat da *E. devriesei* olarak tanımlanmıştır. Öte yandan, Doğan ve Özpınar (2017), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladığı 40 farklı peynirden 43 adet enterokok izole ederken bunların tamamını *E. faecium* olarak tanımlamıştır. Bu sonuçlar tez çalışmasıyla kıyaslandığında tanımlanan tür çeşidinin azlığı bakımından oldukça farklılık göstermektedir.

Peynir grupları arasında izole edilen türlerin farklı olmasının en büyük sebebinin kontaminasyon kaynağı olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra MALDI-TOF-MS yöntemi altın standart olarak kabul edilen 16S rRNA dizi analizi ile elde edilen sonuçlar kadar kesinlik taşımamaktadır. Dolayısıyla güven seviyesi düşük olan türlerde tanımlama %100 kesin değildir.

MALDI-TOF-MS yöntemi ve türevleri bakteri izolatının protein parmak izinin veritabanındaki verilerle kıyaslanmasını baz alarak bakteri tanımlaması yapmaktadır (Steensels vd., 2011). Yapılan çalışmalar sonucunda MALDI-TOF-MS yönteminin biyokimyasal yöntemlerden çok daha iyi sonuç verdiği ancak genotipik yöntemler kadar her bakteri türü ve alttüründe başarılı olmadığı görülmüştür (Bareika vd., 2017). Elde edilen bakteri spektrumları sistemde kayıtlı olan verilerle kıyaslanarak bir güven aralığı (GA) elde edilmektedir. Skor çalışmalara göre değişmekle birlikte genellikle birbirine yakın olmaktadır. Örneğin Van Veen vd. (2010) GA ≥ 2,0 değerini tür bazında doğru, 2,0 ≥ GA ≥ 1,7 değerini cins bazında doğru kabul ederken, 1,7 ≥ GA değerini ise doğru bir tanımlama olarak kabul etmemektedir.

Tez çalışması sonuçlarına göre, güvenirlilik sınırı Van Veen vd. (2010) tarafından kullanılan sınır doğru kabul edildiğinde GA ≥ 2,0 skorunu sağlayan 83, 2,0 ≥ GA ≥ 1,7 değerini sağlayan ise 1 izolat bulunmaktadır. Bu sonuçlar ışığında cins bazında tanımlama da 84 izolatın 84 tanesi de doğru tanımlanarak %100'lük başarı sonucu elde edilmiştir. Bu veriler MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper ile tanımlama öncesinde gerçekleşen morfolojik testler, Gram ve katalaz reaksiyonları ile desteklenmektedir. Nitekim tanımlama öncesinde 84 saf bakteri izolatı da Gram pozitif, katalaz negatif reaksiyon verirken, morfolojik olarak kok şeklinde görülmüştür. Sonuçlar tür bazında incelendiğinde ise 84 izolattan 83 tanesi GA ≥ 2,0 skorunu sağlarken %98,81'lik bir başarı elde edilmiştir.

Öte yandan, Nacef vd. (2017) tarafından değerlendirilmeye alınan güven aralığı referans alındığında cins ve tür düzeyinde elde edilen başarı oranları değişmektedir. Çizelge 4.6'da detaylı bir şekilde verilen açıklamalar MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper cihazının tedarikçisi tarafından da önerilmektedir (Bruker Daltonik, Karlsruhe, Germany).

Çizelge 4.6: MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper cihazının güven aralıklarının anlamları.

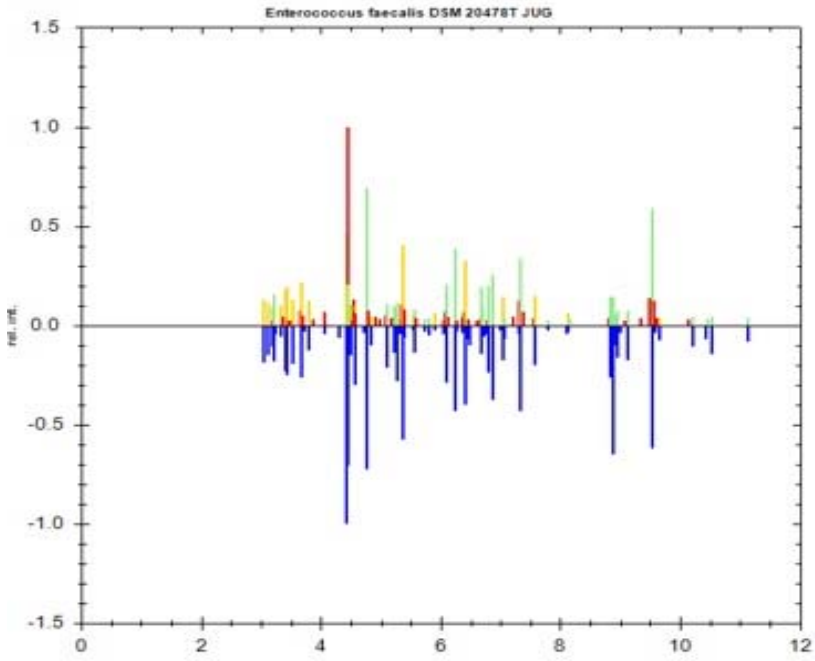
Güven Aralığı	Tanım	Sembol	Renk
2,300 – 3,000	Çok yüksek ihtimalli tür tanımlaması	+++	Yeşil
2,000 – 2,299	Cins bazında kesin tanımlama, yüksek ihtimalli tür tanımlaması	++	Yeşil
1,700 – 1,999	Yüksek ihtimalli cins tanımlaması	+	Sarı
0,000 – 1,699	Güvenilir olmayan tanımlama	-	Kırmızı

Çizelge 4.6'da verilen güven aralıkları baz alınarak yapılan değerlendirme sonucuna göre elde edilen bulgular Çizelge 4.7'de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde izolatların % 78,57'si 3,000 ≥ GA ≥ 2,300, %19,05'si 2,300 ≥ GA ≥ 2,000 aralığında bulunurken, 1,999 ≥ GA ≥ 1,700 aralığında yalnızca bir izolat tanımlanmıştır. Bu aralıkta tanımlanan *Enterococcus casseliflavus* morfolojik olarak kok şeklinde gözlemlenirken, Gram pozitif ve katalaz negatif reaksiyon vererek cins düzeyinde MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper sonucuyla örtüşmektedir.

Çizelge 4.7: MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper cihazının güven aralıklarına göre tanımlanan izolat sayıları.

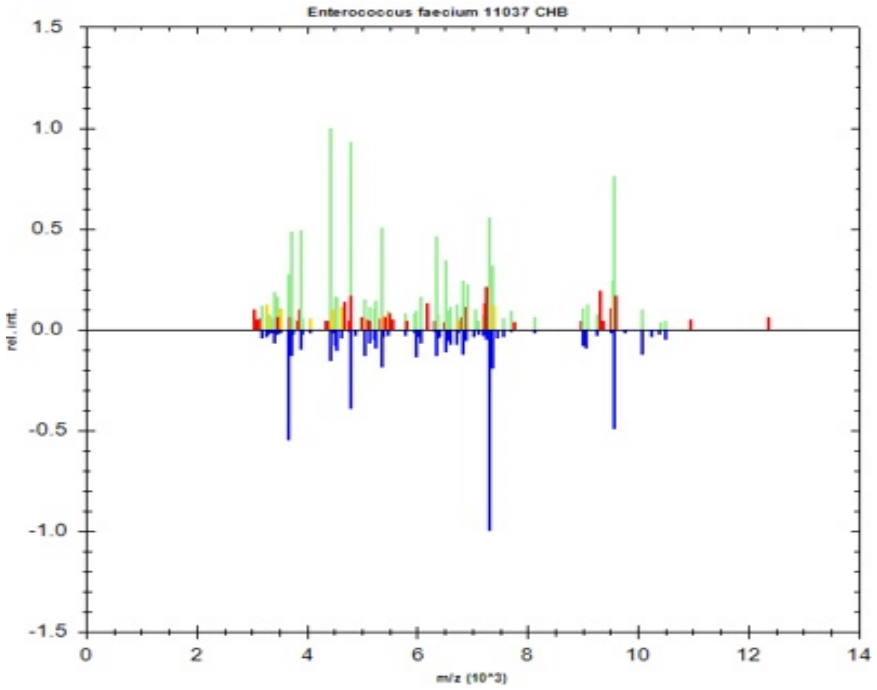
GA	Antep peyniri	Urfa peyniri	Malatya peyniri	Maraş peyniri	Toplam
2,300-3,000	18	20	18	10	66
2,000-2,299	5	2	3	7	17
1,700-1,999	-	-	-	1	1

MALDI-TOF-MS tanımlamasında iyonlar moleküler kütle (m) / yük (z) oranı ve bağıl yoğunluklarına göre ayrılmaktadır. Her bakteri türüne özgü olan bu karakteristik özellikler ise daha sonra cihazın veritabanındaki referans spektrumlarla karşılaştırılmaktadır. İzolatlardan elde edilen ve karşılaştırmaları yapılan spektrumlar Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6' da verilmiştir.

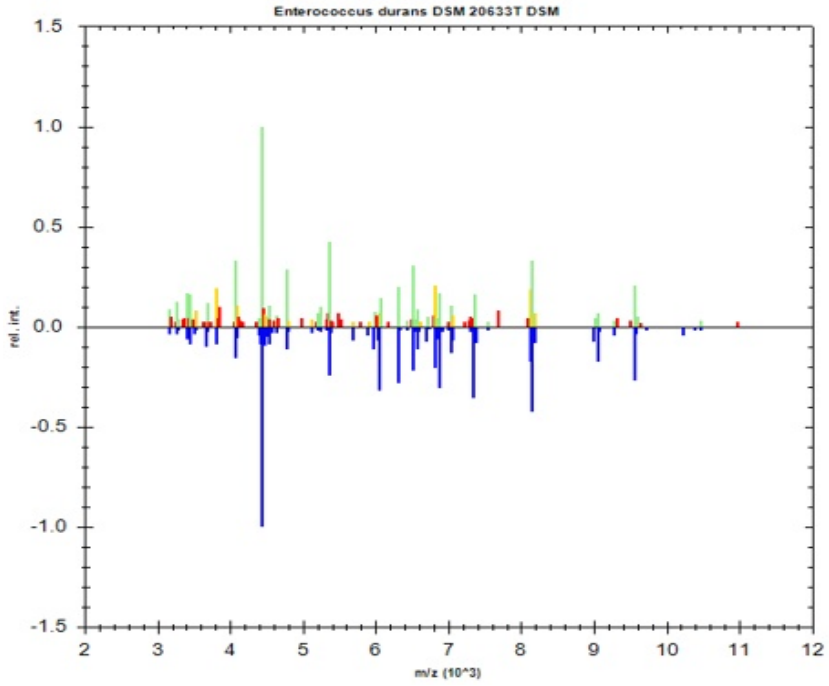


Şekil 4.1: *Enterococcus faecalis* DSM 20478T suşuna ve P_4E_1 izolatına ait spektrum.

.

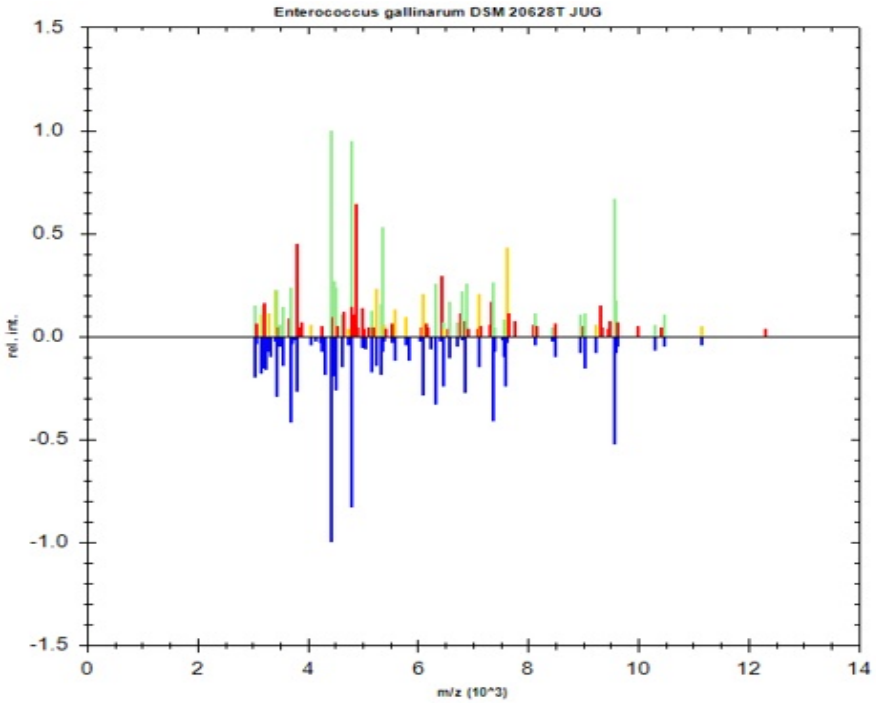


Şekil 4.2: *Enterococcus faecium* 11037 CHB suşuna ve P_6E_4 izolatına ait spektrum.

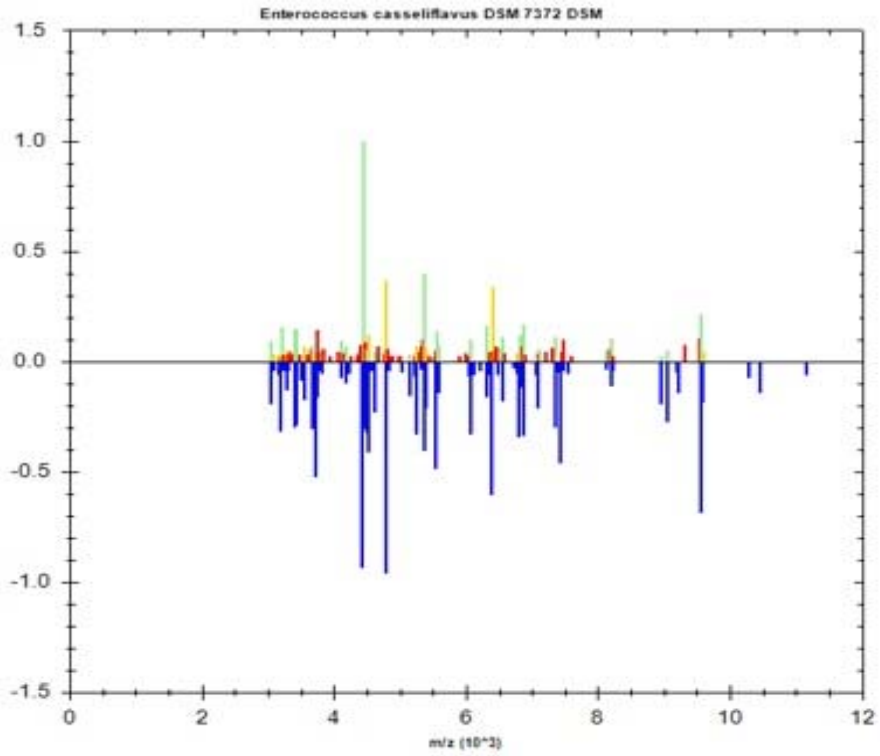


Şekil 4.3: *Enterococcus durans* DSM 20633T suşuna ve P_20E_4 izolatına ait spektrum.

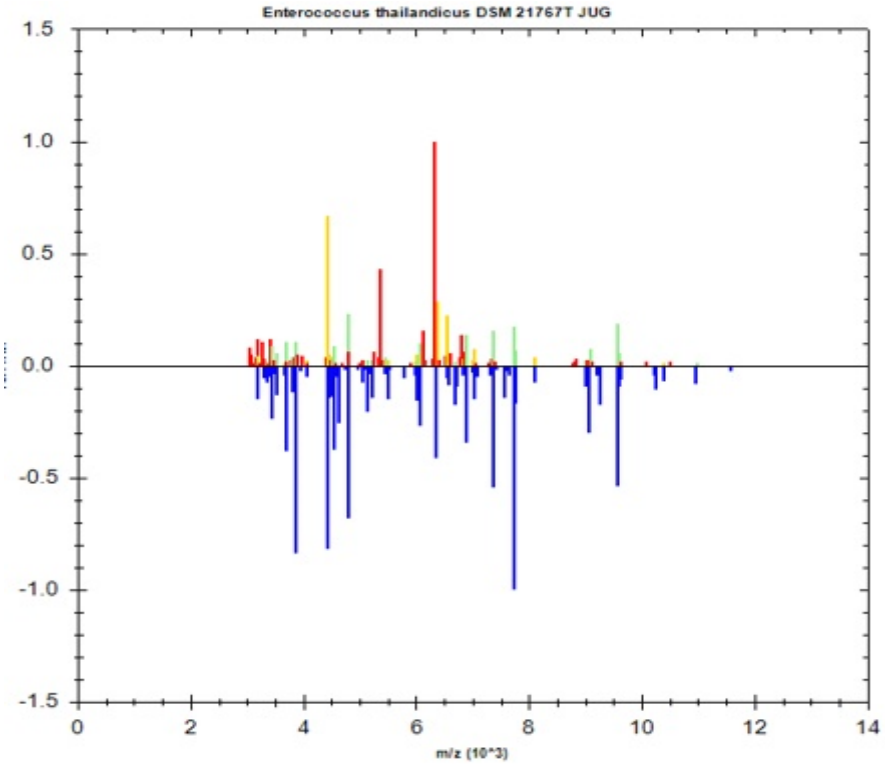
.



Şekil 4.4: *Enterococcus gallinarum* DSM 20628T suşuna ve $P_{12}E_2$ izolatına ait spektrum.



Şekil 4.5: *Enterococcus casseliflavus* DSM 20628T suşuna ve $P_{18}E_3$ izolatına ait spektrum.



Şekil 4.6: *Enterococcus thailandicus* DSM 21767T suşuna ve P_3E_5 izoaltına ait spektrum.

4.4 Peynir Örneklerinin Kimyasal Analiz Sonuçları

Yirmi adet peynir örneğine ait elde edilen bazı kimyasal özelliklere ilişkin analiz sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile peynir gruplarının kendi arasındaki istatistiki sonuçları Duncan testi kullanılarak yapılmış ve Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9'da peynir gruplarının kurumadde içerikleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir farka rastlanmamıştır.

Numuneler tespit edilen protein değerlerine göre karşılaştırıldığında ise en büyük farkın Antep, Maraş ve Malatya peynirlerinde olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Öte yandan, Maraş ve Urfa peynirleri ile Antep ve Urfa peynirleri protein içerikleri bakımından birbirlerine benzerlik göstermektedir. Aradaki farklılığın ise kuru madde oranları istatistiki açıdan farklı olmadığından dolayı kullanılan sütün çeşidinden ve üretim tekniklerindeki ufak farklılıklardan olduğu düşünülmektedir.

İncelenen peynirler yağ içerikleri bakımından kıyaslandığında en büyük farklılığın Urfa ve Malatya peynirlerinde olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Öte yandan, Antep ve Maraş peynirleri yağ içerikleri bakımından birbirlerine benzer bulunmuştur.

Araştırma bulguları arasındaki farklılıkların üretim tekniğinin farklılık göstermesi ve kullanılan sütün çeşidine bağlı olarak kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.8: Peynir örneklerinin kimyasal analiz sonuçları.

Örnek	Kurumadde (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	Kül (%)	Asitlik (%)	pH
Antep Peyniri							
P_1	58,93±0,07	27,40±0,20	26,00±0,00	6,29±0,15	8,12±0,02	0,4320±0,036	5,48±0,05
P_2	57,96±0,02	26,63±0,24	23,00±0,00	2,80±0,16	8,04±0,05	0,3600±0,036	5,24±0,02
P_3	51,31±0,11	23,66±0,12	20,00±0,50	2,92±0,07	5,72±0,07	0,6116±0,000	5,65±0,01
P_4	63,45±0,05	28,75±0,05	27,00±1,00	2,69±0,10	6,24±0,09	0,5037±0,072	5,74±0,00
P_5	57,45±0,10	25,45±0,09	24,00±0,00	2,05±0,22	7,89±0,13	0,4320±0,000	5,46±0,04
Ortalama	57,82±4,34	26,38±1,93	24,00±2,74	3,35±1,68	7,20±1,13	0,4679±0,095	5,51±0,19
Urfa Peyniri							
P_6	49,59±0,13	22,78±0,12	14,00±0,50	11,24±0,21	10,23±0,16	0,3600±0,036	5,72±0,03
P_7	50,50±0,09	23,54±0,24	15,00±0,00	9,89±0,07	10,40±0,11	0,4320±0,036	5,65±0,01
P_8	58,02±0,14	23,95±0,27	23,50±0,00	9,52±0,09	8,71±0,09	0,4320±0,036	5,57±0,02
P_9	61,03±0,27	28,74±0,22	25,50±0,50	8,62±0,12	9,47±0,06	0,5040±0,072	5,67±0,00
P_{10}	48,60±0,16	20,72±0,10	16,00±0,50	9,07±0,17	7,75±0,13	0,3240±0,000	5,73±0,01
Ortalama	53,55±5,60	23,95±2,95	18,80±5,30	9,67±1,00	9,31±1,10	0,4104±0,070	5,66±0,06
Malatya Peyniri							
P_{11}	50,36±0,06	19,48±0,16	23,50±0,50	5,71±0,02	6,17±0,07	0,3600±0,000	5,60±0,01
P_{12}	57,94±0,17	20,79±0,22	33,00±0,00	3,42±0,11	4,47±0,16	0,3240±0,072	5,68±0,03
P_{13}	55,54±0,38	19,46±0,19	24,00±0,00	8,90±0,16	9,94±0,14	0,2520±0,036	5,72±0,00
P_{14}	61,60±0,20	21,24±0,31	27,00±0,50	9,24±0,27	11,58±0,15	0,2880±0,036	5,74±0,03
P_{15}	57,55±0,05	21,04±0,19	30,00±0,00	4,10±0,07	5,12±0,09	0,3600±0,108	5,62±0,01
Ortalama	56,60±4,11	20,40±0,87	27,50±4,03	6,27±2,69	7,46±3,13	0,3168±0,046	5,67±0,06
Maraş Peyniri							
P_{16}	59,74±0,04	22,78±0,12	30,0±0,50	2,74±0,07	3,70±0,06	0,5400±0,000	5,67±0,02
P_{17}	52,66±0,36	25,85±0,31	21,0±0,00	2,60±0,03	3,14±0,09	0,2880±0,036	5,80±0,03
P_{18}	57,75±0,39	22,60±0,26	28,5±0,00	3,42±0,15	4,84±0,18	0,2160±0,036	5,83±0,01
P_{19}	46,87±0,27	22,16±0,13	15,0±0,50	2,14±0,08	2,96±0,04	0,2520±0,000	5,81±0,00
P_{20}	51,88±0,09	23,17±0,07	22,5±0,00	2,81±0,09	3,27±0,08	0,2880±0,072	5,77±0,02
Ortalama	53,75±5,09	23,31±1,46	23,40±6,06	2,74±0,46	3,58±0,75	0,3168±0,128	5,77±0,06

Çizelge 4.9: Peynir gruplarına ait bazı kimyasal özelliklerin Duncan testi ile karşılaştırılması.

Peynir çeşidi	Kurumadde (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	Kül (%)	Asitlik (%)	pH
Antep peyniri	57,82±4,34^{a}	26,38±1,93^{a}	24,00±2,74^{ab}	3,35±1,68^{a}	7,20±1,13^{a}	0,4679±0,0951^{a}	5,51±0,19^{a}
Urfa peyniri	53,55±5,60^{a}	23,95±2,95^{ab}	18,80±5,30^{a}	9,67±1,00^{c}	9,31±1,10^{a}	0,4104±0,0702^{ab}	5,66±0,06^{b}
Malatya peyniri	56,60±4,11^{a}	20,40±0,87^{c}	27,50±4,03^{b}	6,27±2,69^{b}	7,46±3,13^{a}	0,3168±0,0469^{b}	5,67±0,06^{b}
Maraş peyniri	53,75±5,09^{a}	23,31±1,46^{b}	23,40±6,06^{ab}	2,74±0,46^{a}	3,58±0,75^{b}	0,3168±0,1283^{b}	5,77±0,06^{b}

*: Aynı sütünda farklı harflerle gösterilmiş sonuçlar istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$).

İncelenen peynir örneklerinin tuz içerikleri karşılaştırıldığında birbirine en yakın iki grup Maraş ve Antep peynirleri olurken istatistiki açıdan en büyük fark bu iki peynir ve Urfa peyniri grupları arasında gözlenmiştir ($p<0,05$). Tuz içeriğinin farklı olmasının sebeplerinin ise üretimde kullanılan tuz miktarı ve olgunlaşma şartlarına göre değiştiği düşünülmektedir.

Kül değerleri incelendiğinde ise Maraş peynirinin Antep, Urfa ve Malatya peynirlerinden farklılık gösterdiği görülmektedir ($p<0,05$). Birçok araştırmacı da peynirde tuz oranının artmasıyla kül miktarının da artış gösterdiğini bildirmektedir (Ardıç, 2003; Tekinşen 2001). Dolayısıyla kül miktarındaki değişikliğin sebebinin tuz miktarlarının farklı olmasından ve/veya peynire işlenilen sütün çeşidinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Peynir grupları titrasyon asitliği değerlerine göre kıyaslandığında Antep ve Urfa peynirleri arasında önemli bir fark görülmezken Antep peyniri ve Malatya ve Maraş peynirleri arasında istatistiki açıdan fark olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Gruplar arasındaki farklılığın haşlama sonrasında bünyede kalan laktik asit bakterilerinin faaliyetleri ve olgunlaşma koşulları olduğu düşünülmektedir.

Son olarak, peynir grupları pH değerleri bakımından incelendiğinde Antep peynirinin diğer 3 peynir grubundan istatistiki açıdan farklı olduğu görülürken ($p<0,05$) diğer 3 peynir grubu arasında bir fark görülmemiştir. Gruplar arasındaki farklılığın titrasyon asitliğinde olduğu gibi, laktik asit bakterilerinin faaliyetleri ve olgunlaşma koşulları olduğu düşünülmektedir.

4.4.1 Antep peynirlerinin kimyasal özellikleri

Antep peynirlerinin bazı kimyasal özelliklerine ilişkin minimum, maksimum ve ortalama değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10: Antep peynirinin bazı kimyasal özellikleri.

Özellik	Minimum	Maksimum	Ortalama
Kurumadde (%)	51,31 ± 0,11	63,45 ± 0,05	57,82 ± 4,34
Protein (%)	23,66 ± 0,12	28,75 ± 0,05	26,38 ± 1,93
Yağ (%)	20,00 ± 0,50	27,00 ± 1,00	24,00 ± 2,74
Tuz (%)	2,05 ± 0,22	6,29 ± 0,15	3,34 ± 1,68
Kül (%)	5,72 ±0,07	8,12 ± 0,02	7,20 ± 1,13
Asitlik (%)	0,3600 ± 0,036	0,6116 ±0,00	0,4679 ± 0,095
pH	5,24 ± 0,02	5,74 ± 0,00	5,51 ± 0,19

İncelenen Antep peyniri örneklerinde kurumadde miktarı ortalama olarak 57,82 ± 4,34 olarak tespit edilmiştir. Bu değer Kaya (2002), Çağlar (1998) ve Çelikbilek (2010) tarafından bildirilen değerlerden daha yüksektir. Sonuçlar arasındaki farklılığın öncelikle salamura tuz oranı ve olgunlaşma koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim % tuz içerikleri incelendiğinde çalışma sonuçları Kaya (2002) tarafından elde edilen sonuçlardan daha düşük bulunurken Çağlar (1998) ve

Çelikbilek (2010) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Tuz içerikleri benzerlik gösteren çalışma sonuçları arasında ise farklılığın kullanılan sütün çeşidinden, sütün işleme metodundan ve olgunlaşma koşullarından olduğu düşünülmektedir.

İncelenen peynir örneklerinin ortalama protein oranları ortalama %26,38 ± 1,93 olarak belirlendi. Bu sonuçlar Çağlar (1998) tarafından bulunan sonuçlardan yüksek, Kaya (2002) ve Çelikbilek (2010) tarafından tespit edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Aradaki farkın, tez çalışma sonuçlarında elde edilen kuru madde değerinin daha yüksek olması, peynire işlenen sütün çeşidinin değişik olma durumu ve olgunlaşma koşulları olduğu düşünülmektedir.

Antep peyniri örnekleri yağ içerikleri bakımından kıyaslandığında ise yağ içeriği ortalama olarak %24,00 ± 2,74 tespit edilmiştir. Bu değerler Kaya (2002) ve Çelikbilek (2010) tarafından bulunan değerlerle benzerlik gösterirken, Çağlar (1998) tarafından bulunan ortalama değerlerden daha yüksektir. Bu durum; peynir yapımında kullanılan sütün çeşidi ve bileşiminden kaynaklanabileceği gibi tez çalışmasında tespit edilen kurumadde miktarının daha yüksek olmasından dolayı da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Literatürde kül içeriklerini kıyaslayacak Antep peyniri çalışmasına rastlanmamıştır. Dolayısıyla kıyaslama üretim yönünden benzerlik gösteren ve tuz içeriği istatistiki açıdan farklı bulunmayan Maraş peyniri temel alınarak yapılmıştır. Tekinşen ve Nizamlıoğlı (2003) kurumadde ve tuz oranını sırasıyla ortalama olarak %56,49 ve %8,20 bulduğu Maraş peyniri grubunda kül içeriğini %7,48 olarak bulurken bu değer tez çalışma sonuçlarından yüksek bulunmuştur. Kül içeriğinin yüksek çıkmasının en büyük sebebinin ise peynir grupları arasındaki tuz içeriklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Antep peyniri örnekleri pH değerleri bakımından kıyaslanacak bir çalışma bulunmazken titrasyon asitliği bakımından kıyaslandığında, % laktik asit cinsinden ortalama % 0,4679 ± 0,0951 olarak bulunan asidite değeri Çağlar (1998) tarafından bulunan değerlerden daha düşük bulunmuştur. Bunun en büyük sebebinin telemenin haşlanması sonucu bünyede kalan laktik asit bakterilerinin olgunlaşma esnasında laktozu kullanarak laktik asit üretmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir diğer sebep olarak ise olgunlaşma koşullarının ve % tuz miktarının da bu duruma etki ettiği düşünülmektedir.

4.4.2 Urfa peynirlerinin kimyasal özellikleri

Urfa peynirlerinin bazı kimyasal özelliklerine ilişkin minimum, maksimum ve ortalama değerleri Çizelge 4.11'de verilmiştir

Çizelge 4.11: Urfa peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri.

Özellik	Minimum	Maksimum	Ortalama
Kurumadde (%)	48,60 ± 0,16	61,03 ± 0,27	53,55 ± 5,60
Protein (%)	20,72 ± 0,10	28,74 ± 0,22	23,95 ± 2,95
Yağ (%)	14,00 ± 0,50	25,50 ± 0,50	18,80 ± 5,30
Tuz (%)	8,62 ± 0,12	11,24 ± 0,21	9,67 ± 1,00
Kül (%)	7,75 ± 0,13	10,40 ± 0,11	9,31 ± 1,10
Asitlik (%)	0,3240 ± 0,000	0,5040 ± 0,072	0,4104 ± 0,07
pH	5,57 ± 0,02	5,73 ± 0,01	5,66 ± 0,06

İncelenen Urfa peyniri örneklerinde kurumadde değerleri ortalama olarak %53,55 ± 5,60 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerler Çağlar vd. (1996), Atasoy (1999) ve Yetişemeyen ve Yıldız (2003) tarafından bulunan değerlerden daha yüksektir. Çizelge 4.11 incelendiğinde Urfa peynirinin kurumadde değerleri oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin temel nedenlerinin peynire işlenen sütün çeşidi, kurumadde içeriği, olgunlaşma koşulları ve üretim teknikleri olduğu düşünülmektedir.

İncelenen Urfa peynirlerinde ortalama %23,95 ± 2,95 olarak belirlenen protein içeriği, Çağlar vd. (1996) ile Yetişemeyen ve Yıldız (2003) tarafından bulunan değerlerden daha yüksek, Ardıç (2003) tarafından elde edilen değerlerle ise benzerlik göstermektedir. Bu durumun, elde edilen kurumadde değerlerinin diğer çalışmacılar tarafından elde edilen değerlerden daha yüksek olması ve peynire işlenen sütün kuru madde içeriğinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir

İncelenen Urfa peynirlerinin grubunun ortalama %18,80 ± 5,30 olarak bulunan yağ değerleri, Çağlar vd. (1996), Yetişemeyen ve Yıldız (2003) ile Atasoy (1999) tarafından bildirilen değerlerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, inek, koyun ve keçi sütü gibi farklı yağ oranlarına sahip sütlerin kullanılmasıyla veya Ardıç (2003) tarafından belirtildiği gibi telemeye uygulanan farklı haşlama sıcaklıklarının kısmi yağ kaybına sebep olmasıyla açıklanabilir.

Urfa peyniri örneklerinin kül değerleri ortalama % 9,31 ± 1,10 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, Çağlar vd. (1996) ile Yetişemeyen ve Yıldız (2003) tarafından bulunan değerlerden daha yüksek olduğu, Ardıç (2003) tarafından elde

edilen değerlerle ise benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun temel nedeninin peynirin grubunun tuz oranlarının araştırmacıların bildirdiği değerlerden farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Urfa peynirinde bulunan ortalama tuz oranları Çağlar vd. (1996) ve Yetişemeyen ve Yıldız (2003) tarafından bulunan değerlerden daha yüksektir

İncelenen Urfa peynirlerinin laktik asit cinsinden toplam asitliği ortalama olarak %0,4104 ± 0,0702 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların Ardıç (2003) tarafından elde edilen sonuçlardan yüksek, Çağlar vd. (1996), Yetişemeyen ve Yıldız (2003) ile Atasoy (1999) tarafından elde edilen değerlerden düşük olduğu tespit edilmiştir. Farklılıkların en büyük sebebinin telemenin haşlama sıcaklık ve süre normu olduğu düşünülmektedir. Nitekim yüksek sıcaklıklarda haşlanan telemelerde, telemede kalan laktik asit bakterileri sayıca azalacağından dolayı olgunlaşma periyodunda laktoz daha az miktarlarda kullanılacak ve bunun sonucunda laktik asit miktarı daha az olacaktır. Benzer şekilde, salamuradaki tuz oranının da toplam asitlik değerini etkileyeceği düşünülmektedir.

İncelenen Urfa peynirlerinin ortalama olarak 5,66 ± 0,06 belirlenen pH değerleri yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında Ardıç (2003) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterirken, Atasoy (1999) ile Yetişemeyen ve Yıldız (2003) tarafından elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin kullanılan çiğ sütün mikroorganizma yüküyle ve olgunlaşma periyodu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim pH değeri daha düşük olan peynirlerin başlangıç laktik mikroflorasının, pH değeri yüksek çıkanlara kıyasla daha yoğun olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca, telemenin haşlama sıcaklık ve süresinin de bu durumda etkili olduğu düşünülmektedir.

4.4.3 Malatya peynirlerinin kimyasal özellikleri

Malatya peynirlerinin bazı kimyasal özelliklerine ait minimum, maksimum ve ortalama değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

İncelenen Malatya peyniri örneklerinin kurumadde değerleri ortalama olarak %56,60 ± 4,11 olarak belirlenmiştir. Bu değer, Karatekin (2014) tarafından yapılan çalışma bulgularından yüksek olarak gözlemlenirken Gölge ve Şahan (2008) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Gölge ve Şahan (2008), yaptıkları çalışmada inek ve koyun sütünden elde edilen peynirleri ayrı ayrı değerlendirmişler ve koyun sütünden elde edilen peynirlerin kurumadde

miktarlarının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada tespit edilen değerler ile araştırmacıların bildirdiği değerler arasındaki farklılığın kullanılan sütün çeşidinden olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.12: Malatya peynirinin bazı kimyasal özellikleri.

Özellik	Minimum	Maksimum	Ortalama
Kurumadde (%)	50,36 ± 0,06	61,60 ± 0,20	56,60 ± 4,11
Protein (%)	19,46 ± 0,19	21,24 ± 0,34	20,40 ± 0,87
Yağ (%)	23,50 ± 0,50	33,0 ± 0,00	27,50 ± 4,03
Tuz (%)	3,42 ± 0,11	9,24 ± 0,27	6,27 ± 2,69
Kül (%)	4,47 ± 0,16	11,58 ± 0,15	7,46 ± 3,13
Asitlik (%)	0,2520 ± 0,036	0,3600 ± 0,108	0,3168 ± 0,046
pH	5,60 ± 0,01	5,74 ± 0,03	5,67 ± 0,06

İncelenen Malatya peyniri örneklerinin ortalama olarak %20,40 ± 0,87 olarak belirlenen protein içeriği, Karatekin (2014) ile Gölge ve Şahan (2008) tarafından elde edilen araştırma bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

İncelenen Malatya peyniri örneklerinin ortalama yağ içeriği ortalama %27,50 ± 4,03 olarak bulunurken bu değer Gölge ve Şahan (2008) tarafından koyun sütü kullanılarak üretilmiş Malatya peynirlerinden elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterirken, Karatekin (2014) tarafından yapılan çalışma sonuçlarından daha yüksektir. Bunun sebebinin kullanılan sütün yağ içeriği ve sütün çeşidi olduğu düşünülmektedir. Nitekim Gölge ve Şahan (2008), inek peynirinden yapılan Malatya peynirlerinin yağ içeriğini koyun sütünden yapılan peynirlere kıyasla yaklaşık %38 oranında daha az olduğu belirlemişlerdir.

Öte yandan, ortalama 6,27 ± 2,69 olarak bulunan % tuz miktarı Karatekin (2014) tarafından yapılan çalışma bulgusuyla benzerlik gösterirken Gölge ve Şahan (2008) tarafından elde edilen bulgulardan düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin olgunlaşma süresi ve üretim tekniklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir

Literatürde Malatya peynirinin kül içeriğini belirten bir çalışmaya rastlanmadığından dolayı kıyaslama Duncan testi sonucunda Malatya ve Maraş peynirlerinin tuz içerikleri yönünden benzerlik gösterdiğinden Maraş peyniri baz alınarak yapılmıştır. Tekinşen ve Nizamlıoğlı (2003) tarafından bulunan kül içeriği ile tez çalışmasında elde edilen Malatya peynirinin kül içeriği birbirlerine benzerlik göstermektedir.

İncelenen Malatya peyniri örneklerinin toplam asitlik değeri ortalama %0,3168 ± 0,0469 olarak saptandı. Elde edilen ortalama asitlik değeri, Gölge ve Şahan (2008)

tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterirken, Karatekin (2014) tarafından elde edilen sonuçlardan daha düşük bulunmuştur. Farklılığın sebebinin haşlama sıcaklığı ve olgunlaşma süresi olduğu düşünülmektedir. Karatekin (2014), olgunlaşmanın 30. gününde toplam asitlik değerini % 0,5000 olarak tespit ederken bu değer olgunlaşma safhasında artış göstermiştir. Öte yandan, sütün çeşidinin, içerdiği laktik mikrofloradan dolayı toplam asitlikte etkili olduğu düşünülmektedir. Gölge ve Şahan (2008), inek sütünden yapılmış peynir örneklerindeki toplam asitlik değerini koyun sütünden yapılmış peynirlere oranla yaklaşık 2 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

İncelenen Malatya peyniri örneklerinde tespit edilen ortalama pH değeri 5,67 ± 0,06 olarak tespit edilirken bu sonuç Karaktekin (2014) ile Gölge ve Şahan (2008) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.4.4 Maraş peynirlerinin kimyasal özellikleri

Maraş peynirlerinin bazı kimyasal özelliklerine ait minimum, maksimum ve ortalama değerleri Çizelge 4.13'de verilmiştir

Çizelge 4.13: Maraş peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri.

Özellik	Minimum	Maksimum	Ortalama
Kurumadde (%)	46,87 ± 0,27	59,74 ± 0,04	53,75 ± 5,09
Protein (%)	22,16 ± 0,13	25,85 ± 0,31	23,31 ± 1,46
Yağ (%)	15,00 ± 0,50	30,00 ± 0,50	23,40 ± 6,06
Tuz (%)	2,14 ± 0,08	3,42 ± 0,15	2,74 ± 0,46
Kül (%)	2,96 ± 0,04	4,84 ± 0,18	3,58 ± 0,75
Asitlik (%)	0,2160 ± 0,036	0,5400 ± 0,00	0,3168 ± 0,128
pH	5,67 ± 0,02	5,83 ± 0,01	5,77 ± 0,06

İncelenen Maraş peynirlerinin kurumadde içerikleri ortalama olarak %53,75 ± 5,09 belirlenmiş olup Tekinşen (2005), Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003) ile Çağlar vd. (1998) tarafından bulunan çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Peynirin besleyici değeri hakkında kabaca bilgi veren kuru madde miktarı Maraş peynirinde geniş sınırlar göstermektedir. Bu durum diğer yöresel peynirlerde olduğu gibi standart bir üretim tekniğinin olmadığından kaynaklanmaktadır.

İncelenen Maraş peyniri örneklerinin protein içeriği ortalama %23,31 ± 1,46 olarak belirlenen değerler Çağlar vd. (1998) tarafından elde edilen sonuçlardan daha yüksektir. Bunun sebebinin peynire işlenen sütün çeşidinden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Nitekim koyun ve keçi sütlerinin kuru maddedeki protein oranı inek sütüne oranla daha fazladır.

İncelenen Maraş peyniri örneklerinin yağ içeriği ortalama %23,40 ± 6,06 olarak saptanmıştır. Elde edilen değerler Çağlar vd. (1998), Tekinşen (2005) ile Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003) tarafından bildirilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Fakat Maraş peynir grubu Çizelge 4.8'de belirtildiği gibi yağ içeriği bakımından oldukça değişkenlik göstermektedir. Bunun sebebinin peynire işlenen sütün çeşidi ve haşlama sıcaklığının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Olgunlaşma sürecinde peynirin kendine has tat ve aromasının oluşumunda, yapısal özelliklerinin iyileştirilmesinde ve muhafazasında rol oynayan tuz oranı ortalama olarak %2,74 ± 0,46 tespit edilmiş olup, Çağlar vd. (1998) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterirken, Tekinşen (2005) ile Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003) tarafından elde edilen sonuçlardan düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin salamuradaki tuz miktarı olduğu düşünülmektedir.

Ek olarak, tuz miktarının tez çalışma sonuçlarında az bulunmasının % kül oranlarına da etki ettiği düşünülmektedir. Nitekim tez çalışmasında ortalama %3,58 ± 0,75 olarak bulunan kül ortalaması, tuz oranının ortalama %8,20 bulunduğu Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003) tarafından elde edilen sonuçlarla farklılık göstermektedir

İncelenen Maraş peyniri örneklerinin toplam asitlik değeri ortalama %0,3168 ± 0,128 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değer Tekinşen (2005) ile Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003) tarafından elde edilen değerlere benzerlik gösterirken, Çağlar vd. (1998) tarafından elde edilen değerlerden düşük olduğu görülmektedir. Bunun en büyük sebebinin telemeye uygulanan haşlama sıcaklık ve sürelerinin farklı olması ile olgunlaşma koşullarındaki farklılıklar olduğu düşünülmektedir.

Maraş peynirlerinin pH değeri ortalama 5,78 ± 0,06 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değer Tekinşen ve Nizamlıoğlu (2003) tarafından bildirilen değerlerden daha yüksektir. Diğer taraftan, araştırmada tespit ettiğimiz ortalama pH değeri Gölge ve Şahan (2008)'in Elbistan yöresinde üretilen benzer tipteki Kelle peynirinde tespit ettikleri pH değeri (5,63 ± 0,22) ile benzerlik göstermektedir. Aradaki farklılıkların sebebinin peynire işlenen sütün çeşidi, başlangıç laktik mikroflora yükü, haşlama sıcaklık ve süresi ve olgunlaşma koşulları olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında yöresel olarak üretilen ve üretim teknikleri bakımından benzerlik gösteren yöresel peynirlerde *Enterococcus* cinsi bakteriler izole edilerek tanımlanmış ve tanımlamada MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper yönteminin kullanılabilme durumu incelenmiştir. Ayrıca, literatürde telemesi haşlanarak üretilen yöresel peynirlerin birbirleri arasında istatistiki bir değerlendirmenin bulunmamasından dolayı peynirlerin kimyasal özellikleri de incelenerek birbirleriyle benzerlik ve farklılıkları belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler aşağıda belirtildiği şekilde sıralanabilir:

Peynir grupları arasında enterokok sayısı bakımından Antep ve Urfa peynirleri arasında istatistiki açıdan önemli fark tespit edilirken ($p<0,05$), Malatya ve Maraş peynirleri arasında farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, Antep peynir örneklerinin enterokok sayıları, Malatya ve Maraş peynir örneklerinin enterokok sayıları ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Enterokokların peynirdeki varlığı fekal bulaşıyı göstermektedir. Peynirde olgunlaşma aşamasında her ne kadar tat ve aroma verse de geleneksel yollarla üretilen peynirlerin pastörize sütten, daha hijyenik şartlarda üretilmesi gerekmektedir.

Antep peynirinden 23, Urfa peynirinden 22, Malatya peynirinden 21 ve Maraş peynirinden 18 adet olmak üzere toplam 84 adet izolat elde edilmiştir. İzolasyon sonrası tür düzeyinde identifikasyon MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper yöntemi ile yapılmıştır. Tanımlama sonucunda izolatların cins düzeyinde tamamı *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. İzolatların 66 tanesi $3,000 \geq GA \geq 2,300$ aralığında belirlenirken tür düzeyinde %78,57'lik bir tanımlama başarısı elde edilmiştir

Enterokoklar gibi patojen suşları bulunan bakterilerde doğru tanının yapılması elzemdir. Bu amaç doğrultusunda, izolatların kesin tanısının yapılabilmesi için 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılarak sekanslama işleminin yapılması gerekmektedir. Fakat, biyokimyasal yöntemlerden çok daha doğru ve hızlı sonuç veren bu yöntemin literatür ile kıyaslandığında, enterokokların hızlı tanısında kullanılabileceği görülmüştür.

Ek olarak, MALDI-TOF-TOF-MS Biotyper yönteminin bakterileri özellikle cins düzeyinde birbirinden ayırmak için oldukça elverişli bir yöntem olduğu ve biyokimyasal testlere göre daha doğru ve hızlı sonuçlar verdiği ve cinsleri birbirinden ayırmada RAPD-PZR yöntemine alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın ikinci aşaması olarak peynir gruplarının birbirleri arasında bazı kimyasal özellikleri istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Buna göre:

Peynir grupları birbirleri arasında kıyaslandığında kurumadde içerikleri bakımından istatistiki açıdan önemli bir farka rastlanmamıştır.

Numuneler tespit edilen protein değerlerine göre karşılaştırıldığında ise en büyük farkın Antep ve Malatya peynirlerinde olduğu ($p<0,05$), Maraş ve Urfa peynirlerinin ise benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Peynir grupları yağ içerikleri bakımından kıyaslandığında en büyük farklılığın Urfa ve Malatya peynirlerinde olduğu görülürken ($p<0,05$) Antep ve Maraş peynirleri istatistiki açıdan birbirlerine benzerlik göstermektedir.

İncelenen peynir örneklerinin tuz içerikleri kıyaslandığında birbirine en yakın iki grubun M araş ve Antep peynirleri olduğu görülürken istatistiki açıdan en büyük farkın Maraş ve Antep peynirleriyle Urfa peyniri grubu arasında görülmüştür ($p<0,05$).

Kül değerleri bakımından kıyaslandıklarında ise Maraş peynirinin Antep, Urfa ve Malatya peynirlerinden farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Peynir grupları titrasyon asitliği değerlerine göre kıyaslandığında Antep ve Urfa peynirleri arasında önemli bir fark tespit edilmezken, Antep peyniri ile Malatya ve Maraş peynirleri arasında istatistiki açıdan fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Son olarak, peynir grupları pH değerleri bakımından incelendiğinde Antep peynirinin diğer 3 peynir grubundan istatistiki açıdan farklı olduğu görülürken ($p<0,05$) diğer 3 peynir grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Bu çalışmada yalnızca identifikasyonu yapılan enterokokların peynir endüstrisinde starter veya destek kültür olarak kullanılabilmesi için teknolojik özelliklerinin ve bunların yanı sıra antimikrobiyal madde dirençlikleri ile virülens faktörlerinin belirlenmesi de gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abriouel, H., Grande, M. J., Pulido, R. P. ve Galvez, A., 2012. Bacteriocins and their application as food biopreservatives, Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M. T. ve Tenreiro, R (Editörler), Enterococcus and Safety, Nova Science Publishers, New York, US.

Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M. ve Valdivia, E., 2010. Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying, Food Microbiology, 27, 1, 58-63.

Angelakis, E., Million, M., Henry, M. ve Raoult, D., 2011. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry, Journal of Food Science, 76, 8, 568-572.

Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, E., Osimani, A., Santarelli, S. ve Clementi, F., 2007. Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy, Journal of Applied Microbiology, 103, 4, 948-960.

Araújo, T. F. ve Ferreira, C. L. D. L. F., 2013. The genus Enterococcus as probiotic: safety concerns, Brazilian Archives of Biology and Technology, 56, 3, 457-466.

Ardıç, M., 2003. Pastörizasyon ve farklı haşlama sıcaklıklarının Urfa peynirinin kalitesine etkisi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Ardıç, M. ve Nizamiloğlu, M., 2004. Pastörizasyon ve farklı haşlama sıcaklıklarının urfa peynirinin kalitesine etkisi, Veteriner Bilimleri Dergisi, 20, 1, 61-69.

Armin, S., Fallah, F., Karimi, A., Rashidan, M., Shirdust, M. ve Azimi, L., 2017. Genotyping, antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of vancomycin resistance Enterococcus faecalis isolated from blood culture, Microbial Pathogenesis, 109, 1, 300-304.

Atasoy, A. F., 1999. Şanlıurfa ilinde satışa sunulan Urfa peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri ve proteoliz düzeylerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

Aydin, A. ve Sudağıdan, M., 2016. Gıda mikrobiyolojisinde moleküler biyolojik tekniklerin kullanımı ve tiplendirme yöntemleri, Türkiye Klinikleri J Food HygTechnol-SpecialTopics, 2, 1, 1-9.

Barbosa, J., Borges, S. ve Teixeira, P., 2014. Selection of potential probiotic Enterococcus faecium isolated from Portuguese fermented food, International Journal of Food Microbiology, 191, 144-148.

Bareika, H. A., Sidarenka, A. V. ve Novik, G. I., 2017. Starter cultures of lactic acid bacteria for special diet products, Food and Feed Biotechnology, 1, 1, 89-90.

Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L. ve Frigerio, G., 1980. A controlled double-blind-study of sf68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhea in pediatrics, Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental, 28, 6, 927-936.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. ve Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology , International Dairy Journal, 11, 259–274.

Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. ve Prod'hom, G. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory, Journal of Clinical Microbiology, 48, 5, 1549-1554.

Bulut, Ç., Güneş, H., Okuklu, B., Harsa, S., Kılıç, S., Çoban, H. S. ve Yenidunya, A. F., 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region, Journal of Dairy Research, 72, 19-24.

Bulut, T., 2011. Beyaz peynir üretiminde probiyotik Enterococcus faecıum'un ek kültür olarak kullanımı ve bunun oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve peynir kalitesi üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Callon, C., Millet, L. ve Montel, L. C., 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from salers cheese. Journal Dairy Research, 71, 2, 231–244.

Carbonnelle, E., Grohs, P., Jacquier, H., Day, N., Tenza, Sylvie, Dewailly, A., Vissouarn, O., Rottman, M., Herrmann, J-L., Podglajen, I. ve Raskine, L., 2012. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification, Journal of Microbiological Methods, 89, 2, 133-136.

Chean, R., Kotsanas, D., Francis, M. J., Palombo, E. A., Jadhav, S. R., Awad, M. M., Lyras, D., Korman, T. M. ve Jenkin, G. A., 2014. Comparing the identification of Clostridium spp. by two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: A detailed analysis of age of culture and sample preparation, Anaerobe, 30, 85-89.

Citti, J. E., Sandine, W.E. ve Elliker, P.R., 1963. Some observation on the hull method for measurement of proteolysis in milk, Journal of Dairy Science, 46, 4, 337-345.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. ve Vernoux, J. P., 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products, Le Lait, 83, 4, 269-306.

Colombo, E., Franzetti, L., Frusca, M. ve Scarpellini, M. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Italian goat cheese, Journal of Food Protection, 73, 4, 657-662.

Crespo, M. T. B. ve Alves, P. I. 2012. Enterococci in Food, Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M. T. ve Tenreiro, R. (Editörler), Enterococcus and Safety, Nova Science Publishers, New York, US.

Çağlar, A., Türkoğlu, H. ve Çakmakcı, S. 1996., Urfa peynirinin yapılışı ve bileşimi üzerine araştırmalar, Selçuk Üniversitesi Zıraat Fakültesi Dergisi, 10, 13, 115-124.

Çağlar, A., Türkoğlu, H. ve Ceylan, Z. G., 1998. Sıkma peynirinin yapılışı ve bileşimi. 5. Süt ve süt ürünleri Sempozyumu 'Geleneksel Süt Ürünleri!. Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları No 621, Sayfa, 274-281, Mert Matbaası, Ankara.

Çakır, İ. ve Çakmakçı, M. L., 2005. Gıdalarda patojen mikroorganizma aranmasında kullanılan moleküler genetik yöntemler, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 12, 3, 1-7.

Çelikbilek, İ., 2010. Sıkma peynirinin özellikleri üzerine pastörizasyon işlemi ve pıhtılaşma süresinin etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Çıtak, S., Yücel, N. ve Orhan, S., 2004. Antibiotic resistance and incidence of Enterococcus species in Turkish white cheese, International Journal of Dairy Technology, 57, 1, 27-31.

Dağdemir, E. ve Özdemir, S., 2008. Technological characterization of the natural lactic acid bacteria of artisanal turkish white pickled cheese. International Journal of Dairy Technology, 61, 2, 133-140.

Devriese, L. A., Laurier, L., Herdt, P. D. ve Haesebrouck, F., 1992. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows, Journal of Applied Microbiology, 72, 1, 29-31.

Doğan, M. ve Özpınar, H., 2017. Investigation of Probiotic Features of Bacteria Isolated from Some Food Products. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 23, 4, 555-562.

Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E. ve Silva, C. C.G., 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese, Food Microbiology, 63, 178-190.

Duncan, D. B., 1955, Multiple F. test, Biometrics. 11, 1-42.

Durlu-Özkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. ve Litopoulou-Tzanetaki, E., 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk, Journal of Applied Microbiology, 91, 5, 861-870.

Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z. ve Karpíšková, R., 2012. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. International Journal of Food Microbiology, 159, 2, 107-114.

Eigner, U., Holfelder, M., Oberdorfer, K., Betz-Wild, U., Bertsch, D. ve Fahr, A. M., 2009. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory, Clinical Laboratory Journal for Clinical Laboratories and Laboratories Related, 55, 7, 289.

El Soda, M., Law, J., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G., 1995. Lipolitic activity of cheese related microorganisms and its impact on cheese flavour. In: Charalambous, G. (Editör), Food Flavour: Generation, Analysis and Process Influence. Elseiver Science, London. UK.

El-Salam, M. H. A. ve Allchanldls. 2004. Cheese Varieties Riped in Brine, Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. ve Guinee, T. P (Editörler), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Elseiver Applied Science, London, UK.

Ertürkmen, P. ve Öner, Z., 2015. Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı(starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19, 3, 9-16.

Fenelon, M.A., Ryan, M.P., Rea, M.C., Guinee, T.P., Ross, R P. ve Hill, C., 1999. Elevated temperature ripening of reduced fat cheddar made with or without lacticin 3147-producing starter culture. Journal of Dairy Science, 82, 1, 10-22.

Fox, P. F. ve McSweeney, P. L. H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening, Food Reviews International Journal, 12, 4, 457-509.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H., ve Stiles, M.E., 1999. *Enterococci* at the crossroads of food safety?. International Journal of Food Microbiology, 47, 1, 1-24.

Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J. ve Holzapfel, W. H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food, Applied and Environmental Microbiology, 67, 9, 4385-4389.

Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. ve Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. International Journal of Food microbiology, 88, 2, 105-122.

Franz, C.M., Van Belkum, M.J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H. ve Gálvez, A., 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiology Reviews, 31, 3, 293-310.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S. ve Swings, J., 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese, Applied and Environmental Microbiology, 68, 7, 3560-3565.

Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products, International Journal of Food Microbiology, 88, 2-3, 215-222.

Gölge, Ö. ve Şahan, N., 2008. Geleneksel Yöntemle Üretilen Kelle Peynirlerinin Bazı Kalite Özellikleri, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, Kongre Kitapçığı, 677-680.

Gupta, V. ve Garg, R. 2012. Probiotics and Their Applications to Improve Human and Animal Health, Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M.T. ve Tenreiro, R (Editörler), Enterococcus and Safety, Nova Science Publishers, New York, US.

Gürsoy, O. ve Kınık, Ö. 2005. Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 11, 361-371.

Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2006. Peynir Üretiminde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı: Probiyotik Peynir. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 12, 1, 105-116.

Han, S-K., Hong, Y., Kwak, H-L., Kim, E-S., Kim, M-J., Shrivastav, A., Oh, M-H. ve Kim, H-Y., 2014. İdentification of lactic acid bacteria in pork meat and pork meat products using SDS-PAGE, 16s rRNA gene sequencing and MALDI-TOF Mass Spectrometry, Journal of Food Safety, 34, 3, 224-232.

Hardie, J. M. ve Whiley, R. A., 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 83, 1-11.

Harrigan, W.F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology, 3. Baskı, Academic Press, San Diego, USA.

Hassan, F. A.M., Mona, A.M., El-Gawad, A. ve Enab, A.K., 2013. Flavour compounds in cheese, Research on Precision Instrument and Machinery, 2, 2, 15-29.

Hayaloğlu, A.A., Özer, B. H., Fox, P. F., 2008. Cheeses of Turkey: 2. Varieties ripened under brine, Dairy Science and Technology, 88, 225-244.

Hayaloğlu, A.A., Deegan, K.C., ve McSweeney, P.L., 2010. Effect of milk pasteurization and curd scalding temperature on proteolysis in Malatya, a Halloumi-type cheese. Dairy Science and Technology, 90, 1, 99-109.

Helander, I.M., Wright, A.V. ve Sandholm-Matilla. T-M., 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria, Trends in Food Science ve Technology, 8, 5, 146-150.

Holt, J.G., Krieg, N. R., Seath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S. T., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9. Baskı, Williams & Wilkings, Philadelphia, USA.

Hosseini, S. ve Martinez-Chapa, S. O., 2017. Fundamentals of MALDI-TOF-MS Analysis Applications in Biodiagnosis, Tissue Engineering and Drug Delivery, First Edition, Springers, Singapur.

İspirli, H., 2016. Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması Ve Ekzopolisakkarit(Eps) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bayburt.

İspirli, H., Demirbaş, F., ve Dertli, E., 2017. Characterization of functional properties of Enterococcus spp. isolated from Turkish white cheese, LWT-Food Science and Technology, 75, 358-365.

Kahyaoğlu, T. ve Kaya, S., 2003. Effects of heat treatment and fat reduction on the rheological and functional properties of Gaziantep cheese. International Dairy Journal, 13, 11, 867-875.

Kaleli, D. ve Durlu-Özkaya, F., 2000. Enterokok Aranması, Halkman, A. K. (Editör), Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbaacılık, Ankara, Türkiye.

Kamber, U. ve Terzi, G., 2008. The traditional cheeses of Turkey: southeast anatolia region, Food Reviews International, 24, 62-73.

Kamber, U., 2005. Geleneksel Anadolu Peynirleri, Miki Matbaacılık, İvedik, Ankara.

Kamber, U., 2015. Traditional turkey cheeses and their classification, Van Veterinary Journal, 26, 3, 161-171.

Karakuş, M., 1994. Beyaz peynirden izole edilen laktik asit bakterilerinin asit oluşturma ve proteolitik aktiviteleri, Gıda Dergisi, 19, 4, 237-241.

Karatekin, B., 2014. Bazı üretim parametrelerinin malatya peynirinin fonksiyonel ve olgunlaşma özellikleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

Kaya, S., Kaya, A. ve Öner, M.D., 1999. The effect of salt concentration on rancidity in Gaziantep cheese, Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 2, 213-219.

Kaya, S., 2002. Effect of salt on hardness and whiteness of Gaziantep cheese during short-term brining, Journal of Food Engineering, 55, 155–159.

Kayaoğlu, G. ve Ørstavik, D., 2004. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease, Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 15, 5, 308-320.

Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö., 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27, 1, 62-74.

Kırmacı, H.A., 2010. Geleneksel urfa peynirinde yer alan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve starter kültür olarak kullanım olanakları, Doktora Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

Kırmacı, H.A., Özer, B.H., Akçelik, M., Akçelik. N., 2016. Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese, International Journal of Dairy Technology, 69, 2, 301-307.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. ve Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, International Journal of Food Microbiology, 41, 103-125.

Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract, International Journal of Food Microbiology, 88, 123-131.

Kohler, W., 2007. The present state of species with the genera Streptococcus and Enterococcus, International Journal of Medical Microbiology, 297, 133-150

Korucu, D., 2012. Tomas peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Kunduhoğlu, B., Elçioğlu, Ö., Gezginc, Y., Akyol, İ., Pilatin, S. ve Çetinkaya, A., 2012. Genotypic identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish kargi tulum cheese, African Journal of Biotechnology, 11, 28, 7218-7226.

Lancefield, R.C., 1933. A serologıcal differentiatıon of human and other groups of hemolytic Streptococci. The Journal of Experimental Medicine, 57, 571-595.

Lemsaddek, A. ve Tenreiro, R. 2012. Diversity and Ecological Niches, Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M. T. ve Tenreiro, R (Editörler), Enterococcus and Safety, Nova Science Publishers, New York, USA.

Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T. M. ve Drinan, F.D., 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora, Le Lait, 77, 4, 441-459.

Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J. E. ve Cáceres, P., 2002. Ibores goat's milk cheese: microbiological and physicochemical changes throughout ripening, Le Lait, 82, 5, 579-587.

Mazzeo, M.F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A. ve Siciliano, R. A., 2006. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms, Applied and Environmental Microbiology, 72, 2, 1180-1189.

Mcsweeney, P.L.H. ve Sousa, M. J., 2000. Biochemical pathways fort he production of flavour compounds in cheese during ripening: A review, Le Lait, 80, 3, 293-324.

Metin. M., 2003. Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, Türkiye.

Metin, M. 2008. Süt ve Mamülleri Analiz Yöntemleri, 3. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Türkiye.

Moreno, M.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., ve De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health, International Journal of Food Microbiology, 106, 1, 1-24.

Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D. ve Flahaut, C., 2017. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles, International Journal of Food Microbiology, 247, 2-8.

Nalvuran, Z. 2013. Peynirlerden İzole Edilen Farklı Enterococcus Türlerinin Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin Ve Bakteriyosinlerinin Karakteristiklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Narciso-Schiavon, J.L., Borgonovo, A., Marques, P.C., Tonon, D., Bansho, E.T., Maggi, D.C., Dantas-Corrêa, E.B. ve Lucca Schiavon, L., 2015. Enterococcus casseliflavus and Enterococcus gallinarum as causative agents of spontaneous bacterial peritonitis, Annals of Hepatology, 14, 2, 270-272.

Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N. A., O'Donnell, A.G., 1981. The genera Bacillus and Sporolactobacillus, Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. (Editörler), The Prokaryotes vol II, Springer Verlag, Berlin, Almanya.

Ocak, E., Javidipour, I., Tunçtürk, Y., 2015. Volatile compounds of Van Herby cheeses produced with raw and pasteurized milks from different species, Journal of Food Science and Technology, 52, 7, 4315-4323.

Özer, B., Atasoy, F., Akin, S., 2002. Some properties of Urfa cheese (a traditional White-brined Turkish cheese) produced from bovine and ovine milks, International Journal of Dairy Technology, 55, 2, 94-99.

Özer, B., 2014. Fermente Süt Ürünleri, Probiyotik Organizmalar ve Peynir, Aran. N. (Editor), Gıda Biyoteknolojisi, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, Türkiye.

Renye, J.A., Somkuti, G.A., Vallejo-Cordoba, B., Van Hekken, D.L. ve Gonzalez-Cordova, A.F., 2008. Characterization of the microflora isolated from queso fresco made from raw and pasteurized milk, Journal of Food Safety, 28, 1, 59-75.

Rossi, E.A., Vendramini, R.C., Carlos, I.Z., Pei, Y.C., ve de Valdez, G.F., 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties, European Food Research and Technology, 209, 305–307.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., ve Tsakalidou, E., 2001a. Citrate metabolism by Enterococcus faecalis FAIR-E 229, Applied and Environmental Microbiology, 67, 12, 5482-5487

Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. ve Tsakalidou, E., 2001b. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance, International Dairy Journal, 11, 8, 621-647.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., ve Tsakalidou, E., 2002. Effect of Enterococcus faecium on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese, International Journal of Food Microbiology, 76, 1, 93-105.

Schleifer, K.H., ve Kilpper-Balz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 34, 1, 31-34.

Semedo-Lamsaddek, T. ve Mato, R., 2012. Pathogenesis and Virulence, Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M. T. ve Tenreiro, R (Editörler), Enterococcus and Safety, Nova Science Publishers, New York, USA.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. ve Raoult, D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, Clinical Infectious Diseases, 49, 4, 543-551.

Sherman, J. M., 1937. The *Streptococci*, Bacteriological Reviews, 1, 1, 3.

Sherman, J. M., 1938. The *enterococci* and related *streptococci*. Journal of Bacteriology, 35, 2, 81.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. ve Virdi, J. S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology, 6, 1-16.

Soro-Yao, A. A., Schumann, P., Thonart, P., Dje, K. M. ve Pukall, R., 2014. The use of MALDI-TOF mass spectrometry, ribotyping and phenotypic tests to ıdentify lactic acid bacteria from fermented cereal foods in abidjan (Cote d'Ivoire), The Open Microbiology Journal, 8, 78-86.

Steensels, D., Verhaegen, J. ve Lagrou, K., 2011. matrıx-assisted laser desorptıon ıonızatıon-time of flıght mass spectrometry for the ıdentıfıcatıon of bacterıa and yeasts ın a clınıcal mıcrobıologıcal laboratory: a review, Acta Clinica Belgica, 66, 4, 267-273.

Sutherland, J.B. ve Rafii, F., 2006. Cultural, Serological and Genetic Methods For Identification of Bacteria, Wilkings, C. L. ve Lay, J, O (Editörler), Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry, Wiley-Interscience, New Jersey, USA.

Şanlıbaba, P. ve Güçer, Y., 2015. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria, Agriculture and Food, 3, 451-457.

Tanasupawat, S., Sukontasing, S. ve Lee, J.S., 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 7, 1630-1634.

Tekinşen, K.K. 2001. Maraş peyniri üretiminde baskılama ağırlığı ve haşlama suyu sıcaklığının standardizasyonu üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Tekinşen, K.K. ve Nizamlıoğlu, M., 2003. Maraş peyniri üretiminde baskılama ağırlığı ve haşlama suyu sıcaklığının bazı kalite nitelikleri üzerine etkisi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27, 153-160.

Tekinşen, K.K. 2005. Kahramanmaraş ve çevresinde üretilen maraş peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi, Veteriner Bilimleri Dergisi, 21, 3-4, 57-63.

Tekinşen, O.C., Atasever, M., Keleş, A. ve Tekinşen K.K., 2002. Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim ve Kontrol (1. Basım). Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.

Terzić-Vidojević, A., Lozo, J. ve Topisirović, L., 2009. Dominant lactic acid bacteria in artisanal Pirot cheeses of different ripening period, Genetika, 41, 3, 339-352.

TSE 13129, 2005. Urfa Peynirinin Standartları, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Tunail, N., Özkaya, F. D., Gürsel, A. ve Tamuçay, B. 2001. Starter Bakterilerin Oluşturdukları Biyojen Aminlerin Saptanması ve Salamura Beyaz Peynirdeki Biyojen Amine Bağlı Risk Faktörünün Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 96-11-12-04, Ankara.

Tuncer, Ö.B., Ay, Z. ve Tuncer, Y., 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer Enterococcus faecium strains isolated from Turkish tulum cheese, Turkish Journal of Biology, 37, 443-449.

Turgayi Ö., Aksakal, D. H., Sünnetçi S. ve Çelik, A. B., 2011. A survey of afatoxin M1 levels in Kahramanmaraş cheese. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 34, 6, 497-500.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (14.09.2017). Süt ve Süt Ürünleri Üretimi Güncel Durumu 2017 verileri, 24689, Ankara.

Uraz, G., Coşkun, S., ve Özer, B., 2008. Microflora and pathogen bacteria (Salmonella, Klebsiella, Yersinia, Pseudomonas, Aeromonas, Escherichia coli, Staphylococcus aureus) in Urfa cheese (A traditional white-brined turkish cheese). Pakistan Journal of Nutrition, 7, 5, 630-635.

Urbach, G., 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. International Dairy Journal, 3, 887-903.

Üçüncü, M., 2013. Süt ve mamülleri teknolojisi, Meta Basım, İzmir, Türkiye.

Van Veen, S. Q., Claas, E. C. J. ve Kuijper, E. J., 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories, Journal of Clinical Microbiology, 48, 3, 900-907.

Whitenburry, R., 1964. Hydrojen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. Journal of General Microbiology, 35, 1, 13-26.

Yetişmeyen, A., ve Yıldız, F., 2003. Urfa peynirlerinin mikrobiyolojik, kimyasal ve duyusal niteliklerinin saptanması. Gıda/The Journal of Food, 28, 3, 287-294.

URL-1 <http://www.destekpatent.com.tr/haber-detay/yoresel-peynirler-koruma-altinda> alındığı tarih: 12.12.2017.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı **:** Furkan AYDIN

Doğum Tarihi ve Yeri: 07/10/1992 - İstanbul

E-posta adresi **:** furkanaydin@aksaray.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans **:** Gaziantep Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2015

Yüksek Lisans **:** Aksaray Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 2017

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Aksaray Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Araştırma Görevlisi 2016 – halen.