

Lactobacillus plantarum'UN BEYAZ PEYNİRLERDE
Staphylococcus aureus GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

**THE EFFECT OF *Lactobacillus plantarum* ON GROWTH OF
Staphylococcus aureus IN WHITE-BRINED CHEESES**

MELTEM ÇOLAKLAR

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....

Prof. Dr. Barbaros ÖZER

Üye (Danışman) :.....

Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ

Üye (İkinci Danışman) :.....

Yrd. Doç. Dr. Birce TABAN

Üye :.....

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Üye :.....

Doç. Dr. Ayşe GÜR SOY

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Lactobacillus plantarum'UN BEYAZ PEYNİRLERDE *Staphylococcus aureus* GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Meltem Çolaklar

ÖZ

Doğada yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileri, süt ve süt ürünlerinin mikroflorasında baskın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Tat-koku, tekstür ve besinsel özelliklere katkıda bulunmalarından dolayı süt ürünlerinin çeşitli üretim aşamalarında kullanım alanı bulunmaktadır. Beyaz peynir de, çeşitli laktik asit bakteri türleri kullanılarak üretilen ve yaygın olarak tüketilen süt ürünlerinden biridir. Laktik asit bakterilerinin süt ürünlerinde, istenilen teknolojik özellikleri sağlamanın yanı sıra, gıdalarda bozulmaya sebep olan ve patojenik özellik taşıyan bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada beyaz peynir üretim ve depolama süresince laktik asit bakterilerinden biri olan ülkemizden izole edilen *Lactobacillus plantarum* BG33 suşunun *Staphylococcus aureus* ATCC6538 gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma kapsamında, üretim süresi boyunca 2, 6, 22 ve 24. saatlerde örnek alınırken, depolama sürecinde ise 6,18, 23, 39, 59, 80 ve 90. günlerde örnek alınmış ve kültürel ekimleri gerçekleştirilmiştir. Kültürel ekimlerde *S. aureus* ve ülkemizden izole edilen *L. plantarum* BG33 sayılarındaki değişim incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde antibakteriyel etkinin 144. saatten sonra başladığı görülmüştür. Nitekim 432. saatte kontrol grubunda 3.54×10^6 EMS/mL saptanırken örnek grubunda 2.04×10^5 EMS/mL olarak saptanmış ve depolamanın 80. gününde bu değerler sırasıyla 2.78×10^6 EMS/mL ve 1.70×10^4 EMS/mL olarak belirlenmiştir. Ancak yapılan T testi ve Mann-Whitney testi ile istatistiksel analiz edildiğinde *L. plantarum* BG33'ün *S. aureus*'a olan etkisinin önemsiz olduğu sonucu çıkmıştır ($p>0.01$).

ANAHTAR KELİMELER: *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, Beyaz peynir, antimikrobiyel etki

Danışman: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Birce TABAN, Ankara Üniversitesi, Süt Teknolojisi Bölümü

THE EFFECT OF *Lactobacillus plantarum* ON GROWTH OF *Staphylococcus aureus* IN WHITE-BRINED CHEESES

Meltem Çolaklar

ABSTRACT

Lactic acid bacteria, which are commonly found in nature, are the dominant microorganisms of dairy and dairy products' microflora. Due to their contribution to the flavour, texture and nutritional characteristics of dairy products, lactic acid bacteria are used in various stages of their production. White-brined cheese is one of the widely consumed dairy products and is produced by using various species of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria ensure that dairy products acquire the desired technological characteristics, and are also known to have an antimicrobial effect on bacteria that causes spoilage and have pathogenic features. In this study, the effect of *Lactobacillus plantarum* BG33, which is the wild type, on the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC6538 during White-brined cheese production and storage was investigated. Within the context of the study, samples were obtained at hours 2, 6, 22 and 24 during the production period, and on days 6, 18, 23, 39, 59, 80 and 90 during the storage process. Culture inoculation was performed with the samples. The change in the number of *Staphylococcus aureus* and *L. plantarum* BG33 was investigated in the culture inoculations. According to the results obtained, it was clearly seen that antibacterial effect was observed after 144 hours. Even as 3.54×10^6 MPN/mL was determined in control group for 432 hours, 2.04×10^5 MPN/mL was determined in sample group. These values changed as 2.78×10^6 MPN/mL and 1.70×10^4 MPN/mL in 80th day of storage, respectively. Statistical analysis (T test and Mann-Whitney test) revealed that the effect of *L. plantarum* BG33 on *S. aureus* is statistically not significant ($p > 0.01$).

KEYWORDS: *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, White-brined cheese, antimicrobial effect

Advisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ, Hacettepe University, Department of Food Engineering

Co-advisor: Assist. Prof. Birce TABAN, Ankara University, Dairy Technology Department

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans dönemimde her zaman yanımda olduğunu hissettiren, her durumda anlayışlı olan, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, bilgi birikimine ve kişiliğine her zaman saygı duyduğum ve hayatım boyunca saygı duyacağım sevgili, değerli Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Prof. Dr. S. Aykut AYTAÇ**'a; çalışmalarım boyunca her zaman yardımına koşan, yardımcı olmak için minicik tatlı bebeğinden, eşinden ve değerli zamanından fedakarlık eden, her an yanımda olacağını hissettiren Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Yrd. Doç. Dr. Birce TABAN**'a; laboratuvar çalışmalarımda engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, danıştığımız her konuda tüm anlayışı ve sabrıyla bizimle beraber olan, yardımları için hayatım boyunca sevgi ve saygıyla anacağım Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Prof. Dr. Barbaros ÖZER**'e; deneysel çalışmalarımda en kritik noktalar olan laboratuvar uygulamalarında gece gündüz demeden yardımlarını esirgemeyen, güler yüzlü ev sahipliği ile yardımları için minnettar kalacağım Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Doç. Dr. Ayşe GÜRSOY**'a; bu çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılması aşamasında değerli görüş ve katkıları ile bizleri yönlendiren Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Eğitim Bilimleri Bölümü Eğitimde Ölçme ve Değerlendirme ABD Öğretim Üyesi Sayın Hocam **Doç. Dr. Nuri DOĞAN**'a; her zaman kendisiyle çalışmaktan zevk aldığım, tüm sıkıntılı dönemlerimde varlığını hissettiğim güleryüzuyle yardımına koşan, çok sevdiğim muhteşem çalışma arkadaşım **Münevver YÜCEBAY**'a; sonsuz sabır ve destekleri için Değerli Koordinatörüm Sayın **Dilek EMİL**'e, Değerli Uzmanım Sayın **Anıl BAYÜLKER**'e ve Değerli **İş Arkadaşlarım**'a; yanımda olmasalar bile lisans ve yüksek lisans dönemlerimde ailem kadar yakın olan, anlayış gösteren, moral motivasyonumu arttıran, varlıklarını hissettirip 7/24 yanımda olan **Canım Arkadaşlarım**'a, özellikle; dert ortağım, yanımda olmasıyla kendimi her zaman güvende hissettiğim biricik ev arkadaşım **Aytül HAMZALIOĞLU**'na; küçük kızları olmaktan her zaman gurur duyduğum, sevgimi kelimelere sığdıramadığım, hayatımın tamamı canım ailem: birtanecik babam **Nusret ÇOLAKLAR**, biricik annem **Serpil ÇOLAKLAR** ve diğer yarım, ablam **Ayşem ÇOLAKLAR KIZILAY**'a en içten teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	iii
TEŞEKKÜR.....	v
Çizelgeler Dizini.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. MATERYALLER	18
3.1.1. Çiğ Süt.....	18
3.1.2. Kültürler	18
3.1.3. Peynir Katkıları	18
3.1.3.1. Kalsiyum Klorür (CaCl ₂).....	18
3.1.3.2. Peynir Mayası-Rennet.....	18
3.1.3.3. Tuz (NaCl)	18
3.1.3.4. Salamura	19
3.1.4. Besiyerleri.....	19
3.1.4.1. Tryptic Soy Broth (TSB).....	19
3.1.4.2. Tryptic Soy Agar (TSA).....	19
3.1.4.3. Baird Parker Agar (BPA)	20
3.1.4.4. MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) Broth	20
3.1.4.5. MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) Agar	21
3.1.4.6. Yağsız Süt Tozu ve Rekonstitüye Süt	21
3.1.5. Besiyeri Katkıları.....	22
3.1.5.1. Pirüvik Ait Sodyum Tuzu (Pirüvat).....	22
3.1.5.2. Yumurta Sarısı-Tellürit Emülsiyonu	22
3.1.6. Tamponlar ve Çözeltiler.....	22
3.1.6.1. Lambda Tamponu	22
3.1.6.2. 10 mM Tris- HCl Çözeltisi.....	23
3.1.6.3. 10 g/mL Lizozim Çözeltisi.....	23
3.1.6.4. 0.5 M Disodyum etilendiamin tetraasetik asit (Na ₂ EDTA) Çözeltisi	23
3.1.6.5. Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu (10X).....	23

3.1.6.6. Butterfield's phosphate (BFP).....	24
3.1.7. Boya Çözeltileri	24
3.1.7.1. 1 mg/mL Etidyum Bromür Çözeltisi	24
3.1.7.2. 6X Yükleme Boyası Çözeltisi.....	24
3.1.8. DNA İzolasyonu ve Saflaştırma Kiti	24
3.1.8.1. High Pure PCR Template Preparation Kit	24
3.1.9. PZR Yöntem ve Düzeneği	25
3.1.10. Oligonükleotidler.....	26
3.1.11. Agaroz Jel Elektroforezi ve İşlem Düzeneği	26
3.1.11.1. % 1.5 (w/v)'lik Agaroz Jel	26
3.1.12. Jel Görüntüleme İşlemi Deney Düzeneği	27
3.2. METOT	28
3.2.1. <i>S.aureus</i> 'un Kültürel Sayımı ve Süte Ekleme Amacı ile Hazırlanması....	28
3.2.2. <i>L. plantarum</i> 'un Canlandırılması ve Süte Eklenmesi Amacı ile Hazırlanması	29
3.2.3. Peynir Üretimi	30
3.2.4. Peynir Örneklerindeki <i>S. aureus</i> ve Laktik Asit Bakteri Sayımı.....	31
3.2.5. DNA İzolasyonu ve Saflaştırma İşlemi.....	33
3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	34
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3.2.8. Jel Görüntüleme	35
3.2.9. İstatistiksel Analizler	36
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	37
5. SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	57

Çizelgeler Dizini

Çizelge 4.1 Örnek Alım Yerleri ve Zamanları	37
Çizelge 4.2 Kontrol Grubuna Ait Örnek Alım Yerleri ve <i>S.aureus</i> Sayım Değerleri ...	38
Çizelge 4.3 Örnek Grubuna Ait Örnek Alım Yerleri ve <i>S.aureus</i> Sayım Değerleri.....	39

Şekiller Dizini

Şekil 3.1. <i>S.aureus</i> 'un BPA üzerindeki koloni ve zon görüntüsü	20
Şekil 3.2. <i>L. plantarum</i> 'un MRS agardaki koloni görüntüsü	21
Şekil 3.3. MWG-Biotech Inc (Ebersberg, Almanya) Primus 96 Thermal Cyclers.....	25
Şekil 3.4. Syngene (Cambridge, İngiltere) InGenius Jel Görüntüleme Sistemi.....	27
Şekil 4.1 <i>L. plantarum</i> 'un <i>S. aureus</i> 'a etkisi, t (saat) – log (EMS/mL).....	40
Şekil 4.2 <i>S. aureus</i> ATCC6538 bakterisinin <i>nuc</i> geninin 400 bç'lik gen bölgesi görüntüsü.....	43

Ekler Dizini

Ek 1. EMS Tablosu	1
-------------------------	---

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
A	Adenin veya adeozin
bç	Baz çifti
BFP	Butterfield's phosphate
BPA	Baird Parker Agar
C	Sitozin veya sitidin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	2'-deoksisitidin-5'-trifosfat
dGTP	2'-deoksiguanozin-5'-trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiriboükleozid trifosfat
dTTP	2'-deoksitimidin-5'trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMS	En muhtemel sayı
G	Guanin veya guanozin
HPPTP	High Pure PCR Template Preparation Kit
<i>invA</i>	İnvasion (yayılma) A
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
LAB	Laktik asit bakterisi
MRS Agar	MAN, ROGOSA ve SHAPE Agar
Na ₂ EDTA	Disodyum etilendiamin tetraasetik asit
NaCl	Sodyum klorür
<i>nuc-F166</i>	<i>nuc</i> -ileri 166 primeri
<i>nuc-R565</i>	<i>nuc</i> -geri 565 primeri

PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	devir/dakika
T	Timin veya timidin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
Tris-HCl	Tris-Hidroklorik asit
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus, yaygın stafilokokal enfeksiyonlara ve dolayısıyla ekonomik kayıplara yol açan etkili bir patojendir (Alarcon et al., 2006) ve süt veren hayvanların meme enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. *S. aureus*'un, meme enfeksiyonu olan ve mastitisli süt veren hayvanların süt verimini (Wilson et al., 1997) ve süt protein kalitesini düşürdüğü bilinmektedir (Barbano et al., 1991).

Laktik asit bakterileri doğada yaygın olarak bulunan ve süt ve süt ürünlerinin mikroflorasında baskın konumda mikroorganizmalardır. Suşa bağlı olmakla birlikte asidifikasyon aktivitesi, proteolitik kapasitesi, bakteriyosin sentezi, bakteriyofajlara olan direnci ve ekzopolisakkarit üretimi gibi birçok metabolik özelliğe sahip laktik asit bakterileri starter kültür da olarak kullanılmaktadır (Law and Kolstad, 1983; Nieto-Arribas et al., 2009).

Laktik asit bakterileri patojenik ve zehirlenmelere yol açan bakterilere karşı antagonistik potansiyelleri nedeniyle gıda endüstrisi ve insan sağlığı açısından çok önemlidir (Gillor, 2007). Peynir, biyolojik ve biyokimyasal açıdan dinamik bir ürün olup peynirin olgunlaşma sürecinde, kompleks yapıda birçok biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir (McSweeney, 2004). Laktik asit bakterileri bu biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirirken patojen bakterilere karşı antagonistik etki göstermektedirler (Ortalani et al., 2010). Laktik asit bakterileri, ayrıca patojenik bakterilerin gelişmesine ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel bileşenler üretmektedirler (Herreros et al., 2005). Bu yüzden *L. plantarum*, birçok gıda ürünüde uzun yıllardır güvenli olarak kullanılan bir bakteri suşudur (Maaik et al., 2004). Ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit (H_2O_2), CO_2 , diasetil ve bakteriyosin gibi metabolitler de, diğer mikroorganizmaların inhibisyonunda etkilidir (Ortalani et al., 2010).

Sağlık açısından önemli ekonomik kayıplara sebep olan (Alarcon et al., 2006) gıdalardaki patojenlerin belirlenmesinde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 1980'lerin ortalarından bu yana kullanılan etkili bir yöntemdir (Wang et al., 1997). PZR tekniği ile, çeşitli gıdalarda yer alan patojen bakteriler hızlı ve yüksek hassasiyette belirlenebilmektedir (Lantz et al., 1994).

Bu çalışmada; patojen bakteri olarak *Staphylococcus aureus* ATCC6538 ve *Lactobacillus plantarum* BG33 suşları kullanılmıştır. Çalışmamızda, patojenler üzerindeki antibakteriyel etkileri *in vitro* ortamda gösterilmiş olan *L. plantarum* BG33'n *S. aureus* ATCC6538 zerindeki antibakteriyel etkisi peynirde matriksinde test edilmiştir. Bu amaçla Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü'nden tedarik edilen çiğ süt kullanılarak Beyaz peynir elde edilmiş ve pastörizasyon sonrası, pıhtı kesimi, kalıp kesimi, n salamura çıkışı ve depolama süreci boyunca örnekler alınmıştır. Belirtilen bu aşamalardan alınan örneklerin *S. aureus* ve laktik asit bakteri sayımı yapılmış ve EMS yöntemine göre sayım sonuçları hesaplanmıştır. Daha sonra rnekler DNA saflaştırma işlemine alınmıştır. DNA'ları saflaştırılan örneklere, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) işlemi uygulanmış ve *S. aureus*'a özgü *nuc* geninin 400 bç'lik bölgesi çoğaltılmıştır. Elektroforez yöntemiyle istenilen bölgeleri agaroz jel üzerinde yürütülerek UV altında görüntülenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar adını mikroskop altındaki karakteristik görünümüleri nedeni ile Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen "staphyle" sözcüğünden almıştır (Lowy, 1998). Stafilokoklar ilk kez Pasteur ve Koch tarafından gözlenmiş, ancak ayrıntılı çalışmalar ilk olarak 1881'de Ogston ve 1884'te Rosenbach tarafından yapılmıştır (Cookson et al., 2003).

Micrococcaceae familyası üyesi olan Stafilokok türleri Gram-pozitif, 0.5 – 1.5 µm çapında, kok şeklinde, spor oluşturmeyen, hareketsiz, katalaz pozitif, fakültatif anaerob bakterilerdir (Tükel ve Doğan, 2000).

Stafilokoklar, sporsuz bakteriler içinde olumsuz çevre şartlarına ve dezenfektanlara oldukça dirençli, 4°C sıcaklıkta 2-3 ay, -20°C sıcaklıkta 3-6 ay dayanma süresine sahip mikroorganizmalardır. Antibiyotiklere karşı çok çabuk direnç oluştururlar. Sahip olduğu penisilinaz enziminin etkisi ile penisilin etkisini ortadan kaldırırlar (Kloos and Bannerman, 1995).

Gram-pozitif kok olan Stafilokok cinsi grubunda yer alan *S. aureus* fakültatif anaerobdur (Stapleton and Taylor, 2002). *S. aureus*' un diğer önemli özellikleri ise; su aktivitesi (a_w) 0.86, pH 4.8'in üzerinde, 7 - 48°C sıcaklıklarda ancak optimum olarak 35 - 45°C sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Hidrojen peroksiti (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüştürebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı katalaz testi ile diğer stafilokok, enterokok ve streptokoklardan ayrılmaktadır. Ayrıca *S. aureus*, oksidaz negatif ve hareketsizdir (Mackie and McCartney, 1989).

S. aureus akut veya kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* suşlarının patojenitesi; tutunma özellikleri, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstrasellüler faktörler gibi özelliklerine bağlıdır. Yapışkan tabaka üretmesi ve biyofilm oluşumu da patojenite faktörlerindedir (Ammendolia et al., 1999; Amorena, 1999).

S. aureus hayvanlarda bulaşıcı mastitise (meme iltihabı) sebep olan en önemli mikroorganizmadır (Graber et al., 2007) ve dünya çapında önemli ölçüde ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Hogeveen, 2005). *S. aureus* tarafından üretilen enterotoksinler gıda hijyenine yeteri kadar özen gösterilmemesi sonucu

gıda zehirlenmelerine sebep olmaktadır. *S. aureus* ile kontamine olan süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan birçok salgın rapor edilmiştir (Hein et al., 2001).

S. aureus ısıya dayanıklı enterotoksin üreten ve bu toksinleri içeren gıdaların tüketilmesiyle intoksikasyona sebep olan gıda kaynaklı bir patojendir (Ercolini et al., 2004). Patojenik bakteriler arasında enterotoksin üreterek sık sık gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır (Le Loir et al., 2003).

S. aureus'un patojenitesine katkısı olduğu düşünülen hücre dışı protein toksinleri ve virülans faktörleri spektrumunu üretmektedir (Akıneden vd., 2001). Stafilokokal enterotoksinler (SE) molekül ağırlığı 26 900 - 29 600 Dalton arasında değişen, yapısında fazla miktarda lizin, tirozin, aspartik asit ve glutamik asit bulunduran tek zincirli proteinlerdir. SE'nin yaygın olarak görülen 7 farklı tipi bulunmaktadır. A (SEA); B (SEB); C1 (SEC1); C2 (SEC2); C3 (SEC3); D (SED) ve E (SEE). Nadir olmakla birlikte, *S. aureus*' un G, H, I, J ve K tipi toksin ürettiği de belirlenmiştir (Küçükçetin ve Milci, 2008).

Dünyada stafilokokal enfeksiyonlara ve ekonomik kayıplara sebep olan *S.aureus*' un intoksikasyonu bulantı ve diyare ile karakterize edilmektedir ve *S. aureus* tarafından üretilmiş olan bir ya da daha fazla SE toksini içeren gıdaların tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir. Gramında 10^6 - 10^8 *S. aureus* hcreti içeren gıdaların tüketilmesi gıda zehirlenmeleri için yeterlidir. Ayrıca *S. aureus* konsantrasyonu 10^5 üzerine çıkmış olan gıdalarda, *S. aureus*'un 1 µL'den az enterotoksin üretmesi ile birlikte, bu toksini içeren kontamine gıdaların tüketilmesi, hassas bireylerde 1 - 6 saat içerisinde semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Alarcon et al., 2006).

Bazı durumlarda üretilen SE miktarı gıda zehirlenmeleri için yetersizdir. Ayrıca bu toksinlerin üretilmesi için NaCl konsantrasyonu, sıcaklık, pH, ortam koşulları ve rekabetçi flora gibi birçok faktör etkilidir (Cremonesi et al., 2007). *S. aureus*'tan kaynaklanan gıda zehirlenmesi, bu bakterinin gıdada ürettiği enterotoksinlerin bulunduğu ya da *S. aureus*'un enfektif dozunun üzerinde bulunan gıdaların tüketilmesiyle birlikte hızlı bir şekilde ortaya çıkar. Belirtileri; bulantı, kusma ve ishaldir (Jorgensen et al., 2005).

Birçok stafilokok türü bazı hayvan türlerinde yaşamaya uyum sağlamışlardır. Buna karşın *S. aureus* deniz ve kara memelilerinin normal deri mikroflorasında zararsız bir üye olarak bulunabilmektedir (Alarcon et al., 2006).

S. aureus süt veren hayvanların meme enfeksiyonlarının en önemli nedenidir (Ollis et al., 1995). Mastitis, süt veren hayvanların süt üretimini (Wilson et al., 1997), süt protein kalitesini (Barbano et al., 1991), üreme (Schrick et al., 2001) ve yaşam sürelerini (Caraviello et al., 2005) olumsuz etkilediği için büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Klinik mastitis, sütün görünüşünü bariz bir şekilde değiştirmektedir. Subklinik mastitis ise sütün görünüşünü gözle görünür şekilde değiştirmedeği halde sütteki somatik hücre sayısı artmakta ve sütün kalitesi düşmektedir (Ferguson et al., 2007).

Mastitis etmenleri genellikle çevresel ya da bulaşıcı tip olmalarıyla sınıflandırılır (National Mastitis Council, 1987). Bulaşıcı organizmalar major ve minor patojenler olmak üzere iki alt sınıfta gruplandırılır. Major bulaşıcı patojenleri *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* ve *Mycoplasma* spp. oluşturmaktadır. Koagülaz negatif stafilokoklar ve *Corynebacterium bovis*'in de mastitis oluşumunda kısmen de olsa rol aldığı düşünülmektedir. Bulaşıcı patojenler inek memesinde yaşamaktadır. Enfekte olmamış inekler için en önemli kontaminasyon kaynağı enfekte olmuş ineklerdir. Bir diğer enfeksiyon kaynağı ise sağım sırasındaki bulaşmadır (Ortolani et al., 2010).

Çevresel patojenler, ineğin bulunduğu çevrede bulunmaktadır. Nem ve fekal bulaşlar çevresel patojenlerin ortaya çıkma ve hayvanın memesini kontamine etme riskini artırmaktadır. Çevresel mastitisin kontrolü, hayvanın yaşadığı yerin kuru ve temiz tutulması, sağımdan önce memenin temizliğine dikkat edilmesi ve hayvanın memesinin bu organizmalarla enfekte olmasını engelleme ile gerçekleştirilebilir (Smith and Hogan, 2008; Jorgensen et al., 2005).

Laktik asit bakterileri Gram-pozitif, sporsuz, anaerobik ortamda gelişebilen, fermentatif ve geleneksel olarak gıda muhafazası uygulamaları için kullanılan bakteri türlerini içermektedir (Holzapfel et al., 2001). Laktik asit bakterileri Gram-pozitif mikroaerofilik bakterilerin düşük G+S (Guanin + Sitozin) grubuna dahildir ve gıda fermantasyonunda oldukça önemlidir. Laktik asit bakterileri süt

ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak da kullanılmakta ve ürüne özgü karakteristikleri sağlamaktadır (Mozzi et al., 2010). Heterofermentatif türleri, yan metabolit olarak asetik asit, formik asit, etanol ve karbondioksit oluşturabilmektedir (De Vuyst and Leroy, 2007). Starter kültür olmalarının ve bazılarının probiyotik özelliğe sahip olmasının dışında bakteriyosin gibi antimikrobiyel ajanlar üretmeleri ve patojen bakterileri inhibe etme kapasiteleri onların gıda fermantasyonunda ve biyolojik gıda korunmasında kullanımlarını vazgeçilmez bir uygulama haline getirmiştir (Riley, 2011).

Laktik asit bakterileri doğada yaygın ve süt ve süt ürünlerinin mikroflorasında baskın olan mikroorganizmalardır. Suşlarına bağlı olmakla birlikte asidifikasyon aktivitesi, proteolitik aktivitesi, bakteriyosin sentezi, bakteriofajlara olan direnci ve ekzopolisakkarit üretimi gibi birçok metabolik özelliklerine göre starter kültür olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri, süt ürünlerinin özgün niteliklerini kazanmasında çok önemli rol oynayan mikroorganizmalardır (Law, 1997; Cai et al., 2007). Laktik asit bakterileri üretmiş oldukları laktik asit aracılığı ile süt ürünlerinde *in situ* koruyucu ve bozulmayı önleyici niteliğinin yanısıra starter kültür olarak kullanıldıklarında son üründe duyuusal, fiziksel ve kimyasal niteliklerin oluşumuna da katkı sağlamaktadır (Helander et al., 1997). Starter kültür en az bir mikroorganizmaya ait çok miktarda hücrenin kullanımı ile fermente gıda üretimi, fermantasyon prosesini hızlandırma ve yönlendirme amacıyla kullanılan mikrobiyel preparasyondur (Asmahan, 2010). Bu kültürler süütün fermantasyonunun başlatılması ve ürünün yapısal ve aromatik özelliklerinin geliştirilmesinden sorumludurlar (Akçelik ve Şanlıbaba, 2000). Fermente gıda ve içeceklerde laktik asit bakterilerinin kullanımı uzun yıllardır kullanılan güvenli bir uygulamadır (Asmahan, 2010). Ülkemizde süt endüstrisinde kullanılan starter kültürler, ağırlıklı olarak yurt dışından sağlanmaktadır (Akçelik ve Şanlıbaba, 2000). Bu bakteriler organik asit ve özellikle laktik asit üretimi ile birlikte hammaddede hızlı asidifikasyona sebep olmaktadır (Hugenholtz, 2008). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolitler ürünün raf ömrünü uzatmakta, üründe mikrobiyel güvenliği artırmakta, yapıyı geliştirmekte ve duyuusal albeniyi güçlendirmektedir (Harris et al., 1989). Starter laktik asit bakterileri türlerinin kombinasyonları, geniş çeşitlilikte olan süt ürünlerinin fermantasyonunda farklı proses teknolojiler ile birlikte kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin gelişme ve aktivitesi gıdalarda

bozulma oluşturan ve/veya patojenik bakterilere karşı engelleyici etki yapmaktadır (Theron, 2011). Süt endüstrisinde ticari starter olarak kullanılan laktokok suşlarının diğer önemli özellikleri ise laktoz ve sitrat fermantasyon yetenekleri, proteolitik aktiviteleri, bakteriyosin üretimleri ve bağışıklık ve bakteriyofaj dirençleridir (Özkalp et al., 2007). Bu starter bakterilerde laktoz metabolizması, diğer Gram-pozitif bakterilerin çoğunluğunda bulunmayan, fosfofenol piruvata bağımlı fosfotransferaz sistemi (PEP-PTS) tarafından başlatılmaktadır. Bu sistemde laktoz hücre içine fosforile formda alınmakta ve fosfo-β-galaktosidaz enzimi aktivitesi ile glukoz ve galaktoz 6-fosfata parçalanmaktadır. Bu aşamadan sonra glukoz Embden-Mayerhof-Parnas (EMP), galaktoz 6-fosfat ise tagatoz 6-fosfat yolu ile katabolize edilmektedir (Akçelik ve Tükel, 2000). Fizyolojik olarak büyük önem taşıyan süt şekeri (laktoz), glukoz ve galaktozdan oluşan bir disakkarittir. Laktozun bir monosakkariti olan galaktoz, beyin dokusundaki glikolipitlerin yapısında bulunmaktadır. Laktoz, bağırsaklarda asidik bir ortam oluşturarak kalsiyum ve fosforun emilimini kolaylaştırmakta, kokuşma ve proteolitik etki yapan bakterilerin gelişmesini engellemektedir (Türkoğlu vd., 2003).

Laktik asit bakterileri, patojenik ve zehirlenmelere yol açan bakterilere karşı antagonistik potansiyeli olmasından dolayı gıda endüstrisi ve insan sağlığı açısından çok önemli bir konum elde etmiştir. Laktik asit bakterileri gelişimleri sırasında gıdada ye alan diğer mikroorganizmalar ile besin maddelerine erişim için rekabet halindedir. (Gillor, 2007). Yapılan birçok çalışmada da laktik asit bakteri kùltürlerinden antifungal bileşiklerin izole ve karakterize edildiği belirtilmiştir (Gerez et al., 2009).

Bakteriyosinler biyolojik olarak aktif peptid ya da protein yapısında olan bileşiklerdir ve spesifik mikroorganizmalara karşı antagonistik etkileri vardır (Lewus et al., 1991). Çeşitli spesifik inhibisyon testleriyle tanımlanabilen bakteriyosinler protein yapısında olmalarından dolayı proteinazlara karşı duyarlıdır (Harris et al., 1989). Birçok laktik asit bakteri türü farklı bakteriyosin üretmeleri dolayısıyla tanımlanabilmektedir (Chen and Hoover, 2003).

Bakteriyosinlerin ekspresyonları gen tanımlamaları ile yapılabilmektedir (Chen and Hoover, 2003) ve birçok bakteriyosin, bu yöntemle tanımlanmıştır (Paul, 2003). Bu gen sekanslarının tanımlanması yeni bakteriyosinojenik laktik asit bakteri

kültürlerinin hassas bir şekilde tanımlanabilmesi açısından oldukça önemli bir yoldur (Holzapfel et al., 2001; Mohania et al., 2008).

Farklı gıda türleri için laktik asit bakterileri hakkında fazla bilgiye sahip olursa da (Lewus et al., 1991; Dufour et al., 1991; Gelinski et al., 2010), patojenlerin kontrol edilebilmesinde özgün teknikler geliştirebilmek için yeni bakteriyosinjenik suşların tanımlanabilmesi gerekmektedir (Ortolani et al., 2010).

Laktobasiller ise, süt fermantasyonunun başlatılması, ürünün yapısal ve aromatik özelliklerinin geliştirilmesinden sorumlu olup aynı zamanda ortamda hakim florayı oluşturarak ya da ürettikleri değişik tip antibakteriyel maddeler sayesinde üründe bozulma ya da gıda kökenli hastalık etmeni mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesinde de önemli rol oynamaktadırlar (Tuncer, Özden ve Akçelik, 2008).

Peynirin doğal florasının teknolojik özelliklerinin tanımlanması; peynirde arzu edilen tekstür, aroma, tat-koku ve yapıyı oluşturabilmek amacıyla dengeli starter bakteri kombinasyonlarını seçimi çok önemlidir (Hayaloğlu et al., 2008). Gıdanın korunması ve tat-koku gelişimi amacıyla yönelik olarak genellikle laktik asit bakterileri kullanılmaktadır. Belli çevresel koşullar altında fermente gıdalarda bu bakterilerin egemen olması desteklenmektedir (Quere et al., 1997). *L. plantarum* peynir ve bazı fermente süt ürünlerinde uzun yıllardır starter kültür olarak kullanılmaktadır (Vries et al., 2006).

Laktik asit bakterileri proteolitik enzimler aracılığı ile yıkıma uğrayan kazeinlerden açığa çıkan peptidler ve serbest aminoasitleri kullanarak gelişimlerini sağlamaktadırlar (Mozzi et al., 2010). Bu peptidler çeşitli peptidazların ortak ortak aktiviteleri sonucunda aminoasitlere hidrolize olmaktadır. Bu proses sırasında peynirde birçok acımsı peptid, ara ürün olarak oluşur ve bu ara ürünler daha ileri hidrolizasyona uğrayarak peynir başta olmak üzere süt ürünlerinde özgün yapı, tat-koku özelliklerinin oluşmasına neden olur (Alting et al., 1995). Serbest aminoasitlerin bazı spesifik tat-koku bileşenlerine dönüşmesinden sonra daha karmaşık işlemler sonucunda tat-koku oluşturan ürünler ortaya çıkar. Aroma bileşenlerinin birçoğu, metiyonin lösin ve fenilalanin gibi aminoasitlerin dönüşümü ile oluşabilmektedir. Peynir yapımında kullanılan *L. lactis* suşlarının ürettiği aminoasitlerin kompozisyon ve konsantrasyonu suşa bağlı olarak değişiklik

göstermektedir. En bariz farklılık ise suşun belli bir aminoasit dönüştürücü metabolik yola sahip olup olmamasıdır. Genetik mühendisliği ve gen teknolojisi spesifik aroma oluşturmada sorumlu özelleşmiş genleri bulunan suşlar arasındaki farklılıkları tanımlamada kullanılmaktadır (Smit et al., 2005)

Belli bir hammaddeden elde edilen ürünlerin spesifik karakterleri, üretimin yapıldığı ortam, çevresel şartlar, geleneksel araçlar ve üretim modeli ile şekillenmektedir. Bu konuda daha fazla bilgi için tipik tekstür ve tat-koku gelişimine sebep olan mikrobiyolojik ve biyokimyasal özellikler arasındaki ilişkinin anlaşılması gerekmektedir (Ercolini et al., 2003).

L. plantarum, uçları yuvarlak, çubuk şeklinde, ribozdan laktik asit ve asetik asit oluşturan, anaerobik ve Streptobacterium grubu laktobasildir (Kılıç, 2001).

L. plantarum, 70'den fazla tür içeren büyük ve yaygın bir laktobasil türüdür. DNA'nın Guanin+Sitozin (G+S) içeriği çeşitli türlerde % 32'den % 54'e kadar değişmektedir. *Lactobacillus* spp. fermantasyon yeteneklerine göre zorunlu homofermantatif (grup 1), fakültatif heterofermantatif (grup 2) ve zorunlu heterofermantatif (grup 3) olarak üç gruba ayrılır. Grup 1, heksozu fruktoz-1,6-bifosfat metabolik yolu ile laktik aside çevirmektedir. Ancak, glukonat ya da pentozları fermente edememektedir. Buna karşılık Grup 2, pentozları ve/veya glukonatu fermente edebilmektedir. Grup 3, heksozları laktik asit, asetik asit ve/veya etanol ve karbondioksite fermente etmektedir. *Lactobacillus* türünden olan *L.delbrueckii* zorunlu homofermantatif olduğu halde *L. plantarum* fakültatif heterofermantatiftir. *L.delbrueckii*'nin % (G+S) oranı % 49 ile 51 arasında iken *L. plantarum* un % 44 – 46'dır (Molin, 2003).

Yapılan klinik çalışmalar ile birlikte *L. plantarum*'un sağlığa olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür. *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* ve *Bifidobacterium breve* bakterilerinden oluşan bir probiyotik karışımın yetişkinlerdeki rahatsız bağırsak sendromu hastalıklarının iyileşmesinde pozitif etkisinin görüldüğü saptanmıştır (Uymaz, 2009).

L. plantarum, *L. monocytogenes*'e karşı genelde orta ve düşük aktiviteli suşlara sahiptir (Gülseren, 2008).

Laktobasil cinsi daha da alt gruplara bölünmüştür ve günümüzde beş filogenetik rRNA grubuna ayrılmıştır (Molin, 2003):

1. *L. acidophilus* grup (*L. delbrueckii* % G+S mol yüzdesine bakılarak atipik zorunlu homofermentatif sayılmaktadır)
2. *L. salivarius* grup
3. *L. reuteri* grup
4. *L. bunchneri* grup
5. *L. plantarum* grup

L. plantarum kullanım alanı esnek ve çok amaçlı bir mikroorganizmadır. Ayrıca *L. plantarum* insanların mide-bağırsak sistemlerinde ve satılan birçok ürünün içerisinde tüketicinin sağlığını olumlu yönde etkileyen probiyotik olarak karşımıza çıkmaktadır (Kleerebezem et al., 2003). Ayrıca probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (Kumar et al., 2011).

L. plantarum, diğer mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında düşük pH koşullarını tolere edebilme özelliği sebebi ile ekşi hamur, yeşil zeytin ve doğal şarap gibi gıda ve içeceklerde baskın tür konumundadır. Bu bakteri genellikle daha çok et ile beslenen bireyler yerine vejeteryan bireylerin kommensal mikrobiyotasında görülmekte (Puertollano et al., 2008) ve bu bakterinin önemli antimikrobiyel bileşenler ürettiği bilinmektedir (Reenen et al., 1998).

L. plantarum içeren bitkisel ürünler; zeytin, kakao çekirdeği, tapyoka (Cassava), turşu, togwa, şarap, hayvansal ürünler; süt ürünleri; Stilton Peyniri, Feta Peyniri, Ricotta forte peyniri, et ürünleri ise; fermente kuru sosis, fermente İtalyan sosisidir (Maaik et al., 2004).

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* BG33'ün karakterizasyonuna bakıldığında; 10°C sıcaklıkta gelişiminin olmadığı, 15°C sıcaklıkta gelişim gösterdiği, 45°C sıcaklıkta ise gelişmediği görülmüştür. Testlerde katalaz aktivitesinin olmadığı ve glukozdan gaz üretmediği saptanmıştır. Ayrıca MRS broth'da yapılan pH denemelerinde ortam pH'sı 3.0 olduğunda % 97.86'lık gelişme gösterdiği bulunmuştur (Uymaz, 2009). Laktik asit bakterilerinin asit toleranslarının gelişme ortamı ve inkübasyon koşulları, H⁺ - ATPaz enzimi ve bakteri türüne göre farklılık

gösteren stoplazmik membran yapısına bağı olarak değiştiği gösterilmektedir (Havenaar et al., 1992, Oh et al., 2000, Khalil et al., 2007).

Peynir, süt ürünleri arasında en çok çeşitlilik gösteren üründür (Coda et al., 2006). Peynirin tekstür, renk, erime ve uzama gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin öncelikli olarak kazein molekülleri arasındaki etkileşime bağlı olduğu belirtilmektedir (Lucey et al., 2003). Peynirin geçirdiği fiziksel ve biyokimyasal değişimler sonucunda peynirin olgunlaşması kompleks ve dinamik biyokimyasal prosesleri içermektedir. Bu biyokimyasal proseslerin arasında protein yıkımı, yağ hidrolizi ve laktoz metabolizması vardır (Hayaloğlu et. al, 2005). Türkiye toplam peynir üretiminin % 60'ını oluşturan ve Türkiye'deki en popüler peynir çeşidi olan Beyaz peynirin üretimi binlerce yıl öncesine dayanmaktadır (Toufeili and Özer, 2006). Geleneksel Beyaz peynir küp ya da dikdörtgen şeklinde ve kabuksuz yapıdadır (Hayaloğlu et al., 2002).

Pastörizasyon, sütü insan tüketimi amacı ile daha sağlıklı hale getirebilmek için çiğ sütteki çoğu ısıya dayanıklı patojenik bakterilerin inhibe edilmesi amacıyla uygulanan bir prosestir (Donnelly, 2001; 2005). Pastörizasyon, tipik olarak sütün 72-75°C sıcaklıkta 15-30 s'de plakalı ısı değiştiriciden geçirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte sütteki zararlı bakteri miktarı azaltılmakta, sütün raf ömrü uzatılmakta ve sütte doğal olarak bulunan birçok enzimler inaktive edilmektedir. Pastörizasyon ısıya dayanıklı bakteriyel endosporlara karşı çok az etki etmektedir (McSweeney and Fox, 2004; Su and Ingham, 2000).

Gelişmiş birçok ülkede pastörizasyon çoğu süt ürününün üretiminde ön koşul olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte bazı peynirlerin geleneksel fiziksel ve duyuşal özelliklerinin korunabilmesi amacıyla çiğ süttten peynir üretimi de söz konusudur (Beresford and Williams, 2004).

Çiğ süttten peynir üretimi ile patojen bakteriler sütte canlılıklarını devam ettireceğinden, bu olay sağlık açısından açıkça risk oluşturmaktadır (Kindstedt, 2004).

Starterler peynir yapım prosesinde fermantasyon ile laktozdan laktik asit üretimini ve bunun sonucunda pH düşüşünü kontrol edebilmek için kullanılan bakteriyel kültürlerdir. Asidifikasyon; peynirin bileşimi, yapısı ve olgunlaşmasında peynir

üretiminde odağında bulunduğundan, rennet aracılığı ile peynirin kompozisyonu, şekillendirme ve değiştirmekte, sinerezisi kolaylaştırmanın yanı sıra koloidal kalsiyum fosfatın çözünmesini ve patojen mikroorganizmaların inhibisyonunu da sağlamaktadır. Starter kültürler, CO₂ üretimi ve pH düşüşü ile birlikte gıdanın mikrobiyel güvenliğini sağlarken, redoks potansiyelini düşürmekte ve patojenleri inhibe etmektedir (Donnelly, 2001; 2005). Bunun ile birlikte bazı peynirlerde istenen boşluk (göz) oluşumuna da katkıda bulunmaktadır (Sheehan, 2007). Ayrıca starter kültürler peynirlerin olgunlaşması sırasında sitrat metabolizması ya da peptidaz, esteraz, lipaz ve diğer enzimlerin salınımı ile peynirin tat-koku ve aromasını etkilemektedir (Upadhyay, 2004)

Starter Kültür Tipleri:

- ✓ Peynir yapımında kullanılan mezofilik starter kültürlerin optimum gelişme sıcaklığı yaklaşık olarak 26-30°C'dir ve mikroorganizmaların zarar görmemesi için bu sıcaklığın 40°C'yi aşmaması gerekmektedir (Düsterhöft and van den Berg, 2007)
- ✓ Optimum gelişme sıcaklıkları yaklaşık 40°C olan termofilik starter kültürler, İtalyan (Gobbetti and Di Cagno, 2002) ve İsviçre tipi (Fröhlich-Wyder and Bachmann, 2008) peynirlerin yapımında kullanılmaktadır. Bu kültürler *S. thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *L. delbrueckii subsp. lactis* gibi laktobasil mikroorganizmalar içermektedir. Genellikle, Çedar (Donaghy et al., 2004) ve Gouda tip peynirlerin yapımında asidifikasyonu (*S. thermophilus*) ve tat-koku sağlayabilmek için termofilik kültürlere yardımcı kültürler eklenmektedir. Mozzarella tip peynir üretiminde ise fazla süt şekerinin ısıtma işlemi sırasında metabolize olup esmerleşmesini en aza indirmek için mezofilik kültürler kullanılmaktadır (Bley et al., 1985).

Starter kültürler tanımlanmış ve karışık kültürler olarak alt gruba ayrılmaktadır. Tanımlanmış tür kültürler, fizyolojik karakterleri ve teknolojik özellikleri bilinen saf kültürlerdir. Karışık suş kültürleri laktik asit bakterilerinin bilinmeyen sayıda aynı türün farklı suşlarını ve farklı türlerden ya da cinslerden bakteri gruplarını içerebilmektedir (Sheehan, 2007). Peynir dinamizm kazandıran ve birçok bilimsel disipline çalışma olanağı sağlayan unsurlardan biri peynir üretimi ve olgunlaşması sırasında son derece önemli rolleri olan laktik asit bakterileridir (Hayaloğlu, 2003).

Starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri peynir, teknolojisinde iki önemli görevi üstlenirler. Bunlar sırasıyla; 1) peynir üretim sürecinde, süt şekerinden (laktoz) laktik asit üretmek, 2) peynirin olgunlaşma sürecinde, sahip oldukları enzimler aracılığı ile proteinleri, karbonhidratları ve yağları hidrolize ederek peynirde tat-koku maddelerinin ve tekstürel özelliklerin oluşmasını sağlamaktır. İkincil (ek) mikroflora olarak yer alan bakteriler (genellikle starter dışı laktik asit bakterileri olarak adlandırılır ve fakültatif heterofermentatif laktobasillerden oluşur, bununla beraber *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* ve propiyonik asit bakterileri bu grup içinde kabul edilmektedir), küfler ve mayalar da starter bakteriler gibi peynirde olgunlaşmaya yardımcı olurlar. Bunu; doğrudan metabolik aktivite göstererek ya da hücrelerinin otolize olarak enzimleri peynir matriksi içinde aktivite göstererek gerçekleştirirler (Fox, 1999).

Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan ya da birçok peynir çeşidinin starter dışı mikroflorasında baskın mikroorganizmalar olarak bulunabilen laktik asit bakterileri öncelikle; peynir sütünün asitliğinin gelişiminden sorumludurlar. Bununla beraber bu kültürler peynirin olgunlaşması sürecinde tat-koku öğelerinin gelişmesine de katkıda bulunurlar (Lane and Fox, 1996). Küflerin, mayaların ve aralarında *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'inde bulunduğu birçok mikroorganizma peynir üretiminde ek kültür olarak kullanılabilir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Starter bakterileri, sütün pH değerini 30-37°C sıcaklıkta 6 saatte pH<5.3'e kadar azaltmak için yeterli derecede asit üreten flora olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri, çiğ süttten yapılan peynirlerde olduğu gibi ya peynir sütünün doğal florasında yer alır ya da pastörize süttten yapılan peynirlerde olduğu gibi peynir sütüne bilinçli olarak karıştırılır. Peynir üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri üretim süresince artarlar ve üretimin başladığı birkaç saat içerisinde yoğunlukları 10^8 kob/g'a ulaşır. Starter kültürler hem mezofilik hem de termofilik olarak üretilen peynirin türüne göre kullanılırlar. En yaygın starter bakteri cinsleri *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* olarak bildirilmektedir (Beresford et al., 2001).

Peynir tiplerine göre değişmekle birlikte olgunlaşmanın başında 10^6 - 10^{10} kob/g seviyelerinde olan starter laktokokların sayısı genellikle 2-16°C'de gerçekleşen

olgunlaşmanın ilk haftalarında düşmektedir. Starter laktokokların sayısı; peynirdeki tuz, düşük pH, fermente edilebilen karbonhidratların yetersizliği ve düşük olgunlaşma sıcaklığı gibi nedenlerle azalmaktadır. Starter kültürlerin azalma oranı kültürlerin otolitik özellikleri, tuz toleransı ve fajlara direnç gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Gürsoy and Kınık, 2005). Bu faktörlerden tuzlama peynir kompozisyona ve olgunlaşmasına etki etmektedir. Genel olarak Beyaz peynirde salamurada yüksek tuz konsantrasyonu nedeniyle proteoliz yavaş seyretmektedir (Özer et al., 2006).

Ek kültürler peynire, asit oluşturmak dışındaki amaçlarla da katılan kültürler olup, olgunlaşmayı hızlandırmak, peynirde lezzeti arttırmak, lezzet oluşumunu hızlandırmak ve/veya probiyotik özellik kazandırmak amacıyla mezofilik ve termofilik starterlere ilave olarak kullanılabilir. Genellikle ilgili peynirin starter olmayan mikroflorasında da bulunabilen bu mikroorganizmalar çoğunlukla laktobasillerden oluşmaktadır (Wishah, 2007)

Laktobasiller gibi probiyotik mikroorganizmalarla üretilen süt ürünlerinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri, son yıllarda yeni bir araştırma alanının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Probiyotik bakteri kültürlerinin kullanımına başlanmasından bu yana bunların taşıyıcısı olarak kullanılan en popüler gıda sistemleri yoğurt ve fermente süt gibi taze fermente olmuş ürünler ya da yeterli sayıda canlı probiyotik kültür ilave edilmiş fermente olmamış ürünlerdir (Gürsoy ve Kınık, 2005; Kalavrouzioti et al., 2005).

Genel olarak laktobasiller sıcaklık, tuz, oksijen ve safra tuzlarına toleranslıdır. Suşların asitlik ve oksijen duyarlılıkları, süt bazlı ortamda iyi gelişebilme kapasitesi ile hızlı bir şekilde süt asitliğini geliştirme ve bu sayede de fermantasyon süresini kısaltma kapasiteleri üretimde önemli bazı karakteristikler olarak göze çarpmaktadır (Gomes and Malcata, 1998).

L. acidophilus'un Beyaz peynirde duyuşal niteliklere, olgunlaşma sürecine ve peynir kompozisyona katkısının ve bu peynirde canlı kalabilme yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada söz konusu probiyotiğın beyaz peynirlerde, aroma, tekstür ve proteolize önemli düzeyde katkıda bulunarak olgunlaşma periyodunun sonunda probiyotik etkilerini gösterebilecek düzeylerde canlı kalabildiği saptanmıştır (Wishah, 2007).

World Health Organization (WHO)'nun tanımına göre probiyotikler uygun miktarlarda kullanıldığında konak canlıya yarar sağlayan organizmalardır (FAO/WHO Report, 2001). Konu ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin birçok peynir çeşidinin üretiminde başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. Probiyotik bakterilerin ürünlere ilavesindeki başarı; kullanılan tür ve suş, üretiminde kullanılan laktik asit bakterilerinin aktivitesi, peynir kompozisyonu, üretim ve olgunlaşma koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005). Yararlı etkilerin görülebilmesi için gerekli olan minimum probiyotik mikroorganizma konsantrasyonu hala bilinmemek ile beraber, en az 10^7 kob/g veya mL seviyesinde canlı laktobasilin ortamda bulunması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, ürünün tüketilmesi esnasında en az 10^6 - 10^7 kob/mL'lik probiyotik popülasyonunun bulunması gerektiği ve ürünün günde 100 g'dan fazla tüketilmesi gerektiği de bildirilmektedir (Bergamini et al., 2005).

Kazein [süt proteinlerinin yaklaşık % 80'i (Kelly, 2007)] sütün içinde büyük ve multimoleküler agregat yapısında misel denem yapıları oluşturur. Kazein misellerini kazeinlerin küresel yapıda agregatları (α_1 -, α_2 -, β - ve κ -kazein) meydana getirir ve inorganik iyonlarla bağlanması ile koloidal kalsiyum fosfatlar oluşur (Lucey and Fox, 1993). Misel yapısında farklı kazeinler düzensiz bir şekilde dağılmış halde bulunur. Özellikle κ -kazein miselin yüzeyinde bulunmaktadır. κ -kazein miseli stabilize eder ve Ca^{+2} varlığında biraraya toplanmalarını engeller. κ -kazein peynir mayasının etkisi ile iki parçaya ayrılır. 1. ve 105. Aminoasitler arasında yer alan kısım (molekülün yaklaşık olarak dörtte üçü) hidrofobiktir ve diğer kazeinlerle temas halindedir. Diğer kısım (106-169 kısmı) yani κ - kazeinin C-terminal bölgesi hidrofiliktir ve peynir yapımı sırasında peyniraltı suyu aracılığı ile atılır. Sütün enzimatik koagülasyonu kazein misellerinin modifikasyonunu içerir. Bu modifikasyon rennet preparatlarındaki proteinazlar tarafından Phe₁₀₅ - Met₁₀₆ bağında sınırlı proteoliz ve bunu rennetin değiştirdiği misellerin Ca^{+2} indüklenmiş agregasyonu takip eder (Fox and McSweeney, 1997).

κ - kazein rennet koagülasyonunda hidrolize olan tek kazeindir. κ - kazein para- κ -kazein ve glikomakropeptidleri oluşturacak şekilde hidrolize olur. Mikropeptidler sıvı faza difüze olur, para- κ -kazein ise miselin ana yapısına bağlı olarak kalır. Mikropeptidler (κ - kazeinin yaklaşık % 30'u ya da toplam kazeinin % 4-5'idir) sıvı içerisinde kaybolur. Bu durum kaçınılmazdır ve rennet koagülasyonunun bir

sonucudur. Bu kayıp peynir verimi açısından önemlidir (Banks, 1987). Rennet preperasyonlarında proteinazlar tarafından κ -kazeinin proteolizi, rennet aktivitesinin birinci aşamasını oluşturmaktadır (McSweeney, 2007).

Mikropeptidlerin misellerden çıkması ile misellerin yüzey potansiyelleri $-20'$ dan $-10\text{mV}'a$ düşer ve sterik stabilize tabaka ortadan kalkar. κ - kazeinin % 85'i hidrolize olduğunda ise 18°C üzerinde ve Ca^{+2} varlığında koagüle olan miselin koloidal stabilitesi çok hızlı düşer. Bu olay ise rennet aktivitesinin ikinci aşaması olarak adlandırılır (McSweeney, 2007).

Özellikle peynir sütü zayıf rennet koagülasyonu ya da pıhtı oluşum karakteristiği gösterdiyse süte yaklaşık 0.2 g/L (örneğin yaklaşık 1.8 mM) seviyelerinde CaCl_2 eklenmesi sıklıkla kullanılan ticari bir uygulamadır. Sütün düşük protein seviyesine, sütün laktasyonun dönemine (Auld et al., 1998), 6.7 ve üzeri gibi yüksek pH'ya, sütün peynir üretiminden önce uzun süre düşük sıcaklıkta bekletilmesine, sütte yüksek somatik hücrenin varlığına (Auld et al., 1996), yüksek enzimatik aktiviteye ya da yüksek pastörizasyon sıcaklığına bağlı olarak sütün rennet koagülasyonunu zayıflatmaktadır (Fox and McSweeney, 1998). İyonik ve/veya misel yapıda kalsiyum seviyelerindeki düşüşü, kazeinin kazein miselinden seruma doğru geçişi, ve/veya kazeinin proteoz peptonlara ve somatik hücrelerin plazmin ve/veya proteinaz tarafından diğer çözümlü peptilere dönüşümü bu faktörlerden bazılarıdır. Çözümlü peptidler jel oluşumuna katkıda bulunmaz ve peynirde büyük ölçüde geri kazanılabilir değildir. Özellikle büyük süt işletmelerinde jel sıklığı ve jel sıkılaşması baz alındığından koagülasyon özelliklerinin bozulması peynir üretiminde istenmeyen bir durumdur (Guinee, 2007).

Peynir sütüne CaCl_2 eklenmesi genelde rennet koagülasyon özelliklerini geliştirmekte, rennet jelleşme süresini kısaltmakta ve pıhtı sıkılaşma oranını ve pıhtı sıklığını artırmaktadır. Peynir üretim protokolüne bağlı olarak, CaCl_2 eklenmesi peynirdeki yağ seviyesini ve verimini artırır. CaCl_2 'ün rennet koagülasyon özellikleri üzerine pozitif etkileri peynir sütünün aşağıdaki etkilerine bağlıdır;

- İyonik (Ca^{+2}) ve koloidal kalsiyum fosfat konsantrasyonunun artırılması (Lucey, 2002),

- pH düşüşü hidrojen iyon aktivitesinin artışıyla sonuçlanmasının, sodyum fosfat tuzları ile birlikte bazı Ca^{+2} iyonlarının eklenmesi olduğu düşünülmektedir (Guinee, 2007).

Peynir biyolojik ve biyokimyasal açıdan dinamik bir üründür. Bunun sonucu olarak stabil olmayan bir yapıya sahiptir. Peynirin olgunlaşması sürecinde, kompleks yapıda birçok biyokimyasal reaksiyon gerçekleşir. Bunlardan başlıcaları; (1) Peynirde kalan laktozun glikolize ve laktatın katabolize olması, (2) sitratın katabolize olması, (3) lipoliz, (4) proteoliz ve (5) amino asitlerin katabolize olmasıdır (McSweeney, 2004).

Gelişen ve değişen dünyaya uyum sağlayabilmek amacı ile genetik olarak tanımlamada hızlı, pratik ve doğruluğu-güvenirliği yüksek tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tekniklerden en önemlilerinden biriside Polimeraz Zincir Reaksiyonudur. Teknik ilk bulunduğu 1985 yılından itibaren hızlı bir gelişme göstermiştir (Mullis, 1990). PZR *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Saiki et al., 1985).

PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.

DNA Zincirinin Açılması (Denaturation): Kalıp DNA (template DNA), 92-95°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır (Hadidi et al., 1995).

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir (Innis and Gelfand, 1990).

Primer Uzaması (Primer Extension): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (*Taq* DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır (Chesters, 1996).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYALLER

3.1.1. Çiğ Süt

Çalışmada Ankara Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Haymana Araştırma-Uygulama Çiftliđi'nden sağlanan inek sütleri kullanılmıştır. Sağımdan hemen sonra süzölerek soğutulan sütler, üretimin yapılacağı A.Ü. Ziraat Fakóltesi Süt Teknolojisi Bölümü Eğitim Araştırma ve Uygulama İşletmesi'ne getirilerek peynir yapımı gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kólterler

Araştırmada, CHR. HANSEN'S (Danimarka) firmasının liyofilize formdaki mezofilik homofermentatif R-707 ticari kodlu starter kólteründen yararlanılmıştır.

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus plantarum* BG33 ve *Staphylococcus aureus* ATCC6538 bakteri kólterü Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Akçelik'ten temin edilmiştir.

3.1.3. Peynir Katkıları

3.1.3.1. Kalsiyum Klorür

Çalışmada kullanılan CaCl_2 Merck (Darmstadt, Almanya) firmasının 102392 katalog numaralı ürünü kullanılmıştır.

Peynir yapım aşamasında süte % 40'lık kalsiyum klorür çözeltilisinden % 0.02 oranında katılmıştır.

3.1.3.2. Peynir Mayası-Rennet

Araştırmada "Peyma-Chr.Hansen's Peynir Mayası San. Ve Tic. A.ř." firmasının ürettiği "Mandra" ticari isimli ve etiketinde 1/16.000 kuvvetinde olduğu belirtilen dana şirdeninden elde edilen sıvı peynir mayası kullanılmıştır.

3.1.3.3. Tuz (NaCl)

Peynirlerin ilk ve ambalajlama salamuralarında granöl formdaki ticari kaya tuzu kullanılmıştır.

3.1.3.4. Salamura

Peynirlerin tuzlanmasında, farklı tuz konsantrasyonlarına sahip ve 85°C'de 30 dakika pastörize edilen salamuralar kullanılmıştır.

3.1.4. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri; Tryptic Soy Agar (TSA) Bölüm 4.1'de, Tryptic Soy Broth (TSB) Bölüm 4.2'de, Baird Parker agar (BPA) Bölüm 4.3'te, de MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) Broth Bölüm 4.4'te, de MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) Agar Bölüm 4.5'te gösterilmiştir. Ayrıca kurumaddesi %10'luk şekilde hazırlanan rekonstitüye süt laktik asit bakterilerinin canlandırılması için kullanılmıştır. Bu besiyerlerinin hazırlanışı ve kullanımı aşağıda verilmektedir.

3.1.4.1. Tryptic Soy Broth (TSB)

Çalışmada kullanılan Tryptic Soy Broth (TSB) Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.05459.0500 katalog numaralı Tryptic Soy Broth (TSB) kullanılmıştır. Bu besiyerinin bileşimi; kazein peptonu (17.0 g/L), soya peptonu (3.0 g/L), D (+) glukoz (2.5 g/L), NaCl (5.0 g /L), K₂PO₄ (2.5 g/L) olarak verilmiştir. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 25°C'de 7.3 ± 0.2'dir.

Hazır olarak elimizde bulunan karışımdan 1000 mL saf su içerisine 30 g besiyeri tartılıp eklenmiştir. Çözündürebilmek amacı ile karıştırılan karışım gerekli olan miktarlarda tüplere aktarılmış ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan malzemeler oda sıcaklığına geldikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.4.2. Tryptic Soy Agar (TSA)

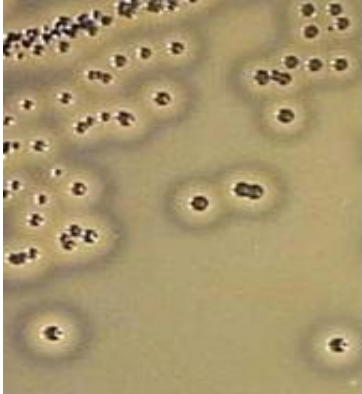
Çalışmada Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.05458.0500 katalog numaralı Tryptic Soy Agar (TSA) kullanılmıştır. Bu besiyerinin bileşimi; kazein peptonu (15.0 g/L), soya peptonu (5.0 g/L), NaCl (5.0 g/L), agar (15.0 g/L)'dir. Hazırlanan agarın pH'sı 25°C'de 7.3 ± 0.2'dir.

Hazır karışımdan 40 g tartılıp üzerine 1000 mL damıtık su eklenmiştir. Katı partiküllerin kalmaması ve homojen bir karışımın sağlanabilmesi için kaynar su banyosunda çözündürülen karışım 15 dakika 121°C'de sterilize edilmiştir.

3.1.4.3. Baird Parker Agar (BPA)

Çalışmada Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.05406.0500 katalog numaralı Baird Parker Agar kullanılmıştır. Bu besiyerinin bileşimi; kazein peptonu (10.0 g/L), et özütü (5.0 g/L), maya özütü (1.0 g/L), sodyum pirüvat (10.0 g/L), glisin (12.0 g/L), lityum klorür (5.0 g/L), agar (15.0 g/L)'dir.

58.0 g dehidre besiyeri 950 mL damıtık su ile karıştırılarak 1-2 dakika kaynatılarak tümüyle çözdürülmüş ve otoklavda 121°C'da 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bazal besiyeri 45°C sıcaklığa soğutulduktan sonra karıştırmaya devam edilerek üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 mL steril yumurta sarısı – tellurit emülsiyonu ilave edilip, Petri kaplarına dağıtımı yapılmıştır (ISO/FDIS, 2003). Hazırlanan agarın pH'sı 25°C'de 7.3 ± 0.2 'dir. Baird Parker Agar üzerine yapılan ekimler sonrasında koloni görüntüsü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. *S.aureus*'un BPA üzerindeki koloni ve zon görüntüsü

S. aureus, Baird Parker agarda siyah renkli şeffaf zonlu koloniler oluşturmaktadır.

3.1.4.4. de MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) Broth

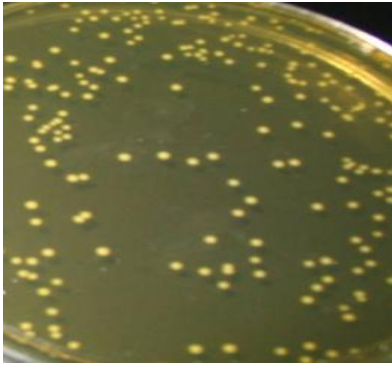
Çalışmada Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.10661 katalog numaralı MRS kullanılmıştır. Bu besiyerinin bileşimi; kazein peptonu (10.0 g/L), et özütü (8.0 g/L), maya özütü (4.0 g/L), D(+) glukoz (20.0 g/L), K_2HPO_4 (2.0 g/L), Tween 80 (1.0 g/L), di-Amonyum hidrojen sitrat (2.0 g/L), sodyum asetat (5.0 g/L), $MgSO_4$ (0.2 g/L), $MnSO_4$ (0.04 g/L)'dir.

Dehidre besiyeri 52.2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilmiş ve otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edildikten ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanmış olan besiyerinin 25°C'da pH'sı 5.7±0.2'dir.

3.1.4.5. de MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) Agar

Çalışmada Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.10660.0500 katalog numaralı MRS Agar kullanılmıştır. Bu agarın bileşimi; kazein peptonu (10.0 g/L), et özütü (10.0 g/L), maya özütü (4.0 g/L), D (+) Glucose (20.0 g/L), K₂HPO₄ (2.0 g/L), Tween 80 (1.0 g/L), di-Amonyum hidrojen sitrat (2.0 g/L), sodyum asetat (5.0 g/L), MgSO₄ (0.2 g/L), MnSO₄ (0.04 g/L), agar-agar (14.0 g/L) şeklindedir.

Dehidre besiyeri 68.2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası 45-50°C'a soğutulup, steril Petri kaplarına ilave edilmiştir (MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960). Hazırlanmış olan besiyerinin 25°C'da pH'sı 5.7±0.2'dir. Laktik asit bakterilerinin MRS agardaki görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. *L. plantarum*'un MRS agardaki koloni görüntüsü

L. plantarum, MRS agarda koyu sarı renkli koloniler oluşturmaktadır.

3.1.4.6. Yağsız Süt Tozu ve Rekonstitüye Süt

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvancılık İşletmesi'nden alınan yağsız süttozu kullanılarak, 10 g yağsız süt tozu üzerine 90 mL damıtık su eklenerek kurumadesi % 10 olan 100 mL'lik rekonstitüye süt elde edilmiştir. Elde edilen süt otoklavda 120°C'de 2 dakika sterilize edilmiştir. Sütün sıcaklığı, ekim için optimum sıcaklık değeri olan 37°C'ye düşürülmüş ve *L. plantarum*

inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. Jelleşme oluştuktan sonra kültür, sayıma ve peynir yapımı için ekime hazırlanmıştır.

3.1.5. Besiyeri Katkıları

3.1.5.1. Pirüvik Ait Sodyum Tuzu (Pirüvat)

Çalışmada Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.06619.0050 katalog numaralı molekül ağırlığı 110.04 g/mol olan pirüvik asit sodyum tuzu ($C_3H_3NaO_3$) kullanılmıştır.

Hazır olarak elimizde bulunan bu tuzdan 5 g tartılıp 1000 mL damıtık suya eklenmiştir. Hazırlanan çözelti istenilen miktarda tüplere dağıtılıp 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve *S. aureus* için selektivite ajanı olarak kullanılmıştır.

3.1.5.2. Yumurta Sarısı-Tellürit Emülsiyonu

Çalışmada Merck (Darmstadt, Almanya) markalı 1.03785.0001 katalog numaralı Yumurta Sarısı-Tellürit Emülsiyonu kullanılmıştır. Bu emülsiyonun bileşiminde NaCl (4.25 g) ve potasyum tellürit (2.1 g) yer almaktadır.

200 mL steril yumurta sarısı, 4.25 g NaCl ve 2.1 g potasyum tellürit ile karıştırılıp üzerine 1 L'ye tamamlayacak kadar steril damıtık su eklenmiştir. Sterilize 50 mL şişe içeriği; 950 mL olarak hazırlanıp sterilize edilen ve otoklav sonrası 45°C'a soğutulan Baird Parker Agar besiyerine (Katalog No: Merck 1.05406.0500) iyice çalkalandıktan sonra ilave edilmiştir. Sıcaklık farkından dolayı bölgesel jelleşmeleri önlemek için ilave öncesi materyalin oda sıcaklığına getirilmesi gereklidir.

3.1.6. Tamponlar ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin bileşimi ve hazırlanışları aşağıda gösterilmiştir.

3.1.6.1. Lambda Tamponu

Çalışmada kullanılan Lambda tamponunun bileşimi NaCl (5.8 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2.0 g/L), 1 M Tris – HCl çözeltisi (13.0 g/L) (pH:7.5), jelatin (0.1 g/L)'dir. Bileşenleri 1000 mL damıtık su içerisinde çözündürüldükten sonra tüplere dağıtılarak otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir. +4°C'de

muhafaza edilen çözelti kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir Lambda tamponu hazırlanan dilüsyonlar için kullanılmıştır (Taban, 2007).

3.1.6.2. 10 mM Tris- HCl Çözeltisi

1.211 g Tris 1 L suya eklenerek hazırlanan çözeltinin pH'sı HCl çözeltisi ile 8.0'e ayarlanmıştır. Tüplere gerekli miktarlarda dağıtılarak otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilen çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Taban, 2007). Hazırlanan bu tampon lizozim çözeltisinde kullanılmıştır.

3.1.6.3. 10 g/mL Lizozim Çözeltisi

0.01 g lizozim 1 mL steril 10 mM Tris –HCl çözeltisi (pH: 8.0) içerisinde çözündürülmüştür. Ardından steril mikrosantrifüj tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmiş ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir (Taban, 2007). Lizozim çözeltisi PZR işleminden önce yapılan DNA izolasyon ve saflaştırma işleminde hücre zarının parçalanması için kullanılmıştır.

3.1.6.4. 0.5 M Na₂EDTA (Disodyum etilendiamin tetraasetik asit) Çözeltisi

Çalışmada kullanılan Na₂EDTA – 2H₂O çözeltisinin hazırlanması için 186.12 g Na₂EDTA – 2H₂O 1 L damıtık suda çözündürülüp pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'a ayarlanmıştır. Cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilen çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Bu bileşim Tris-Borik asit-EDTA tamponu için hazırlanmıştır (pH: 8.0) (Taban, 2007).

3.1.6.5. Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu (10X)

Çalışmada kullanılan Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponunun (10X) hazırlanmasında; 108.0 g Tris, 55.0 g borik asit, 40 mL 0.5 M Na₂EDTA çözeltisi karıştırılıp, 1000 mL damıtık su içerisinde çözündürülmüştür. Tampon kullanım anına kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Taban, 2007). Bu tampon PZR işleminden sonra yapılan agaroz jel elektroforez işleminde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.1.6.6. Butterfield's phosphate (BFP)

Çalışmada kullanılan Butterfield's phosphate (BFP) hazırlanmasında, 34.0 g KH_2PO_4 500 mL damıtık suda çözündürülmüştür. Hazırlanan stok çözeltinin pH'sını 7.2' ye ayarlayabilmek için yaklaşık olarak 175 mL 1N NaOH eklenmiştir. pH'sı ayarlanan çözelti üzerine toplam hacim 1000 mL olacak şekilde damıtık su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilmiştir. Elde edilen çözelti +4°Cde saklanmıştır

3.1.7. Boya Çözeltileri

3.1.7.1. 1 mg/mL Etidyum Bromür Çözeltisi

Çalışmada kullanılan Etidyum Bromür Çözeltisi; 1 g etidyum bromür 1 L damıtık su içerisinde çözündürüldükten sonra steril mikrosantrifüj tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılır. Tüpler +4°C sıcaklıkta ve karanlıkta muhafaza edilmelidir (Taban, 2007).

3.1.7.2. 6X Yükleme Boyası Çözeltisi

Çalışmada kullanılan 6X Yükleme Boya Çözeltisi hazırlanmasında; 10 mM Tris-HCl, % 0.03 bromfenol mavisi (v/v), % 0.03 ksilen siyanol FF (v/v), % 60 gliserol (v/v), 60 mM EDTA çözeltisi içermektedir. Çözelti -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmeli ve kullanım öncesi +4°C sıcaklıkta çözündürülmüştür (Taban, 2007).

3.1.8. DNA İzolasyonu ve Saflaştırma Kiti

Çalışmada kullanılan Roche (Basel, İsviçre) markalı 11 796 828 001 katalog numaralı high pure PCR template preparation (HPPTP) kiti nin içeriği ve içeriğindeki tampon ve çözeltilerin hazırlanış şekilleri aşağıda verilmektedir.

3.1.8.1. High Pure PCR Template Preparation Kit

Çalışmada kullanılmış olan High Pure PCR Template Preparation Kiti (HPPTP) ve Kitin içeriği aşağıda verilmiştir (Taban, 2007):

Doku Eritme Tamponu (pH: 7.4) (20 mL) : Üre, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Bağlama Tamponu (pH: 4.4) (20 mL) : 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 triton X-100 (v/v) içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Proteinaz K (100 mg) : 4.5 mL ultra saf su ile karıştırılarak çözelti haline getirilmiş ve çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Kullanım öncesinde ise +4°C'de çözündürülmüştür.

İnhibitör Uzaklaştırma Tamponu (pH: 6.6) (33 mL) : 20 mL saf etanol ile karıştırılarak kullanılmıştır. Bu durumda, 5 M guanidine-HCl ve 20 mM Tris-HCl içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Yıkama Tamponu (pH: 7.5) (20 mL) : 80 mL saf etanol ile karıştırılarak kullanılmıştır. Tampon, 20 mM NaCl ve 2 mM Tris-HCl içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Ayırma Tamponu (pH: 8.5) (40 mL) : 10 mM Tris içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Steril Filtre Başlık (100 adet), 2 mL'lik steril toplama tüpü (400 adet)

3.1.9. PZR Yöntem ve Düzenneği

İzolasyon ve saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen bakteri DNA'larını çoğaltabilmek ve PZR gerçekleştirebilmek için MWG-Biotech (Ebersberg, Almanya) firmasından temin edilen Inc Primus 96 Thermal Cycler kullanılmış ve Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. MWG-Biotech (Ebersberg, Almanya) Inc Primus 96 Thermal Cycler

3.1.10. Oligonükleotidler

Çalışmada kullanılan oligonükleotidlerden ileri ve geri primerlerin özellikleri aşağıdaki verilmiştir

İleri primerin dizilişi 5'-AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA-3' şeklindedir. GC içeriği ise % 40 oranındadır. Bu primerin saflaştırma işlemi HPLC (High-performance liquid chromatography) cihazı ile yapılmıştır. İleri primer olan nuc-F166 M_A (molekül ağırlığı) 6094 g/mol'dür ve 13.6 nmol 83.1 µg gelmektedir. 20 baz uzunluğundadır. T_m (erime sıcaklığı) ise 54°C'dir

Hazırlanışı: nuc-F166 ileri primeri liyofilize halde bulunmaktadır ve 136 µL ultra saf su ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 50 µL alınıp üzerine 200 µL ultra saf su eklenip ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Çözelti -18°C'de muhafaza edilmiş, kullanım öncesinde +4°C'de çözündürülmüştür.

Geri primerin dizilişi 5'-TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT-3' şeklindedir. GC içeriği ise % 50 oranındadır. T_m sıcaklığı 58°C olan primerin saflaştırma işlemi HPLC cihazı ile yapılmıştır. İleri primer olan nuc-R565 M_A 6086 g/mol'dür ve 14.0 nmol 85.3 µg gelmektedir. Ayrıca geri primer 20 baz uzunluğundadır.

Hazırlanışı: nuc-R565 geri primeri liyofilize halde bulunmaktadır ve 140 µL ultra saf su ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 50 µL alınıp üzerine 200 µL ultra saf su eklenmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Çözelti -18°C'de muhafaza edilmiş, kullanım öncesinde +4°C'de çözündürülmüştür.

3.1.11. Agaroz Jel Elektrofrez ve İşlem Düzenegi

Yaptığımız çalışmada agaroz jel elektrofrez işlemi için Serva (Heidelberg, Almanya) markalı BlueMarine 100 ve BlueMarine 200 yatay elektrofrez tankları ve bu tanklara uygun ebatlardaki jel tablaları kullanılmıştır. Bu jelde kuyucuklar oluşturabilmek amacıyla taraklar ile birlikte BioRad (California, Amerika) markalı PowerPac Basic güç kaynağı kullanılmıştır.

3.1.11.1. %1.5'lik Agaroz Jel (w/v)

Çalışmada kullanılan % 1.5'lik Agaroz Jel (w/v) hazırlanmasında, 1.5 g agaroz üzerine TBE tamponu (1X) ilave edilerek toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Agaroz çözeltilinde agaroz jelin tamamen çözünmesi amacıyla kaynama sıcaklığına kadar ısıtılmış ve işlem tamamlandıktan sonra 60°C'ye soğutulmuştur. Çözeltiye 1 mg/mL etidyum bromür çözeltisinden 3 µL eklenmiştir. Çözelti karıştırılarak, katılaşmasına izin vermeden uygun ebatta jel tablasına dökülmüştür (Taban, 2007).

3.1.12. Jel Görüntüleme İşlemi Deney Düzeneği

Çalışmada Syngene (Cambridge, İngiltere) markalı InGenius jel görüntüleme ve analiz sistemi kullanılmıştır. Jel görüntüleme ve analiz sistemleri; karanlık oda, yüksek performanslı dijital fotoğraf makinası, UV emisyon filtresi ile filtre kabini ve 302 nm'lik dalga boyunda çalışan UV translüminatöründen oluşmaktadır. Syngene (Cambridge, İngiltere) markalı InGenius jel görüntüleme sistemi Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Syngene (Cambridge, İngiltere) InGenius Jel Görüntüleme Sistemi

3.2. METOT

Araştırmada gıdalardan izole edilmiş ve ülkemizden izole edilen *L. plantarum* BG33 bakterisinin *S. aureus* ATCC6538 suşuna karşı antimikrobiyel aktivitesini gözlemleyebilmek amacıyla öncelikli olarak peynir içerisine eklenecek olan *S. aureus* patojen bakterisinin kültürel sayımı yapılmıştır. *S. aureus* sayısı bilinen kültür pastörize süte eklendikten sonra, *L. plantarum*'un rekonstitüye süt içerisinde canlandırma işlemi gerçekleştirilmiş ve *L. plantarum* süte eklenmiştir. Peynirin yapımı için gerekli bileşenler eklenmiş ve belirli noktalardan örnekler alınmıştır. Alınan tüm rnekler DNA saflaştırma ve izolasyon işlemi ile birlikte içerisindeki *S. aureus* patojeninin hedef DNA'ları elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra PZR işlemi ile birlikte hedef DNA'lar oğaltılmış ve doğrulama işlemi yapılmıştır.

Çalışmanın son bölümünde ise elde edilen veriler kullanılarak istatistiksel analizler yapılıp *L. plantarum*'un *S. aureus* zerindeki antimikrobiyel etkisi hakkında değeriendirmeye gidilmiştir.

3.2.1. *S.aureus*'un Kültürel Sayımı ve Süte Ekleme Amacı ile Hazırlanması

Çalışmada, saf olarak temin edilmiş *L. plantarum*'un *S. aureus* zerindeki olan antimikrobiyel etkisini saptayabilmek amacı ile *S.aureus* bakterisinin kültürel sayımı yapılmıştır. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen *S. aureus* 37°C sıcaklıkta 24 saat ara pasajları yapılarak aktif hale getirilmiştir. Daha sonra içerisinde 42 mL TSB bulunan yaklaşık 25 adet santrifüj tüpüne, 24 saat sonrasında inkübasyondan alınan kültürlerden 5 mL eklenmiştir. Santrifüj tüpleri 24 saat 37°C'deki etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda tüpler santrifüj cihazına yerleştirilip 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan süpernatant bir kavanoza dklerek kalan pellet üzerine 2 mL BFP eklenmiş ve tüplerde bakteri *S. aureus* kalmayacak ve kayıp en az olacak şekilde yıkanmıştır. Bu karışımlar tek bir tüpte toplanmıştır. Bu karışımdan kültürel sayım yapabilmek için 1 mL alınıp TS agara ekim yapılmıştır. Etve alınan TS agar 24 inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında sayım alınıp süt içerisine ne kadar eklendiği bulunmuştur. 1 mL alındıktan sonra geriye kalan karışıma santrifüj işlemi uygulanıp pastörize süt içerisine eklenmiştir. Normal olarak adlandırılan bu karışımından 1 mL alınarak, içerisinde 9 mL BFP bulunan tüplere eklenmiştir. Kültürün seri dilüsyonları hazırlanıp 3'l ekimleri yapılarak

sayımları gerçekleştirilmiştir. Kültürel sayım amacı ile 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} ve 10^{-11} dilüsyonlarından yüzeye yayma yöntemi ile 3'erli ekim yapılmıştır. Petriler 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda *S. aureus* sayısı alınmış ve süte eklenmiş olan *S. aureus* sayısı bulunmuştur.

1. Tekerrür için,

$$C_2 = 1.75 \times 10^7 \text{ EMS/mL } S. aureus$$

2. Tekerrür için,

$$C_2 = 1,2 \times 10^6 \text{ EMS/mL } S.aureus$$

Tekerrürlerin ortalaması alınmıştır, sonuç olarak süte eklenen *S. aureus* miktarı 9.4×10^6 EMS/mL olarak bulunmuştur.

3.2.2. *L.plantarum*'un Canlandırılması ve Süte Eklenmesi Amacıyla Hazırlanması

Çalışmada çiğ süt yerine standart bileşim elde edebilmek amacıyla rekonstitüye süt kullanılmıştır. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvancılık İşletmesi'nden alınan yağsız süttozu kullanılarak kurumaddesi % 10 olacak şekilde 300 mL (30 L pastörize süte katılacak şekilde) süt elde edilmiştir. Rekonstitüye süt 120°C 'de 2 dakika otoklavda sterilize edilmiştir ve 37°C sıcaklığa soğutulmuştur. *L. plantarum* ise 24 saat öncesinde canlandırmak amacıyla, -18°C 'de muhafaza edilen stok kültürden öze yardımıyla MRS besiyerine ekim yapılmış, 24 saat boyunca 37°C 'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen rekonstitüye süte laktik asit bakteri kültüründen % 1 oranında (3 mL) inoküle edilmiş 37°C 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında pıhtılaşma oluşmasıyla birlikte laktik asit bakterileri kültürel sayım ve peynir yapımı için hazır hale getirilmiştir. Sayım için hazırlanan kültürden 1 mL alınmış, geriye kalan kısım ise peynir yapımı için kullanılacak olan süte eklenmiştir. Sayım için içerisinde 9 mL BFP bulunan tüpe rekonstitüye süte hazırlanmış olan kültürden 1 mL eklenerek 10^{-1} 'den başlayarak 10^{-11} 'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. *L. plantarum* sayımı için MRS agara dilüsyonlarının her birinden dökme plak yöntemiyle paralelli ekimler yapılmıştır. 37°C 'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında Petrilerdeki koloniler sayılarak sonuç kaydedilmiştir.

İnkübasyon sonunda LAB sayımı gerçekleştirdikten sonra geriye kalan kısmının tamamı ise, Beyaz peynir yapım aşamasında örnek grubuna eklenmiştir.

3.2.3. Peynir Üretimi

Çalışmada peynir yapımında kullanılan *L. plantarum*'un peynirin üretimi ve depolanması sırasında patojen bir bakteri olan *S. aureus* üzerine etkilerini inceleyebilmek için deneysel bir ortam hazırlanmıştır ve peynir yapımının tüm aşamaları Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

Beyaz peynir üretimi, A.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Eğitim Araştırma ve Uygulama İşletmesi'nde yer alan pilot peynir üretim düzeneklerinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

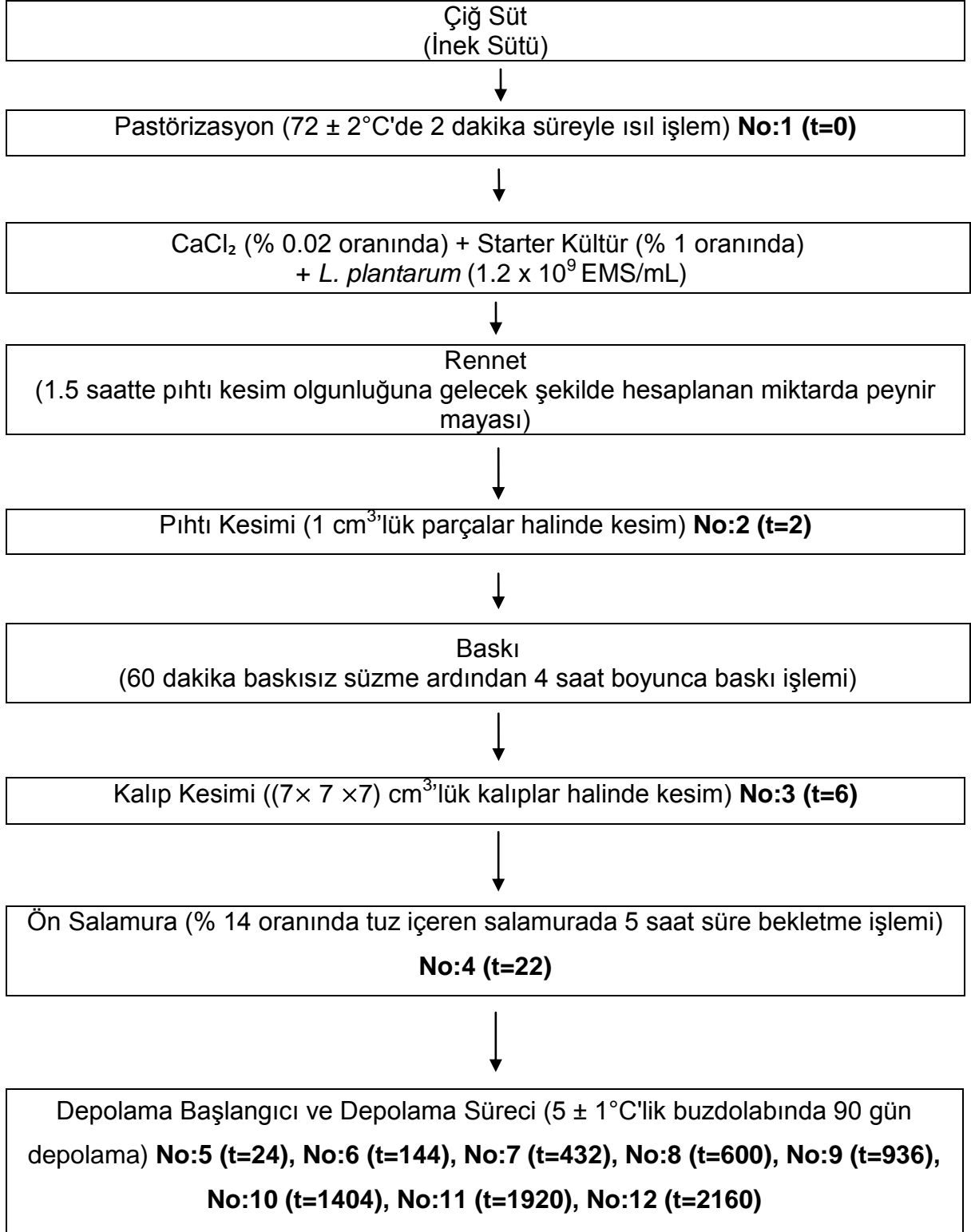
Hayvancılık işletmesinden güğümlerle getirilen inek sütü süzöldükten sonra tanka aktarılmış ve iyice karıştırılmıştır. 60 L inek sütü vakit kaybetmeden çift cidarlı tankta süt $72 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 2 dakika süreyle ısıtılarak işlem uygulandıktan sonra mayalama sıcaklığına ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) soğutulmuştur. Daha sonra süt 2 ayrı mayalama kazanına aktarılmıştır. Bu işlemin amacı deneyin örnek grubu ve kontrol grubu olarak yürütülecek olmasıdır. Sütün 2 gruba ayrılmasından sonra peynir yapımı için gerekli bileşenler ilave edilmiştir. Peynirde rennet koagülasyon özelliklerini geliştirebilmek, rennet jelleşme süresini kısaltmak ve pıhtı sıkılaşma oranını ve pıhtı sıkılığını arttırabilmek için % 0.02 oranında CaCl_2 ve % 1 oranında starter kültür eklenmiştir. Kontrol grubunun (30 L pastörize süt) içine *L. plantarum* eklenmeden, sadece 9.4×10^6 EMS/mL *S. aureus* inokülasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir. Örnek grubuna (30 L pastörize süt) ise daha önce hazırlanmış olan *L. plantarum*' dan 1.2×10^9 EMS/mL ve 9.4×10^6 EMS/mL düzeyinde *S. aureus* inokülasyonu yapılarak peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. 30 L süte 9.4×10^6 EMS/mL düzeyinde *S. aureus* inokülasyonu yapılmıştır. Kontrol grubu, örnek grubunda elde edilecek sonuçların karşılaştırılabilmesi ve sonuçların değerlendirilebilmesi amacıyla yapılmıştır. Ön olgunlaştırması tamamlanan sütlere 1.5 saatte pıhtı kesim olgunluğuna gelecek şekilde hesaplanan miktarda peynir mayası ilave edilmiştir. 1.5 saatlik süre sonunda pıhtı, 1 cm^3 'lük parçalar halinde kesilip içerisinde cendere bezi bulunan kalıplara aktarılmıştır. 60 dakika süreyle baskısız süzmeyi takiben ortalama 4 saat baskılı süzme işlemi sonrasında baskı işlemine alınır. Baskı sonun telemeler $7 \times 7 \times 7$ cm enindeki mastarla kareler

halinde kesilip, % 14 oranında tuz içeren salamurada 5 saat süreyle tuzlanmaya bırakılmıştır. Salamuradan çıkarılan peynirler 50 - 65 °SH (% laktik asit cinsinden süt asitliği) asitliğe gelinceye kadar ortam sıcaklığında bekletilip, ayrılan peyniraltı suyunun uzaklaştırılması sağlandıktan sonra plastik kutulara yerleştirilmiştir. Üzerlerine % 10 tuz içeren salamura konulmuş ve hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Daha sonra plastik kutular +4°C sıcaklıkta soğuk hava depolarına konularak üç ay süreyle olgunlaştırmaya alınmıştır.

3.2.4. Peynir Örneklerindeki *S. aureus* ve Laktik Asit Bakteri Sayımı

Örnekler peynir yapımı bölümünde de açıklandığı gibi Örnek (*L. plantarum* + *S. aureus* içeren) ve Kontrol (sadece *S. aureus* içeren) olmak üzere hazırlanmıştır. Pastörizasyon, pıhtı oluşumu, kalıp kesimi ve ön salamura çıkış sonrasında örnekler alınırken, depolama başlangıcı dahil olmak üzere 3 aylık süre boyunca belirli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve sayım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Peynir sütü ve peynir örneklerinden, örnekleri homojen şekilde temsil edebilecek olan her iki gruptanda da (örnek, kontrol) 25 g-mL peynir örneği alınıp steril Stomacher torbalarına konulmuş ve üzerlerine 225 mL BFP eklenmiştir. Stomacher'a yerleştirilen torbalar 1 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Sonrasında 9 mL BFP içeren tüplerde 10^{-7} seviyesine kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Laktik asit bakteri sayımı için bu dilüsyonlardan içerisinde MRS agar bulunan Petrilere dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Örnekler 37°C sıcaklıkta 18-24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. 37°C sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyon süresi sonunda Petrileredeki koloni sayım sonucu kaydedilmiştir. Diğer taraftan örneklerdeki *S. aureus* bakteri sayımı amacıyla hazırlıklar yapılmıştır. *S. aureus* bakteri sayımı için U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual (2001)'in önerdiği 5'li tüp EMS yöntemi kullanılmıştır. Örnekten elde edilen dilüsyonların her birinden % 1 (1 litresinde 10 gram olacak şekilde) selektivite ajanı olan piruvat (Merck) ve % 10 (1 litresinde 95 gram olacak şekilde) tuz ilaveli içerisinde 7 mL TSB bulunan 5 tüpe 1'er mL aktarım yapılmıştır. Örnekler 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

Peynir Üretim Aşaması Akım Şeması



t saat cinsinden verilmiştir

Şekil 3.3 Peynir Üretim Basamakları ve Örnek Alım Noktaları

İnkübasyon sonrasında bulanık olan tüpler pozitif olarak işaretlenmiştir. İnkübasyonun ardından pozitif olarak işaretlenen tüplerden steril öze ile tek koloni düşürme yöntemi kullanılarak BPA'ya ekim yapılmıştır. 37°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmalarının ardından tipik koloniler (parlak ve mat zon yapmış siyah renkli *S. aureus* kolonileri) TS besiyerine aktarılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda örnekler hazır hale getirilmiştir. PZR ile doğrulaması yapılan örneklerin tüpleri EMS tablosu (Ek-1) kullanılarak değerlendirmeye alınmış ve sonuçlar bulunmuştur.

3.2.5. DNA İzolasyonu ve Saflaştırma İşlemi

DNA izolasyonu ve saflaştırma işlemi peynir yapımı ve depolama sırasında alınan örneklerdeki *S. aureus* bakterilerinin DNA'larının PZR işlemine hazırlanması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın DNA izolasyonu ve saflaştırma işlemi sırasında High Pure PCR Template Preparation (HPPTP) Kiti kullanılmış ve uygulanması gereken basamaklar bu kitin prospektüsüne göre yapılmıştır. TSA'da geliştirdiğimiz bakteri kültüründen öze yardımı ile bakteriler toplanarak 200 µL Lambda tamponun içerisine eklenmiştir. Hemen ardından 5 µL lizozim çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 200 µL bağlama tamponu (pH:4.4) ve 40 µL proteinaz K çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen çözelti 10 dakika boyunca 70°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan tüpe 100 µL izopropanol eklenip karıştırılan çözelti alt tarafında filtresi bulunan 2 mL'lik toplama tüpüne aktarılmıştır 9162 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonrasında filtreli tüp başka bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 500 µL inhibitör uzaklaştırma tamponu (pH:6.6) eklenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. 1 dakika boyunca 9175 rpm'de santrifüj edilen çözeltinin filtre tüpü alınıp yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Üzerine 500 µL yıkama tamponu (pH:7.5) eklenen tüp tekrar 9175 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Yeni bir toplama kabına alınan filtreli tüp üzerine yeniden 500 µL yıkama tamponu (pH:7.5) eklenmiş ve 9175 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında üst sıvı uzaklaştırılmış ve filtreli tüp tekrar aynı toplama kabına yerleştirilmiştir. 11696 rpm'de 10 saniye santrifüj işlemi uygulanan filtreli tüp alınıp 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Üzerine pH'ı 8.5 olan 200 µL

70°C sıcaklıkta bekletilen ayırma tamponu eklenmiştir. 9175 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanan çözelti bu kez alttaki 1.5 mL'lik tüpte toplanmıştır. Toplanan bu sıvı istenen hedef DNA'lardır. Elde edilen bu DNA'lar -20°C'de ileriki aşamalar için saklanmıştır (Taban, 2007).

3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmanın bu bölümünde yapılan PZR işleminin amacı; *S. aureus* bakterisin DNA'sının HPPTP ile izole edilip saflaştırdığımız örneklerin belirlenmiş olan *nuc* geninin 400 bç'lik bölgesini çoğaltıp bu bakterinin doğrulamasını yapmaktır.

Araştırmada kullanılan dNTP'lerin (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) her birinin ticari olarak hazır halde satılan nükleotid karışım çözeltileri kullanılmıştır.

PZR işleminde örnekleri hazırlayabilmek amacıyla çevreden meydana gelebilecek kontaminasyonu önlemek için çalışmalar çeker ocak altında yapılmıştır. Örnek sayıları dikkate alınarak Eppendorf tüpleri alınıp tüplerin her birine 15.3 µL ultra saf su eklenmiştir. Ultra saf su üzerine 0.5 µL dNTP PZR nükleotid karışım çözeltisi eklenmiştir. Bu karışımın üzerine her bir Eppendorf tüpüne 5 µL MgCl₂ içerikli 10X PZR tamponu ilave edilmiştir. Bu aşamadan sonra tekrar her tüpe *nuc*-F166 ileri ve *nuc*-R565 geri primerlerinin herbirinden 0.5 µL eklenmiştir. Son olarak tüplere hedef DNA ve primeler arasında oluşabilecek özgün olmayan bağlanmaların *Taq* DNA polimeraz enzimi ile uzatılmasını önlemek amacı ile 75°C'nin altındaki sıcaklıklarda inaktif halde bulunan ancak 95°C'de 3 dakikalık bir beklemenin ardından aktif hale geçebilen FastStart *Taq* polimeraz enzim çözeltisi eklenmiş ve her bir Eppendorf tüpünde 22 µL PZR karışımı hazırlanmıştır.

Hazırlanan PZR karışımı üzerine, DNA izolasyonu ve saflaştırması gerçekleştirilen *S. aureus* örneklerinin amplikonlarından her Eppendorf tüpüne 3 µL ilave edilmiş örnekler MWG-Biotech (Ebersberg, Almanya) firmasından temin edilen Inc Primus 96 Thermal Cycler'a konulmaya hazır hale getirilmiştir. Örnekleri PZR işleminden sonra karşılaştırabilmek ve doğru sonuçların elde edildiğini anlayabilmek için pozitif ve negatif örnekler de hazırlanmıştır. Pozitif kontrol için saf *S. aureus* kültürlerinin amplikonları eklenerek yukarıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Negatif kontrol için ise steril ultra saf su kullanılmıştır.

Örnekler, pozitif ve negatif kontroller Primus 96 Thermocycler'a uygun şekilde yerleştirilmiş sıcaklık döngüleri başlatılmıştır. Yaklaşık olarak 135 dakika süren döngülerin ardından cihaz işlem bittikten sonra örnekleri +4°C'de muhafaza etmektedir.

3.2.7. Agaroz Jel Elektrofrez

%1.5'lik Agaroz Jel Hazırlanışı (w/v) : 100 mL TBE (1X) tamponu içerisine tartılan 1.5 g agaroz eklendikten sonra çözelti şeffaflaşınca kadar mikrodalga yardımı ile çözdürülmüş 1mg/mL etidyum bromürden 3 µL çözelti içerisine eklenmiştir. Çözelti elektrofrezin uygulanacağı tablaya dökülmüş ve stopperler ile kuyucuk açmak için kullanılan taraklar jelin uygun kısımlarına yerleştirilmiştir. Jelin katılaşması için bir süre beklenmiştir. Katılaştıran jelin içerisinde bulunan taraklar çıkarılmıştır. Elde edilen kuyucuklu jel hızlı bir şekilde elektrofrez işlemine alınmıştır (Taban, 2007).

Elektrofrez :

Çalışmadaki bu işlemin amacı örneklerden elde edilmiş *S. aureus* bakterilerinin DNA'larını görünür hale getirebilmek ve izole edilen DNA'ları pozitif kontrolleri ile karşılaştırarak doğrulamasını yapmaktır.

Tabla üzerinde elde edilen jelin üzeri TBE tamponu (1X) ile doldurulmuştur. İzole edilmiş ve PZR yöntemi ile çoğaltılmış bakteri DNA'larından (amplikon) 10'ar µL, 2'şer µL 6X yükleme boya çözeltisi ile karıştırmıştır. İlk kuyucuğa moleküler ağırlık belirteci (marker) yüklendikten sonra diğer kuyucuğa pozitif kontrol yüklenmiştir. Yükleme biten jelin bulunduğu tanka güç kaynağı bağlanmış ve 90 V'a ayarlanmıştır. Yaklaşık olarak 1-1.5 saat süren yürütme sonunda bantlar görünür halde belirginleşmiştir (Taban, 2007).

3.2.8. Jel Görüntüleme

Elektrofrez işlemi biten ve bantları görünür hale gelen jel hedef DNA'ların gösterilmesi amacı ile jel görüntüleme işlemine alınmıştır.

Elektrofrez işleminden alınan jel Syngene (Cambridge, İngiltere) markalı InGenius jel görüntüleme ve analiz sistemi ile 302 nm UV altına alınıp görüntüleme yapılmıştır. Ortaya çıkan görüntüde pozitif kontrol ve örnekler *S. aureus*

bakterisine özgü olan nuc gen bölgesi için 400 bç'lik uzunluk değerleri karşılaştırılmış ve sonuca ulaşılmıştır.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Çalışma boyunca elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacı ile SPSS 11.5 paket programından yararlanılmıştır. Çalışmadaki karşılaştırmalar, SPSS 11.5 paket programı yardımı ile “T testi, Mann-Whitney, tek yönlü ANOVA ve Kruskal-Wallis Testleri” kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonuçları, $p < 0,01$ olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Çalışma kontrol ve örnek grubu peynir üretimi olmak üzere 2 grup halinde gerçekleştirilmiştir. Her iki grupta 2 tekerrürlü halde gerçekleştirilmiştir. Peynir yapım aşamasında örnek grubuna 9.4×10^6 EMS/mL düzeyinde *S. aureus*, 1.2×10^9 EMS/mL *L. plantarum*, kontrol grubuna ise 9.4×10^6 EMS/mL *S. aureus* inokülasyonu yapılmıştır. Yapılan inokülasyonlar sonrasında peynir üretimi ve depolama aşamasının belli zamanlarında örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan örnekler ile ilgili bilgiler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Örnek Alım Yerleri ve Zamanları

Örnek Alım Yeri No	t (saat)	Örnek Alım Yeri Açıklaması
1	0	pastörizasyon sonrası (t=0)
2	2	pıhtı kesimi
3	6	kalıp kesimi
4	22	ön salamura çıkışı
5	24	depolama başlangıcı
6	144	depolama 6. Gün
7	432	depolama 18. Gün
8	600	depolama 23. Gün
9	936	depolama 39. Gün
10	1404	depolama 59. Gün
11	1920	depolama 80. Gün
12	2160	depolama 90. Gün

Çalışma iki tekerrür şeklinde gerçekleştirilmiştir ve yapılan kültürel ekimler sonucunda elde edilen *S. aureus* sayım sonuçlarının sayısal değerleri Ek 1’de verilmiş olan EMS tablosundan bulunmuştur. Kontrol grubunun iki tekerrürün EMS tablosundan elde edilen sayısal sonuçlarının ortalaması alınmış ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Kontrol Grubuna Ait Örnek Alım Yerleri ve *S.aureus* Sayım Değerleri

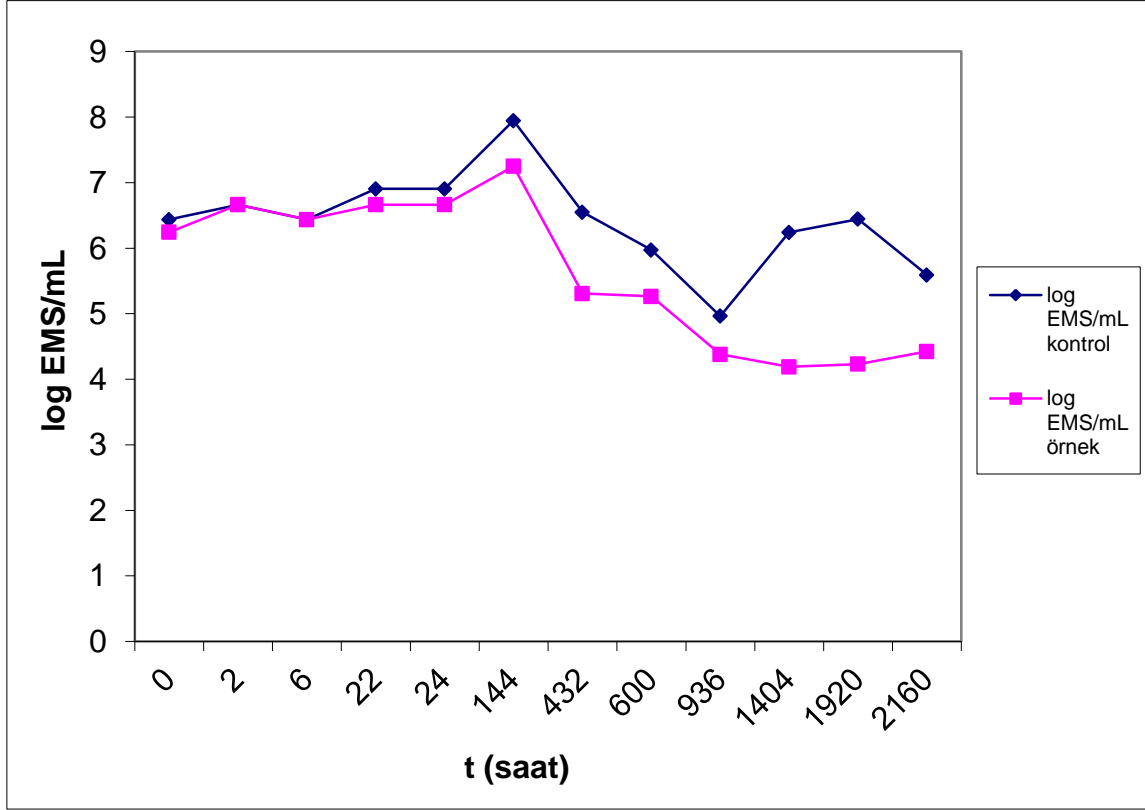
Örnek Alım Yeri No	t (saat)	Örnek Grubu	EMS/mL	log EMS/mL
1	0	kontrol	2.73×10^6	6.437
2	2	kontrol	4.61×10^6	6.663
3	6	kontrol	2.73×10^6	6.437
4	22	kontrol	8.05×10^6	6.906
5	24	kontrol	8.02×10^6	6.904
6	144	kontrol	8.80×10^7	7.944
7	432	kontrol	3.54×10^6	6.548
8	600	kontrol	9.40×10^5	5.973
9	936	kontrol	9.18×10^4	4.963
10	1404	kontrol	1.74×10^6	6.241
11	1920	kontrol	2.78×10^6	6.444
12	2160	kontrol	3.90×10^5	5.591

Örnek grubuna ait iki tekerrürlü *S.aureus* sayım sonuçları Ek 1'de verilmiş olan EMS tablosuna göre bulunup ortalaması Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Örnek Grubuna Ait Örnek Alım Yerleri ve *S.aureus* Sayım Değerleri

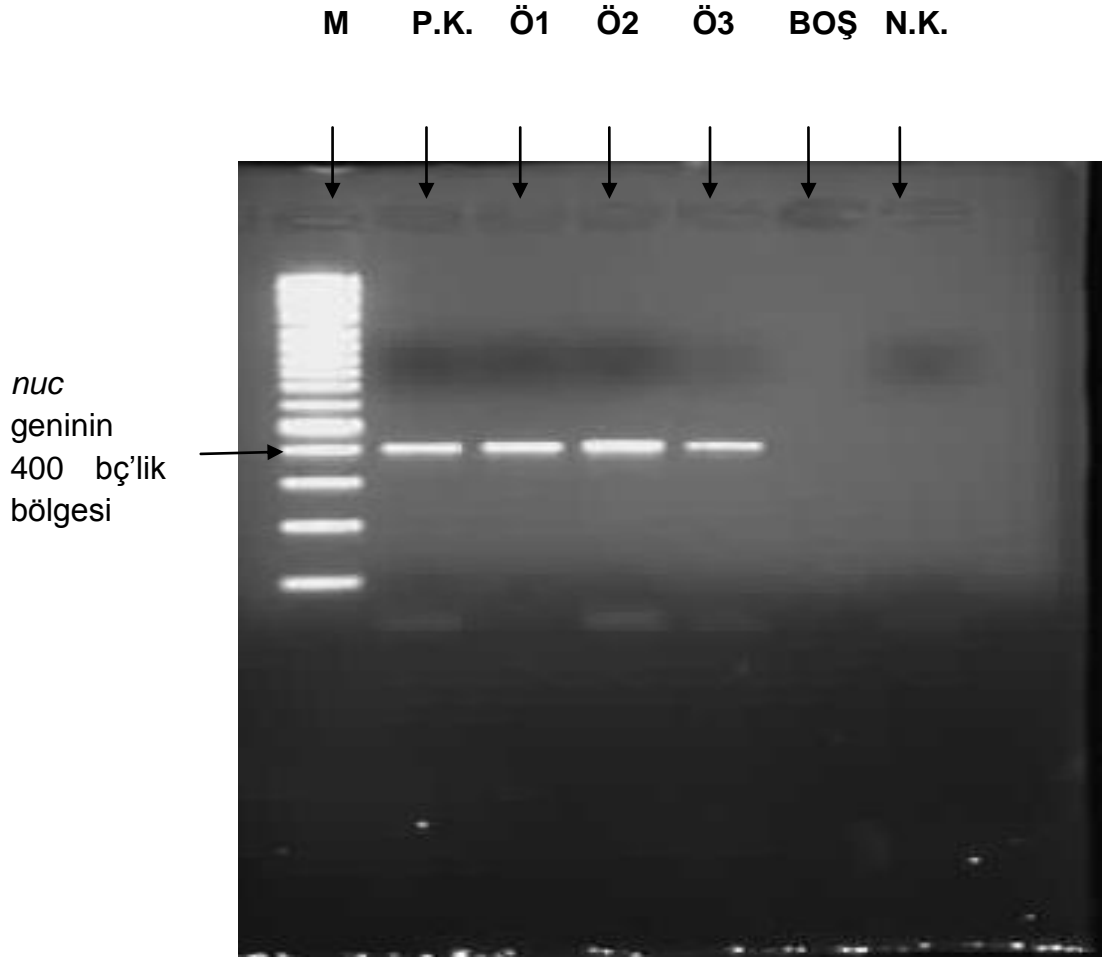
Örnek Alım Yeri No	t (saat)	Örnek Grubu	EMS/mL	log EMS/mL
1	0	örnek	1.75×10^6	6.243
2	2	örnek	4.60×10^6	6.663
3	6	örnek	2.72×10^6	6.435
4	22	örnek	4.60×10^6	6.663
5	24	örnek	4.60×10^6	6.663
6	144	örnek	1.78×10^7	7.250
7	432	örnek	2.04×10^5	5.309
8	600	örnek	1.84×10^5	5.264
9	936	örnek	2.40×10^4	4.380
10	1404	örnek	1.55×10^4	4.190
11	1920	örnek	1.70×10^4	4.230
12	2160	örnek	2.65×10^4	4.423

L. plantarum'un *S. aureus* gelişimi üzerine antimikrobiyel etkisini değerlendirebilmek için kontrol grubu ve örnek grubunun sayısal verileri karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 *L. plantarum*'un *S. aureus* gelişimi üzerine etkisi, t (saat) - log (EMS/mL)

Peynir yapımı ve depolama sırasında alınan örnekler PZR yöntemi ile *S. aureus*'un ATCC6538 bakterisinin *nuc* geninin 400 bç'lik bölgesi (Cremonesi et al., 2005) çoğaltılarak doğrulama işlemi yapılmış ve bu işlem sonucunda elde edilen görüntü Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 *S. aureus*'un ATCC6538 bakterisinin *nuc* geninin 400 bç'lik gen bölgesi görüntüsü

(M:Marker, P.K: Pozitif Kontrol, Ö1: Örnek 1, Ö2: Örnek 2, Ö3: Örnek 3, N.K: Negatif Kontrol)

L. plantarum BG33 suşunun *S. aureus* ATCC6538 suşuna antimikrobiyel etkisinin belirleyebilmek için sayım sonuçlarına bakıldığında peynir yapım aşamasının 0., 2. ve 6. saatlerinde sırasıyla kontrol grubunda 2.73×10^6 EMS/mL, 4.61×10^6 EMS/mL ve 2.73×10^6 EMS/mL düzeyinde olan *S. aureus* sayısı örnek grubunda ise 1.75×10^6 EMS/mL, 4.6×10^6 EMS/mL ve 2.72×10^6 EMS/mL düzeyindedir. Peynir yapımının erken dönemi olduğu ve laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel madde üretimine hazırlık aşaması olması nedeniyle fazla bir düşüş beklenmemekle birlikte sonuçlar bu doğrultuda saptanmıştır. 24. saatin sonunda depolanma başlangıcında ise bu değerler kontrol grubunda 8.02×10^6 EMS/mL örnek grubunda 4.60×10^6 EMS/mL olarak belirlenmiştir. Sayım sonuçları

karşılaştırıldığında her iki grupta *S. aureus* sayısının 10^6 düzeyinde olduğu görülmüştür. Depolamanın 6. gününde (144. saat) ise kontrol grubu için sayım sonucu 8.80×10^7 EMS/mL, örnek grubu için sayım sonucu ise 1.78×10^7 EMS/mL'dir. 24. saatte de olduğu gibi kontrol grubunun ve örnek grubunun sayım sonuçları aynı log düzeyindedir (10^7). Depolamanın 18. gününde (432. saat) ise alınan sayım sonuçlarından bulunan kontrol grubuna ait değer 3.54×10^6 EMS/mL, örnek grubuna ait değer ise 2.04×10^5 EMS/mL olarak saptanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubunda 6.5 log EMS/mL olan sayım sonucu örnek grubunda 5.3 log EMS/mL'dir ve 1 log EMS/mL düşüş gözlenmiştir. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi 23. günde (600. saat) *S. aureus* sayısı kontrol grubunda 9.40×10^5 EMS/mL, örnek grubunda 1.84×10^5 EMS/mL olarak saptanmış ve iki sonucunun 10^5 dolayında olduğu görülmüştür. Depolamanın 39. gününde (936. saat) kontrol grubunda sayım sonucu 9.18×10^4 EMS/mL, örnek grubu ise 2.40×10^4 EMS/mL olarak bulunmuştur. Verilere bakıldığında 59. günde (1404. saat) ise kontrol grubu 1.74×10^6 EMS/mL'ye olarak örnek grubunun ise 1.55×10^4 EMS/mL'ye düştüğü belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında *S. aureus* kontrol grubu sonucu 6.2 EMS/mL iken örnek grubunda 4.2 EMS/mL olduğu belirlenmiş ve 2 log EMS/mL seviyesinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Aynı seviyede (2 log EMS/mL) düşüş 80. günde (1920. saat) de gözlenmiştir. 80. günde kontrol grubunda 2.78×10^6 EMS/mL olan sayım sonucu örnek grubunda 1.70×10^4 EMS/mL'dir. Son değerler depolamanın 90. gününde (2160. saat) alınmış ve sonuçlar kontrol grubunda 3.90×10^5 EMS/mL, örnek grubunda ise 2.65×10^4 EMS/mL olarak bulunmuştur. Bu depolama gününde de ise 1 log EMS/mL düşüş gözlenmiştir. Verilerin değerlendirildiğinde kontrol ve örnek grubunun sayısal değerleri arasında fark olduğu ve örnek grubunda 2 log EMS/mL'ye varan düşüşlerin olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir. Kontrol grup ile örnek grup arasında her bir örnek alım noktasından elde edilen veriler gerek T testi gerekse Mann-Whitney testi kullanılarak incelendiğinde, *L. plantarum*'un Beyaz peynirde *S. aureus* üzerindeki etkisi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,01$). Ayrıca laktik asit bakteri örnek grupları arasındaki farkın parametrik olarak ANOVA testi ve non-parametrik olarak Kruskal-Wallis Testi kullanılarak incelenmesi sonucunda da, laktik asit bakterileri Beyaz peynirdeki *S.*

aureus patojen bakterisi üzerindeki etkileri açısından birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,01$).

İnsan beslenmesi açısından büyük değere sahip olan süt ve süt ürünlerinde patojen bakteriler büyük sorunlar yaratabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, mastitisin süt ürünlerinde ekonomik kayıplara ve süt veriminin düşmesine sebep olduğu ortaya konmuştur (Raubertas, 1982, Akineden et al., 2001). Mastitis dönemi boyunca sütteki somatik hücre sayısı miktarı artmakta, süt kompozisyonu ile fonksiyonel karakteristikler değişmektedir (Barbano et. al., 1991). Bu olumsuzlukları ortadan kaldırabilmek amacıyla gıdalarda probiyotiklerin kullanımı (Fuller, 1999) patojen insidansını düşürme kapasitesinin olmasından dolayı yaygındır (Musa et al., 2009). İnsan sağlığına yararlı etkilerinden dolayı probiyotikler, özellikle çocuklara ve diğer yüksek risk taşıyan popülasyonlara yönelik üretilen süt ürünlerine eklenmektedir.

Enfeksiyöz ishal dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biridir ve her sene milyonlarca ölümlü sonuçlanan vakalara sebep olmaktadır. Probiyotikler bu gibi sağlık sorunlarını çözmek için kullanılabilir bir araçtır (FAO/WHO Expert Consultation, 2001). Bu amaçla, insan ve fermente gıda örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel madde üretebilme yeteneği ile ilgili yapılan çalışmada kuyu difüzyon testi sonucunda *L. plantarum*'un *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* LMG2708, *L. plantarum* LMG2003, *L.sake* NCDO2714, *Lactococcus lactis* JC17 ve *Pediococcus pentosaceus* FBB611'in *L. plantarum*'un ürettiği antimikrobiyel maddelere karşı duyarlı oldukları saptanmıştır. *L. plantarum* BG33'ün antibakteriyel etkinliği için yapılan agar noktalama testinde ise *L. plantarum* BG33'ün *S. aureus* ATCC6538 indikatör bakterisine karşı inhibisyon zon çapının 25 mm, yani hayli etkin bir düzeyde olduğu bulunmuştur (Uymaz, 2009).

L. plantarum'um biyokoruyucu etkisi *Escherichia coli*, *S. aureus* and *Salmonella typhi* gibi patojen bakterilerine karşı gıda örneği olarak Nijerya'ya özgü cassava "fufu" adlı geleneksel fermente bir üründe kullanılmıştır. Fermente olmayan cassavada patojen bakteri sayısı artış göstermiştir. Fermente cassavada ise başlangıç sayıları 4 log EMS/mL olan patojen mikroorganizmalar ilk 36 saatte artış eğilimi göstermiş, yaklaşık 72 saat sonra tamamen inhibe olmuştur. Gıda

ortamında yapılan çalışmamızda peynir gibi kompleks ve laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkilerini kısıtlayabilecek birçok etmenin bulunduğu peynirde Çizelge4.3'te de görüldüğü gibi *S. aureus*'un 0., 2., 6., 22., 24. saatlerdeki sayısı incelendiğinde 1.75×10^6 - 4.60×10^6 EMS/mL (6.2 – 6.6 log EMS/mL) arasındadır. 144. saatin sonunda ise 1.78×10^7 EMS/mL (7.3 log EMS/mL) seviyesine ulaşan *S. aureus* 432. saatte 2.04×10^5 EMS/mL (5.3 log EMS/mL) seviyesine gerilemiştir. Depolama sonunda 2.65×10^4 EMS/mL (4.4 log EMS/mL) düzeyine kadar azalabilmiştir. Gözlenen bu azalma istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlı gözükmemektedir ($p>0.01$). Ayrıca *L. plantarum*'un birçok patojen bakteri suşuna karşı geniş bir antimikrobiyel inhibisyon spektrumu olduğu belirlenmiştir. İnhibisyon zonlarına bakılarak *L. plantarum*'un antimikrobiyel etkisi tanımlanmıştır. *L. plantarum* kültürünün *S. aureus*'a karşı 17 mm, fermente üründe 27 mm ve süpernatantta 25 mm zon oluşturduğu görülmüştür (Obadina et al., 2006).

Laktik asit bakterilerinin inhibisyon aktivitesi, laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂ gibi birincil bileşiklerin birikimi ve formik asit benzoik asit, hidrojen peroksit, diasetil, asetoin ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyel metabolitlerin oluşturulması ile meydana gelmektedir. Antimikrobiyel etkilerini incelemek amacıyla kullandığımız *L. plantarum* BG33 suşu gıdalardan izole edilmiş aynı şekilde zeytin salamurasından izole edilen *L. plantarum* LB17.2b suşu ile yapılan bir çalışmada agar difüzyon testi uygulanmıştır. *L. plantarum* LB17.2b suşunun *S. aureus* patojen bakterisi ve ayrıca *L. plantarum*'a olan etkisini incelemek amacıyla nokta testi yapılmıştır. Deneme sonucunda *L. plantarum* LB17.2b patojenlerinin *L. plantarum*'a karşı etkisi gözlenebilmesi için yapılan 12 deneme sonucunda 9 denemede inhibisyon etkisinin gözlemlendiği belirtilmiştir. *S. aureus* ile yapılan bir denemede ise etkinin gözlenemediği belirtilmiştir. (Delgado et al., 2001). Yapılan bu çalışmada inhibisyon etkileri bakteriyosin üretimi ile ilişkilendirilmiştir.

Gaudana et al. (2010), bir çalışmasında laktobasillerin antimikrobiyel etkisini ölçebilmek amacıyla MRS agar yüzeyine agar spot test yöntemi kullanılmıştır. Seçilen laktobasil suşlarından 1×10^8 kob/mL MRS agar üzerine damlatılmıştır ve 24 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör olarak kullanılan *L. plantarum* CS23 ve *L. plantarum* ATCC 8014 bakterileri Luria besiyerine ekilmiştir. Bu işlemin sonrasında Luria yumuşak agar (% 0.6 agar, w/v) ile karıştırılmış ve

laktobasilleri içeren MRS besiyeri üzerine bu karışım eklenmiş ve 24 saat 37°C inkübasyonun ardından inhibisyon zonları ölçülmüştür. Testler sonucunda *L. plantarum* ATCC 8014 ve *L. plantarum* CS23 suşunun, *S. aureus* ATCC6538 karşı oluşturduğu inhibisyon zonu 2-5 mm arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki deney düzeneği izole edilen bakterilerin saflaştırılıp besiyerlerine ekim yapılması ve bunun üzerine test bakterilerinin eklenmesiyle oluşturulmuştur. Gıda sistemlerinde ise çalışmamızda olduğu gibi ortamdaki protein aktiviteleri, fermantasyon süreçleri ve benzeri metabolik aktiviteler sonucu oluşan ürünler laktik asit bakterilerinin inhibisyon etkisini değiştirebilmektedir.

Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada Pecorino del Poro peynirinden toplam 225 laktik asit bakterisi izole edilmiş, bunlardan 18 tanesinin *E.coli*'ye karşı antagonistik aktivitesini incelemiş ve 9 laktobasilin antagonistik aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmada *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve *L. curvatus*'un *E.coli*'ye karşı yoğun bir antagonistik aktivite gösterdiğini belirlenmiştir (Caridi, 2003). Bu inhibitör etki laktik asit üretimi ve pH'nın düşüşü ile ilişkili olabilmektedir. Beyaz peynir örneğimizde ise laktobasillerin *S. aureus* patojenine karşı inhibisyon etkisi oluşan pH düşüşüne bağlanmıştır.

Sarı renkli Bulgar tipi peynirin (Bulgarian yellow cheese) üretiminde starter olarak kullanılan *L.paracasei* subsp. *paracasei* M3 suşunun antimikrobiyel aktivitesi ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada 60'ın üzerinde bakteri ve maya türü üzerinde çalışılmıştır. Araştırma sonucunda ilgili *L.paracasei* suşunun *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Helicobacter pylori*, *L. delbrueckii* suşları ve bazı maya türleri ve suşları üzerine antimikrobiyel aktivitesi olduğu tespit edilmiştir (Atanassova et al., 2001). Antimikrobiyel etkiler ürünlerin raf ömrünün arttırılmasında da son derece önemli role sahiptir (Gürsoy ve Kınık, 2005). Peynir üretim prosesinde starter olarak kullanılan laktobasil suşu, yaptığımız araştırmada ülkemizden izole edilen bir suş olan *L. plantarum* BG33 suşu peynire tat-koku oluşturması ve patojen bakterileri inhibe etmesi amacıyla eklenmiştir.

Destek kültürler; çoğunlukla laktobasillerden oluşan, peynirde lezzet oluşumunu hızlandırmak ve peynir lezzetini arttırmak amacıyla standart mezofilik starterlere ilave olarak kullanılan ve genellikle ilgili peynirin starter olmayan mikroflorasında da bulunabilen mikroorganizmalardır (Madkor et al., 2000). Konu ile ilgili bir

çalışmada starter kültür kullanılmadan üretilen salamura koyun peynirlerinin mikroflorası araştırılmıştır (Durlu-Ozkaya et al., 2001). Çalışmada 17 farklı peynir örneğinden izole edilen toplam 77 laktik asit bakterisinden 17 tanesinin laktobasil olduğu ve bu laktobasillerden 3 tanesinin *L. paracaesi* subsp. *paracasei*, 14 tanesinin de *L. plantarum* olduğu belirlenmiştir Starter ya da destek kültür olarak kullanılabildikleri gibi starter olmayan mikroflorada da bulanabilen bu mikroorganizmaların asidifikasyon, proteolitik aktivite ve lipolitik özellikleri suşlara göre farklılıklar göstermektedir. Laktobasiller tarafından (özellikle starter olmayan mikrofloradaki) sitratın metabolize edilmesi asetaldehit, etanol, diasetil, aseton ve asetoin gibi lezzete katkıda bulunan bir seri uçucu bileşiğin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Laktobasillerin hem bakteriosin, bakteriyosin benzeri maddeler ve diğer antimikrobiyal bileşikler üreterek patojenleri inhibe etmesi hem de bazı suşların otolizi nedeniyle olgunlaştırmayı hızlandırmaları peynir teknolojisinde kullanımlarını destekleyici niteliktedir. (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Probiyotik peynir üretiminde laktobasillerin kullanımı ile ilgili olarak Vinderola et al. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, bir Arjantin peyniri olan Fresco'nun üretiminde probiyotik bakterilerin kullanım olanakları araştırılmıştır. Çalışmada 60 günlük peynir olgunlaşması boyunca *L. casei* ve *L. acidophilus*'a ait suşların da aralarında bulunduğu probiyotik bakterilerin peynirlerdeki sayıları takip edilmiş ve probiyotik bakteri sayılarının 10^6 kob/g değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda,, probiyotik özellikleri daha önce araştırılmış olan (Uymaz, 2009) *L. plantarum*'un Beyaz Peynir ortamındaki antimikrobiyal etkisi amacıyla sayımları alınmış ve sayım sonuçları Tablo 3'de verilmiştir, kontrol grubunda 59. gün sonunda 1.74×10^6 EMS/mL, örnek grubunda ise 1.55×10^4 EMS/mL sayısına ulaşmıştır.

Madkor et al. (2000), Cheddar peyniri üretiminde *L. helveticus* ve *L. casei* kültürlerini destek starter olarak kullanmış ve 6 aylık depolama süresince peynirlerdeki probiyotik bakteri sayılarının 10^6 kob/g değerinin altına düşmediğini saptanmıştır. Konu ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada *L. acidophilus* kullanarak keçi sütünden yarı sert keçi peyniri üretilmiş ve üretilen peynirin 70 gün olgunlaşma süresinde *L. acidophilus*'un peynirdeki konsantrasyonunun 6×10^7 kob/g seviyesini aşmadığı ve probiyotik etki seviyesi olarak değerlendirilen

10⁶ kob/g eşik değerinin altına düşmediği görülmüştür (Gomes and Malcata, 1998).

Biradan izole edilen *L. plantarum* VTT E-78076 kültür filtratından antimikrobiyel bileşenlerin tanımlandığı bir çalışmada, antimikrobiyel aaktivite düşük moleküler kütle fraksiyonu ile tanımlanmış ve jel kromatografisi ile ayrılmıştır. Test mikroorganizması olarak ise *Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans*) VTT E-90396 kullanılmıştır. Çalışmada yer alan aktif fraksiyonlar benzoik asit (CAS 65-85-0), 5-methyl-2,4-imidazolidinedione (CAS 616-03-5, methylhydantoin), tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one (CAS 674-26-0, mevalonolactone) ve 3-(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedione (CAS 5845-67-0, cyclo(glycyl-L-leucyl)'dir. Bu bileşenler 10 ppm konsantrasyonunda ayrı ayrı olarak kullanıldığında test mikroorganizmasına %10-15, tüm bileşenler birlikte ve % 1 oranında laktik asit ile birlikte %100 düzeyinde etki etmiştir. Sadece % 1 oranında laktik asit kullanıldığında ise test mikroorganizması inhibisyonu % 40'tır (Niku-Paavola et al., 1999). Bileşen kullanımı, laktik asit bakterilerinin ortaya çıkardığı antimikrobiyel maddeler ve asitlik ile birlikte bakteri inhibisyonunu artırmıştır. Çalışmamızda bakteri inhibisyonu sadece laktik asit bakterilerinin ürettiği asitlik ve laktik asit yardımı ile elde edilmiştir. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde patojen mikroorganizmalara karşı inhibisyon aktivitesini artırabilmek için yardımcı madde kullanımının patojen bakteri gelişiminin önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Tavuk barsağından ve silajlardan izole edilen 400'den fazla laktik asit bakteri izolatu ile yapılan bir çalışmada öncelikle yüksek sıcaklıkta *Bacillus cereus*, *E.coli*, *Salmonella* spp. ve *S. aureus* gibi patojenlere karşı antimikrobiyel etkileri gösterilmiştir. Tavuk barsağından izole edilen *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 *Salmonella* Enteritidis S003 serovarına karşı düşük aktiviteli antimikrobiyel madde ürettiği görülmüştür. Bu antimikrobiyel madde pH 1-9 arasında çalışabilmenin yanı sıra 121°C sıcaklığa dayanıklı ve Gram-pozitif ile Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite göstermektedir. Tavuk barsağından izole edilen *Lactobacillus salivarius* AC21 ürettiği Salivaricin K21 aracılığı ile *Bacillus subtilis*, *B. coagulan*, *B. circulans* ve *Listeria innocua*' ya karşı inhibisyon etki oluşturmuştur. Uygulamada 4 kob/g *Salmonella* spp. ile kontamine olan kullanıma hazır sebze örneklerine % 0.5 kısmi saflaştırılmış Salivaricin K21 ve düşük

konsantrasyonda (64 dilüsyonda) organik asit karışımı sebzelerde doku zedelenmesi olmadan % 100 inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirtilmektedir (Nitisinprasert, et al., 2000). Bu çalışmada da görüldüğü üzere patojen bakteri inaktivasyonu için ek inhibisyon ajanlarına gerek duyulmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız *L. plantarum*'um Beyaz peynir ortamında ürettiği asitlik (pH düşüşü) patojen bakteri *S. aureus*'un inhibisyonu için yeterli olmadığı, istatistiksel analizlere ve Şekil 4.1'e bakıldığında anlamlı düşüşlerin gerçekleşmediği saptanmıştır.

Başka bir çalışmada ise fermente pirinç eriştelere (rice noodle) elde edilen KUB-KJ174 aktif mikrobiyel madde üreten *L. plantarum* olarak tanımlanmış ve MRS agarda kültüre edilmiştir. pH 3.6 düzeyinde süpernatant, kontaminant bakteri grubu krema bezesinden (cream puff) izole edilen 50 aerobik mezofil, 10 *Bacillus cereus* ve 50 koliform bakteriye karşı % 100 inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Bununla birlikte; pH 5 seviyesine getirildiğinde daha düşük bir inhibisyon aktivitesi ortaya çıkmaktadır (Wongsuttichote and Nitisinprasert, 2009).

pH değerindeki yükseliş *L. plantarum* bakterisinin diğer bakterilere inhibisyon etkisini düşürmektedir. Hoover ve Harlender (1993)'in belirttiği agar yüzeyine nokta ekim yöntemi (spot-on-lawn) ile tespit edilen antimikrobiyel aktiviteler; aerobik mezofilik bakterilere karşı % 26, *Bacillus cereus*'a karşı % 50 ve koliform bakterilere karşı ise % 47 olarak gösterilmiştir. pH tarafından hücre adsorpsiyonu ve desorpsiyonu ile kısmi olarak saflaştırılan antimikrobiyel madde (PP-174)'dir.

Yapılan çalışmalar fermantasyon sonucu ortaya çıkan antimikrobiyel etkenlerin dışında laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel bileşenlerin bakterilerin inhibisyon etkisini artırdığını göstermiştir.

Geleneksel fermente bir ürün olan Portekiz sosisinde "Alherias", laktik asit bakterilerinin, aralarında *Listeria monocytogenes* de bulunduğu patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etkisi gözlenmiştir. Antibakteriyel aktivite gösteren laktik asit bakterileri izole edilmiş, seçilen suşlar "Alherias" yapımında kullanılmıştır. İzolatlar *L. innocua*'ya karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Ayrıca çalışmada bu iki suşun "Alheria kütlesi"nde +4°C'de depolama süresi boyunca antilisterial aktivitesi; "Alheria" hamuru örnekleri içerisine laktik asit bakteri suşları inoküle edildiğinde *L. innocua* popülasyonunun gelişimi, sadece *L. innocua* ya da

bakteriyosin üretmeyen *P. pentosaceus* ile inoküle edilen hamur örnekleri ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde baskılanmış olduğu görülmüştür (Albano et al., 2007).

Yapılan başka bir çalışmada *L. plantarum* ve *L. acidophilus*'un beyaz peynirde *L.monocytogenes* üzerine etkileri araştırılmıştır. Pastörize sütlere 4.6×10^3 , 5.0×10^3 , 4.5×10^5 ve 8.0×10^5 kob/ml *L. monocytogenes* inokule edilerek 7 farklı grup beyaz peynir yapılmış ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 90 gün % 13'lük salamurada olgunlaştırmaya bırakılmıştır. Başlangıçta 4.6×10^3 ve 5.0×10^3 kob/mL düzeylerindeki *L. monocytogenes*' in starter kültür ile birlikte inokule edildiği peynirlerde 1. gün yaklaşık 1 log artış olmuş, birinci günden itibaren *L. monocytogenes* sayısı azalarak 15. günün sonunda saptama sınırlarının altına düşmüştür (Yıldırım ve Sarımeahmetoğlu, 2006). Süte sadece *S. aureus* ve starter eklenen kontrol grubunda 0. saatte 6.4 log olan sayım 24. saatin sonunda 6.9 log olarak gözlenmiştir. 6. gün sonunda ise kontrol grubu 7.9 log, 18. günün sonunda ise 6.5 log'a ulaşmıştır. 4.6×10^3 ve 5.0×10^3 kob/mL *L. monocytogenes*' in, 10^6 kob/mL düzeylerinde *L. plantarum* ile birlikte inokule edildiği peynirlerde ise *L.monocytogenes* sayısı inokulasyondan itibaren belirgin bir azalma kaydederek 10. günde saptama sınırının altına düşmüştür. Etkenin olgunlaşma periyodunun 30. gününde tamamen yıkımlandığı EMS tekniği ile belirlenmiştir (Yıldırım ve Sarımeahmetoğlu, 2006). Çalışmamızda örnek grubunda *S. aureus* sayısı 6. günde 1.78×10^6 EMS/mL, depolamanın 18. günde ise 2.04×10^5 EMS/mL seviyesinde olduğu bulunmuştur. Fakat çalışmamızda depolama süresi boyunca *S. aureus* bakterilerinin tamamının inhibe edilemediği görülmüştür. Peynirlerde *L. plantarum*' un olgunlaşma periyodu boyunca canlılığını sürdürdüğü, olgunlaşma periyodu sonunda probiyotik etkilerin gözlenebilmesi için kabul edilen 10^6 kob/mL düzeylerinde canlı kaldığı saptanmıştır (Yıldırım ve Sarımeahmetoğlu, 2006). Deneme peynirlerinde *L. plantarum* BG33'ün sayım sonucu 7 log EMS/mL değerinin altına düşmemiştir. Yıldırım ve Sarımeahmetoğlu'nun (2006) yaptığı çalışmanın devamında 4.6×10^3 , 5.0×10^3 , 4.5×10^5 ve 8.0×10^5 kob/mL düzeyindeki *L. monocytogenes*' in süte starter kültür ile birlikte inoküle edildiği peynirlerde starter kültürün, patojen bakterisi, olgunlaşma periyodu sonuna kadar inhibe edebildiği belirtilmiştir. Bu durumun muhtemelen starter kültürün peynir pH'sını ilk 24 saat içinde 4.5'e kadar düşürmüş olmasına ve peynirlerin % 13'lük

salamurada olgunlaşmaya bırakılmasına bağlanmıştır. Araştırmacıların yaptığı bu çalışmada *L. monocytogenes* sayısının gösterdiği düşüşe kesin olmamakla ve testleri yapılmamakla birlikte bakteriyosin üretiminin sebep olduğu düşünülmüştür.

Kullanılan starter bakterinin özellikleri de peynirde kullanılan probiyotik özellikteki laktobasillerin patojenlere olan etkisini değiştirebilmektedir. Yousef ve Marth (1988), tarafından yapılan bir çalışmada 4°C sıcaklıkta 140 gün olgunlaştırılan Colby peynirine 10^2 – 10^3 kob/mL düzeyinde katılan *L.monocytogenes*'in canlılığını 140 gün boyunca koruduğu belirtilmektedir ki, yaptığımız çalışmada da araştırma sonuna kadar *S. aureus* sayısında anlamlı bir azalış gözlenmemiştir.

L. plantarum SK1 suşunun *L.monocytogenes*' e karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilmesi amacıyla yapılan yukarıdaki çalışmaya benzer bir çalışma Wilson et. al. (2005) tarafından yapılmıştır. *L. plantarum* SK1 suşunun *L. monocytogenes* UMCC98 bu iki bakterinin MRS besiyerine ekimi yapıldığında, geç log/erken durağan (late log /early stationary) fazında *L. plantarum* SK'in antilisterial aktivite gösterdiği görülmüş, bu sırada pH değerinin 4.26 civarında olduğu belirtilmiştir. *L. plantarum* SK' nin antilisterial etkisini belirleyebilmek için ince tabaka kromatografisi yardımı ile laktik asit üretimi belirlenmiş ve bu antilisterial etkinin laktik asit üretimine bağlı olduğu belirtilmiştir.

Ennahar et al., (1998), *L. plantarum*'un peynirin olgunlaşma periyodu süresince pH değişimine, peynirin diğer florası ve ticari kalitesi üzerine olumsuz etki göstermeksizin gelişip, çoğalabildiğini ve olgunlaşma süresi boyunca bakterisidal etkisini koruduğunu belirtmişlerdir. Fakat çalışmamızda *L. plantarum* sayısında bir değişiklik olmazken *S. aureus* sayısında da bir azalış gözlenmemiştir.

Farklı gıda çeşitlerinde *L. plantarum*'un antimikrobiyel özelliklerinden de yararlanılmaktadır. Bir çalışmada *L. plantarum* öncelikli olarak taze deve etlerinden izole edilmiş, MRS agar'a ekimleri yapılmış ve riskli *E.coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyel aktiviteleri gözlemlenmiştir. *L. plantarum*'un antimikrobiyel aktivitesi 10°C sıcaklıkta 4 gün boyunca inkübe edilerek gözlenmiştir. 4. gün sonunda örnek grubundaki örneklerde *E.coli* artışı 3.8×10^4 kob/g' dan 9×10^4 kob/g' a düşük düzeyde olmuştur. Kontrol grubunda ise bu artış 5×10^4 kob/g'dan 5.5×10^6 kob/g olmuştur (Kalalou et al., 2010). Bakterilerin etkilerinin gözlendiği ortamlar aynı

olmasa da bu çalışmada sadece *S. aureus* içeren kontrol grubunda 0. saatte *S. aureus* sayısı 2.7×10^6 ve 6. gün sonunda ise 8.8×10^7 iken, örnek grubunda ise 1.8×10^6 ve 6. gün sonunda 1.8×10^7 EMS/mL olarak bulunmuştur.

Anas et al. (2008), yaptıkları çalışmada bakteriyel etkileşimleri kullanarak patojen bakterilerin gelişimini engelemenin etkili bir yöntem olduğunu belirtmiş ve istenmeyen bakteri gelişimini laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyel bileşenleri incelemişlerdir. Keçi sütünden elde ettikleri 64 laktobasilden 11 tanesi antimikrobiyel etki göstermiş, bunlardan 8 tanesi antimikrobiyel etkileri için test edilmiştir. İzolatlardan 3 tanesinin (*L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve *L. rhamnosus*) *S. aureus*'u inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Bunlar arasından *L. plantarum*' un en yüksek seviyede inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüş ve bu etkinin de bakteriyosin benzeri madde üretimi ile gerçekleştiğini saptanmıştır. Karışık kültür 24 saat sonrasında test edildiğinde *S. aureus* sayısında 1.6 log'luk bir düşüşün olduğu, 72 saat sonrasında *S. aureus*'ta gelişme görülmediği belirtilmiştir. *L. plantarum* suşunun *S. aureus*'a karşı antimikrobiyel etkilerinin nedenleri araştırıldığında da, yapılan testlerde, asit, H₂O₂, diasetil ve bakteriyosin benzeri bileşen üretiminin sinerjistik etkilerinin olmadığı görülmüştür. Buradaki çalışmada antimikrobiyel etki, yine bakteriyosin etkisine bağlanmıştır (Anas, 2008). Çalışmamızda ise *L. plantarum* BG33 suşunun *S. aureus* ATCC6538 suşuna etki göstermemesinin sebebi; *L. plantarum* BG33 suşunun ülkemizde izole edilen bir suş olması ve daha önce üzerine yapılmış bir çalışma olamaması sebebi ile asit, H₂O₂ ve pH etkisinin düşünülen düzeyde olmaması olabileceği düşünülmektedir.

FPB (fermented plant beverage) fermantasyon sırasında laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asitler; laktik asit, asetik asit, etanol, hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerin, Moat ve Foster' (2002)'in çalışmaları asetaldehit üretiminin, Gill ve Halley (2003) ayrıca Vignolo ve Castellano (2004)'nun çalışmalarının sonucunda ise diasetillerin antimikrobiyel etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Organik asitlerin, düşük pH, diasetil, asetaldehit ve diğer tanımlanamayan bileşenlerin kombinasyonunun bu etkilere sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca düşük Na içeriğinde; düşük pH ile *K. B.cereus* ve *S. aureus* gelişimini engelleyen anahtar faktör olduğu açıklanmıştır. Attarie et al. (1987), Somoro et al. (2002) ve Özdemir vd. (2006)'e göre laktik asit doğada bulunan ve en yaygın olarak kullanılan

asitlerden biridir ve asetik asit ile birlikte çok yaygın bir biyokoruyucu bileşik olarak tanımlanmaktadır.

Songisepp et al. (2004) "Pikante" peynirinin antioksidatif ve antibakteriyel aktivitesi ile ilgili yaptıkları araştırmada, probiyotik olarak sağlıklı bir çocuğun mide-bağırsak sisteminden izole edilen *L. fermentum* ME-3 10^9 kob/mL düzeyinde inoküle edilmiştir. Bu bakterinin *S. aureus* ve diğer patojenlere olan etkileri incelendiğinde probiyotik bakterinin yüksek oranda antimikrobiyel etkileri gözlemlenmiştir. Olgunlaştırma sürecinden geçirilen peynirlerden ve raf ömrü boyunca *L. fermentum* ME-3'un antimikrobiyel aktivitesinde bir miktar düşüş olduğu belirlenmiştir. Bunun nedenleri arasında ise probiyotik eklentisinin az olması ve laktobasil hücreleri etrafındaki protein matriksi gösterilmiştir (Songinsepp, 2004). Bizim çalışmamızda kullandığımız *L. plantarum* BG33 kültürü peynir yapımı sırasında peynir sütüne $1,2 \times 10^9$ EMS/mL seviyesinde inokülasyonu yapılmıştır. Etki gözlenmemesinin sebeplerinden bir tanesi ise yeterli sayıda laktik asit bakterisine ulaşamamak olduğu düşünülmektedir. Ayrıca peynirin depolanması sırasında peynir oluşumu sırasında ortaya çıkan *L. plantarum* bakterileri etrafındaki matriks yapısı antimikrobiyel etkinin azalmasına yol açmış olabilmektedir.

Çalışmamız sırasında Türkiye'de peynir yapımında ilk defa kullanılan ve ülkemizde izole edilen *L. plantarum* BG33 suşunun antimikrobiyel etkisi *S. aureus*'un tamamını inhibe etmeye yetmemiştir. Halkman (2000), çalışmasında verilen değerlerde görüldüğü gibi 5-20 mg/ml derişimlerdeki laktik asit uygulamalarında olumlu sonuçların alındığı belirtilmiştir. Bu sonuca dayanarak *L. plantarum* BG33'ün yeterli düzeyde laktik asit üretememiş olması muhtemel olarak görünmektedir. Ayrıca asetaldehit, diasetil ve H_2O_2 'in laktik asit ile yapılan kombinasyonları ayrı ayrı olarak da denenmiştir. Gerek *L. bulgaricus* gerekse diğer laktik asit bakterilerinin katalaz enzimi oluşturmadığı için, gelişim esnasında meydana getirdikleri H_2O_2 'in de *S. aureus* gibi patojen ve kontaminant bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğu ileri sürülmektedir.

Olgunlaştırma sırasında, çiğ süttten starter eklenerek (Batch RS) ve pastörize edilip starter eklenerek üretilen (Batch PS) peynirler, çiğ keçi sütünden starter ekmeden (Batch R) üretilen peynirlere göre daha keskin bir pH düşüşü

yaşamışlar ve bu düşüş laktik asit üretimine bağlıdır. *S. aureus* sadece pastörize edilmeyen R ve RS gruplarında olduğu ve olgunlaşma süresi boyunca sayının düştüğü belirtilmiştir (Olarte et al., 2000). Bu inhibisyon aktivitesi düşüş pH değeri ve starter kullanımı gibi olası diğer faktörlere bağlı olduğu belirtilmiştir (Gilmour and Harvey, 1990). 5.3'ün üzerinde olan pH değerleri, düşük olan pH değerlerine göre *S. aureus* gelişimi açısından daha uygundur (Tuckey et al., 1964). R ve RS'deki yüksek *S. aureus* seviyesi starter kültür eklenmemesi dolayısı ile düşük laktik asit bakteri seviyesine bağlıdır (0. günde 4 log kob/g ve 2. günde 2 log/g'dan daha düşük seviyelerde). Olgunlaştırmanın ilk iki günde çığ süttten üretilen peynir en düşük laktik asit bakteri sayısı olmasına rağmen R, RS ve PS arasında 5. Günden 15. güne kadar fark gözlenmemiştir. 15. günden sonra ise laktik asit bakteri sayısı üçünde de düşmeye başlamıştır (Olarte et al., 2000). Laktik floradaki bu düşüşün sebebi peynirde ortaya çıkan düşük su aktivitesidir (Tornadijo, 1995). Olgunlaştırmanın başında laktokok bakterilerinden biri olan *L. lactis* baskın hale gelmiştir. Olgunlaşma süreci boyunca laktokok sayısı düşerken laktobasil sayısı artmış ve *L. plantarum* baskın hale gelmiştir. R'de 30 gün sonunda, RS'de 45 gün sonunda ortamda laktokok bakterilerinden bulunmamaktadır (Olarte et al., 2000). Laktobasillerin ortamda baskın hale geçmelerinin ve yaşamlarını sürdürmelerini düşük pH'lara olan dayanıklılıklarından kaynaklanmaktadır (McDonald et al., 1990).

5. SONUÇ

Stafilokokal enfeksiyonlara ve ekonomik kayıplara sebep olan *S aureus*'un süt veren hayvanların süt üretimini ve süt protein kalitesini düşürdüğü bilinmektedir. Gıda hijyenine yeteri kadar özen gösterilmemesi sonucu *S. aureus* tarafından üretilen enterotoksinler gıda zehirlenmelerine sebep olmaktadır. Süt ve süt ürünlerinin ısıtma işlemi uygulanmaması ya da yetersiz uygulanması, gıda hijyenine dikkat edilmemesi ile birlikte kontaminasyon sonucu gıdaların tüketilmesi stafilokokal enfeksiyon riskini bir hayli artırmaktadır.

Süt ve süt ürünleri özellikle çocuklar için önemli ve her yaşta insanın tüketmesi zorunlu, sağlık açısından sayısız yararları olan bir gıdadır. Canlılar açısından çok yararlı olan bu ürün mikroorganizmaların gelişimi için de uygun bir ortamdır. Yüksek kalitede ve güvenilirlikte ürün, en üst düzeyde mikrobiyolojik kaliteye ihtiyaç duymaktadır. Sütün üretim zincirinde hayvandan süte sağımından son ürün çıkışına, dağıtımından satışına kadar ki tüm basamaklarda gıda hijyenine dikkat edilmesi gerekmektedir.

Günümüzde modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep artışı dolayısıyla, laktik asit bakterileri potansiyel gıda koruyucusu olarak önemini halen sürdürmektedir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel özelliklerinden yararlanarak gıda patojenlerinden korunması ve raf ömrünün artırılması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte gıda değerlerinde en az düzeyde zarara sebep olup en yüksek düzeyde gıda güvenliği ve mikrobiyolojik kalite sağlayabilmek için özellikle süt ve süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel özelliklerinden yararlanılmaktadır. İnsan sağlığına birçok yararı olan laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antagonistik aktivite, ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktivitesinden, bu metabolitlerden yalnızca birinin değil, bir kaçının ortak etkisinin sorumlu olduğu kabul edilmelidir. Bu kombine etki dolayısı ile, laktik asit bakterileri çeşitli gıdaların muhafazasında önemli rol oynamaktadır.

Laktik asit bakterilerin antimikrobiyel özellikleri laboratuvar ortamında yapılan well-difüzyon yöntemi ile besiyeri kültürel ekimi sonucu alınan sonuçlar ile gıda ortamında elde edilen antimikrobiyel etki sonuçları ile farklılık göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan *L. plantarum* bakterisinin peynir ortamında *S. aureus*'un gelişimi üzerine etkisi gözlenmemiştir. Sütün fermantasyon ürünü olan peynir, içerisinde *L. plantarum*'un çalışmasını engelleyici peynirin doğal yapısında bulunan fakat bu laktik asit bakterisine inhibitör etki eden maddeler bulundurduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan *L. plantarum* BG33'ün, *S. aureus*'u engelleyebilecek düzeyde laktik asit, asetik asit üretmediği dolayısı ile ortam pH'sının istenen seviyelere düşmemesi kaynaklı antimikrobiyel aktivitenin yeterli miktarda sağlanamadığını akla getirmektedir. Yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde genel olarak araştırmaların gıda ortamında değil laboratuvar ortamında optimize edilmiş koşullar altında yapıldığı görülmüş ve laktik asit bakterilerinin patojenlere olan inhibisyon etkilerinin optimize koşullar altında çok daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca patojenleri inhibe etmek için yapılan birçok çalışmada sadece bakterinin organik asit, CO₂, alkol, H₂O₂, diasetil oluşturma ve pH düşürme gibi özelliklerinden değil, bunların yanı sıra patojenleri inhibe edici destek maddeler kullanılmıştır. Çalışmalarda bakteri inhibisyonu için daha etkili bir yöntem olan bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri kullanılmış ve belirgin ölçüde bakteri inhibisyonu sağlanmıştır.

Yaptığımız çalışma, ülkemizden izole edilen bakteri suşları için yapılacak çalışmalara örnek teşkil edebilecek bir çalışmadır. Tüm laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı aynı ölçüde antimikrobiyel etkiye sahip olamamaktadır. Daha önce üzerinde çalışılmamış ve özellikleri tamamen ortaya çıkarılmamış olan bir suş olmasından dolayı bakterinin Beyaz peynir ortamında gösterdiği etkiler çalışmamızla birlikte gösterilmiştir. Aynı zamanda bu araştırmada doğrudan laktik asit bakterisinin peynir ortamına ekilerek yapılması kısmen de olsa bir etki gözlenmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda *L. plantarum* BG33'ün *S. aureus*'a karşı olan antimikrobiyel aktiviteyi arttırabilmek amacıyla, inhibisyonu sağlayıcı bazı bileşenler ya da bakteriyosin üreten ek bir suşun eklenmesi, ortam pH'sını daha fazla

düşürebilecek ortam şartlarının sağlanması ile birlikte antibakteriyel etki yaratılabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile probiyotik laktobasillerin bazı peynir çeşitlerinin üretiminde başarıyla kullanılabileceği belirlenmiştir. Ülkemizde konu ile ilgili çalışmalar oldukça yetersizdir. Peynir endüstrisinde dünya üzerindeki yeni eğilimler göz önüne alınarak, ülkemizde en çok üretilen peynir türlerinin probiyotik kültürlerden yararlanılarak üretimi, ülkemiz insanının sağlıklı bir şekilde beslenmesini teşvik edeceği açıktır. Bunun yanında böyle bir girişim sadece sağlık ve beslenme açısından değil, ülkemiz peynir endüstrisinin ürün yelpazesini genişletecek ve değeri arttırılmış peynir türlerinin imalatı ve satışı peynir üreticilerinin piyasadaki pazar payını da arttıracaktır.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akçelik, M., Şanlıbaba, P., 2000, Çiğ Süt ve Peyniraltı Sularından İzole Edilen Laktokokların Faj Duyarlılıkları. *Turk J Biol.*, 24, 425–435.
- Akçelik, M., Tükel, Ç., 2000, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Plazmidlerinin Tanımlanması, *Turk J Biol.*, 24, 405–424.
- Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A. A., Lammler, C., Wolter, W. and Zschöck, M., 2001, Toxin Genes and Other Characteristics of *S. aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(5): 959–964.
- Alarcon, B., Vicedo, B., and Aznar, R., 2006, PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food, *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 352-364.
- Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., Teixeira, P., 2007, Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. *Meat Science* 76(4), 796–800.
- Alting, A.C., Engels, van Schalkwijk, W.S., Exterkate, F.A., 1995. Purification and Characterization of Cystathionine (beta)-Lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and Its Possible Role in Flavor Development in Cheese, *Appl Environ Microbiol.*, 61(11), 4037–4042.
- Ammendolia, M.G., Rosa, D.R., Montanaro, L., Arciola, C.R., Baldassari L., 1999, Slime Production and Expression of the Slime Associated Antigen by Staphylococcal Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 37(10), 3235-3238.
- Amorena B., Gracia E., Monzon M, Levia J., Otezia C., Perez M., Alabart J.L., Yago J.H., 1999, Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro, *J. Antimicrob. Chemother.*, 44(1), 43-55.
- Anas, M., Rizk, H.A., Eddine, H.,J., Ahmed, K., Mebrouk, K., 2008, Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat’s Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 3 (2), 39-49.
- Asmahan, A.,A., 2010, Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health: A Review. *Research Journal of Microbiology*, 5(12) 1213-1221
- Atanassova, M. R., Chipeva, V., Ivanova, I., Haertle, T. 2001, Determination of the Growth Stages of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 from

- Bulgarian Yellow Cheese by Electroconductivity. *J. Microbiol. Methods* 46: 227-233.
- Attarie, R., Whalen, P.J. Shahani, K.M. (Vic), and Amer, M.A., 1987, Inhibition of growth of *S. aureus* during production of acidophilus yogurt. *J. Food Prot.*, 50(3): 224-228.
- Auldish, M.J., Coats, S., Sutherland, B.J., Mayes, J.J. and McDowell, G.H., 1996, Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 63(2), 269-280.
- Auldish, M.J., Walsh, B.J., and Thomson, N.A., 1998, Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J. Dairy Res.*, 65(3), 401-411
- Banks, J.M., Tamime, A. Y., 1987, Seasonal trends in the efficiency of recovery of milk fat and casein in cheese manufacture, *International Journal of Dairy Technology*, 40(3), 64–66.
- Barbano, D.M., Rasmussen, R.R. , Lynch J.M. , 1991, Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *J. Dairy Sci.*, 74(2), 369–388.
- Beresford, T., Williams, A., 2004, The microbiology of cheese ripening. in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox, P. F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T. M., and Guinee, T. P., (eds). Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. pp: 287–318.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001, Recent advances in cheese microbiology, *International Dairy Journal*, 11(4), 259–274(16).
- Bergamini, A., Scheidegger, C., Stofer, S., Carvalho, P., Davey, S., Dietrich, M., Dubs, F., Farkas, E., Groner, U., Karkkainen, K., Keller, Lökös, L., Lommi, S., Maguas, C., Mitchell, R., Pinho, P., Rico, V.J., Aragon, G., Ruscott, A.M., Wolseley, P., and Watt, A., 2005, Performance of Macrolichens and Lichen Genera as Indicators of Lichen Species Richness and Composition, *Conservation Biology*, 19(4), 1051–1062.
- Bley, M., E., Johnson, M., E., and Olson, N., F., 1985, Factors Affecting Nonenzymatic Browning of Process Cheese, *J. Dairy. Sci.*, 68(3), 555-561.
- Bone, F.J., Bogie, D., Morgan-Jones, S.C., 1989, Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. *Epidemiol. Infect.*, 103(3), 449–458.

- Cai, H., Rodriguez, B.T., Zhang, W., Broadbent, J.R., and James L. Steele, 2007, Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 153(8), 2655–2665.
- Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Shook, G.E., Ruegg, P.L., 2005, Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and Jersey cattle using survival analysis methodology, *J. Dairy Sci.* 2005, 88(2), 804–811.
- Caridi, A. 2003, Identification and First Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Artisanal Ovine Cheese Pecorino del Poro. *Int. J. Dairy Technol.*, 56 (2): 105-110.
- Chen, H., and Hoover, D.G., 2003, Bacteriocins And Their Food Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82-100.
- Chesters, J.K., 1996, Polymerase chain reaction, *Proceedings of the Nutrition Society*, 55(1B), 599-604.
- Coda, R., Brechany, E., De Angelis, M., De Candia, S., Di Cagno, R. and Gobbetti, M., 2006, Comparison of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile Characteristics of Nine Italian Ewes' Milk Cheeses, *J. Dairy Sci.*, 89(11), 4126–4143.
- Cookson, B., Schmitz, F.J., and Fluit, A. C., 2003, Introduction to MRSA. In, *MRSA: Current Perspective*. Fluit, A.C., Schmitz, F.J., (Eds.). Horizon Scientific Press, Norfolk, England, 340 pp.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B., 2005, Development of a multiplex PCR assay for the identification of *S. aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes*, 19(5), 299–305.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M., and Castiglioni, B., 2007, Detection of enterotoxigenic *S. aureus* isolates in raw milk cheese, *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 45(6), 586–591.
- Danil, M., 2000, Lactic acid bacteria from fish products and its anti bacterial activity assay on spoilage and pathogenic bacteria. *Jurnal Penelitian Pertanian*, 19(1), 7-20.
- De Vries, M.C., Vaughan, L.E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., 2006, *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic

- properties in the human intestinal tract, *International Dairy Journal* 16 (2006)9, 1018–1028.
- De Vuyst, L. and Leroy, F., 2007, Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199.
- Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Peres, C., Figueiredo Marques, J., 2001, Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives, *Le Lait*, 81(1-2), 203–215
- Donaghy, J.A., Totton, N.L. and Rowe, M.T. 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Applied and Environ. Microbiol.*, 70(8), 4899-4905.
- Donnelly, C.W. 2005, The pasteurization dilemma, *American Farmstead Cheese*, Kindstedt, P.S., (ed.), Chelsea Green Publishing, White River Jct., VT, pp. 173-195.
- Donnelly, C.W., 2001, Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw milk: a review. *Bull. IDF*, 369, 16±27.
- Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois C.M., and Pennec, J.P., 1991, Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus Zuctis* strain and purification of the inhibitory peptide, *Journal of General Microbiology*, 137, 2423-2429.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., 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.
- Düsterhöft, E.M. and van den Berg, G., 2007, Gouda and Related Cheeses, In: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd Ed. Vol. 2 Major Cheese Groups, Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., (Eds). Elsevier Academic Press, pp. 103-140.
- Ennahar, S., Assobhei, O., Hasselmann, C., 1998, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer, *J Food Prot*, 61(2), 186-191(6).
- Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V., and Coppola, S., 2004, PCR-based detection of enterotoxigenic *S. aureus* in the early stages of raw milk cheese making, *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1090–1096.

- Ercolini, D., Hill, P.J., and Dodd, C.E.R., 2003, Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3540–3548.
- FAO/WHO report, 2001, Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M., and Licitra, G., 2007, Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006, *J. Dairy Sci.* 90(12), 5798–5813.
- Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H., 1997, Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening, in *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn, Law, B.A., (ed.), Chapman and Hall, London. 1-49 pp.
- Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H., 1998, *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (Eds.), NY 146-236 pp.
- Fox, P.F., 1999, Cheese: An Overview, *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*, Volume 1, General Aspects, 2nd ed., Fox, P.F., An Aspen Publication, England. 11-54 pp.
- Fuller, R., 1999, Probiotics for farm animals. In: Tannock, G. W. (Ed.), *Probiotics: a critical review*, Horizon Scientific Press. Wymondham, UK, 15-22pp.
- Gaudana, S. B., Dhanani A. S., and Bagchi, T., 2010. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin, *British Journal of Nutrition*, 103(11), 1620–1628.
- Gelinski, J.M.L.N., Gatti, D.J., Bordignon Junior S.E., 2010. Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from artisan italian salami, *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, 13(1), 18-22,.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán G., Valdez G.F., 2009, Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties, *Food Control*, 20, 144–148.
- Gill, A.O. and Halley, R.A, 2003, Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 251-259.
- Gillor, O., 2007, Bacteriocins, *Ecology and Evolution*, Riley M.A., Chavan M.A., (eds)., Springer, London, England, 135-143 pp.

- Gilmour, A. and Harvey, J., 1990, Staphylococci in milk and milk products. *Journal of Applied Microbiology*, 69 ISS(19), 147S-166S.
- Gobbetti, M. and Di Cagno, R., 2002, Hard Italian cheeses. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski, H., Fox, P.F. and Fuquay, J.W. (Eds.), Academic Press, London, 378-385 pp.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F. X. 1998, Development of Probiotic Cheese Manufactured From Goat Milk: Response Surface Analysis Via Technological Manipulation, *J. Dairy Sci.*, 81(6), 1492-1507.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 1999, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics, *Trends in Food Sci. & Technol.*, 10(4-5), 139-157.
- Graber, H.U., Casey M. G., Naskova J., Steiner, A., Schaeren W., 2007, Development of a Highly Sensitive and Specific Assay to Detect *S. aureus* in Bovine Mastitic Milk, *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4661-4669.
- Guinee, T. P. 2007, *Cheese Problem Solved*, McSweeney, P. L. H., (Ed). CRC Press LLC, USA, 69 pp.
- Gülseren, A., 2008, Et ve fermente et ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus* suşlarının moleküler ve biyokimyasal identifikasyonu ve bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Bursa, 11s.
- Gursoy, O., and Kinik, Ö., 2006. Probiotics: A New Popular Option for Cancer Inhibition. *International Journal of Dairy Science*, 1(1), 100-103.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2005. Laktobasiller Ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(3), 361-371.
- Hadidi A., Levy, L., Podleckis, E.V., 1995, Polymerase chain reaction technology in plant pathology. *Molecular Methods in Plant Pathology*. Singh, R.P., Singh U.S. In Singh, R.P. and Singh, U.S., (Eds.), CRC/Lewis, Boca Raton, FL, 167-187 pp.
- Halkman, K., Aslım, B., Beyatlı, Y., 2000, Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi, *Turk J. Biol.*, 24, 65–78.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T. R., 1989, Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52, 384-387.

- Havenaar R., Brink, B.T., and Huis in't Veld, J.H.J., 1992, Selection of strains for probiotic use, Probiotics. Fuller, R., (Ed.), Chapman and Hall. London. 209-224.
- Hayaloglu A.A., Guven M., Fox P.F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese "Beyaz Peynir", Int. Dairy J., 12(8), 635–648.
- Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H., 2005. Influence of Starters on Chemical, Biochemical, and Sensory Changes in Turkish White-Brined Cheese During Ripening, J. Dairy Sci., 88:3460–3474
- Hayaloğlu, A.A., 2003, Influence of the strain of Lactococcus used as a starter on the characteristics and ripening properties of Turkish white cheese. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi. Adana.
- Hayaloğlu, A.A., Özer, B.H., Fox, P.F., 2008, Cheeses of Turkey: 2. Varieties ripened under brine, Dairy Sci. Technol., 88(2), 225–244 s.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl E., and Wagner, M., 2001. Comparison of Different Approaches To Quantify *Staphylococcus aureus* Cells by Real-Time Quantitative PCR and Application of This Technique for Examination of Cheese, Applied And Environmental Microbiology, 67(7), 3122–3126.
- Helander, I.M., von Wright A., and Mattila-Sandholm, T-M., 1997, Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria, Trends in Food Science and Technology, 8(59), 146-150.
- Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castrob, J.M., Fresnoa, J.M., Tornadijoa M.E., 2005, Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese), Food Microbiology 22 (5), 455–459.
- Hogeveen, H., 2005, The 4th IDF International Mastitis Conference or: All there is to learn about mastitis, International Dairy Federation Mastitis Newsletter, 26/2005, 7-8s.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001, Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am J Clin Nutr., 73(2 Suppl), 365S–373S.
- Hoover, D.G. and Harlander, S.K., 1993, Screening Methods for Detecting Bacteriocin Activity, In D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds.). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic press, Inc., London, 23-39 pp.

<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA>
F6AA849816B2EF8C0C1EF3BB3C9381

Hugenholtz, J., 2008, The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production, *International Dairy Journal*, 18(5), 466–475

Innis, M.A. and Gelfand, D.H., 1990, Optimization of PCRs. In: Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (Eds.). *PCR protocols A guide to methods and applications*. Academic Press. 3-12 pp.

ISO/FDIS: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. ISO 6888-1.

Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2001, Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf (2012)

Jorgensen, H. J., Mork, T., Rorvik, L. M., 2005, The Occurrence of *Staphylococcus aureus* on a Farm with Small-Scale Production of Raw Milk Cheese, *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3810-3817.

Kalalou, I., Zerdani, I., Faid, M., 2010, Antagonistic Action of Biopreservative *Laktobasil plantarum* Strain on Pathogenic E. coli O157:H7 in Fresh Camel Meat Stored at 10°C. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 5(1), 07-13.

Kalavrouziotti, I., Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N., 2005, Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts, *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 30-38.

Kelly, P.M., 2007, *Cheese Problem Solved*, McSweeney, P. L. H., (Ed). CRC Press LLC, USA, 50-69 pp.

Khalil, R., Mahrous, H., El-Halafawy, K., Frank, J. An El Soda, M., 2007, Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African J. Biotechnolol.*, 6 (7), 939-949.

Kılıç, S., 2001, Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları. 37-59 s.

- Kindstedt, P., 2004, Views on raw milk cheese: why raw milk cheeses are worth saving. Cheese Reporter Part 1, pp. 4 and 10, Part 2, pp.4.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Klein Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Nierop Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., and Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1, Proc Natl Acad Sci U S A.; 100(4), 1990–1995.
- Kloos, W. and Bannerman, T.L., 1995, Staphylococci and Micrococci. In; Manual of Clinical Microbiology, 6. Ed. Eds. P.A. Murray, B.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover. ASM press, Washington D.C, 1482 pp.
- Küçükçetin, A. ve Milci S., 2008, *Staphylococcus aureus* ile Kontamine Olan, Peynirlerden Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri, Gıda, 33(3), 129-135.
- Kumar, R., Grover, S., and Batish, V.K., 2011, Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague–Dawley rats, British Journal of Nutrition, 105(4), 561–573.
- Lane, C. N., Fox, P. F., 1996, Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. Int. Dairy J., 6(7), 715-728.
- Lantz, P.G., Hahnhagerdal, B., and Radstrom, P., 1994. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. Trends in Food Science and Technology, 5(12), 384-389.
- Law B.A., 1997, Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, Law, B.A. (Ed.). Chapman & Hall. London, 22-96 pp.
- Law, B.A. and Kolstad J., 1983, Proteolytic systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 49(3), 225-245.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., and Montville T. J., 1991, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57(6), 1683–1688.
- Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M. and Ariff, A. B., 2009, Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. Malaysian Journal of Microbiology, 5(1), 33-37.
- Loir, L.Y., Baron F., and Gautier M., 2003, *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. Genetics and Molecular Research 2 (1), 63-76.

- Lowy, D.F., 1998, *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med., 339(8), 520-532.
- Lucey, J.A. and Fox, P.F., 1993, Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. J. Dairy Sci., 76(6), 1714-1724.
- Lucey, J.A., 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. J. Dairy Sci., 85(2), 281-294.
- Lucey, J.A., Johnson, M.E., and Horne, D.S., 2003. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese, J. Dairy Sci., 86(9), 2725–2743
- Maaiké C., de Vries, Elaine E. Vaughan, Michiel Kleerebezem, Willem M. de Vos 2004, Optimising single cell activity assessment of *Lactobacillus plantarum* by fluorescent in situ hybridisation as affected by growth Journal of Microbiological Methods, 59(1), 109–115.
- Mackie and McCartney, 1989. *Staphylococcus aureus*. Practical Medical Microbiology. Collee, J.G., Duguid, J.P., Fraser, A.G., Marmion, B.P., (Eds). 13 th Edition, Churchill, Livingstone. 305-311 pp.
- Madkor, S.A., Tong, P.S., El Soda, M., 2000, Ripening of Cheddar Cheese With Added Attenuated Adjunct Cultures of Lactobacilli. J. Dairy Sci. 83(8), 1684-1691.
- Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960, A Medium for the Cultivation of Lactobacilli, J. Appl. Bact., 23(1), 130-135.
- Marie-Therese Fröhlich-Wyder and Hans-Peter Bachmann, 2008, Swiss Cheese, Technical-scientific information, ALP science, No. 518, 1-17 pp.
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M., 1990, Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology, 56(7), 2120–2124.
- McSweeney, P. L. H., 2007, Cheese problem Solved, McSweeney, P. L. H., (Ed). CRC Press LLC, USA, 50-51 pp.
- McSweeney, P.L.H. and Fox, P.F., 2004, Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate, in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1 General Aspects, 3rd edn, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee (Eds.), Elsevier Academic Press, Amsterdam, 361-371 pp.
- McSweeney, P.L.H., 2004, Biochemistry of cheese ripening, International Journal of Dairy Technology, 57(2/3), 127-144.

- Moat, A.G. and Foster, J.W., Spector, M.P., 2002, *Microbial Physiology*, 4th Edition, Wiley-Liss Inc. New York, 13-17 pp.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O., Yadav, H., 2008, Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria, *Journal of Digestive Diseases*, 9(4), 190–198.
- Molin, M., 2003, The Role of *Lactobacillus plantarum* in Foods and in Human Health, In: *Handbook of Fermented Functional Foods*. Farnworth, E.R., (Ed), CRC Press. 305–342 pp.
- Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M., 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M., (eds). Wiley-Blackwell, Iowa, USA. 179-181, 184 pp.
- Mullis, K.B., 1990, The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, *Scientific American*, 264(4), 56-61, 64-65.
- Musa, H.H., Wu, S.L., Zhu, C.H., Seri, H.I., Zhu, G.Q., 2009, The potential benefits of probiotics in animal production and health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 313-321.
- National Mastitis Council. 1987, *Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis*. Natl. Mastitis Counc., Inc., Arlington, VA.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Palop, L., Cabezas, L., 2009, Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1505-1517.
- Niku-Paavola, M.-L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., and Haikara, A., 1999, New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 29–35.
- Nitisingprasert, S. , Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. and Sonomoto, K. 2000, Screening and identification of effective thermotolerant Lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*. 34(3), 387-400.
- Obadina A.O., Oyewole O.B., Sanni L.O. and Tomlins K.I., 2006, Bio-preservative activities of *Lactobacillus plantarum* strains in fermenting Cassava 'fufu' *African Journal of Biotechnology*, 5(8), 620-623.

- Oh, S., Kim, S.H. and Worobo, R.W., 2000, Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J.Dairy Sci., 83(12), 2747-2752.
- Olarte, C., Sanz, S., Gonzalez-Fandos, E., and Torre, P., 2000, The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). Journal of Applied Microbiology, 88(3), 421–429.
- Ollis, G.W., Rawluk, S.A., Schoonderwoerd, M., Schipper, C., 1995, Detection of *S. aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. Can Vet J., 36, 619-623
- Ortalani, M. B. T., Moreas P. M., Perin, L. M., Viçosa, G. N., Carvalho, K. G., Silva Junior A., Nero, L. A., 2010, Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese, Journal of Dairy Science, 93(7), 2880-2886.
- Özdemir, H., Gücükoğlu, A. and Pamuk, S., 2006, Effects of cetylpyridinium chloride, lactic acid and sodium benzoate on populations of *Listeria monocytogenes* and *S. aureus* on beef. J. Food Saf., 2 (11), 41-48.
- Özer B.H., Atamer M., Turkoglu H., Senel E., Kirmaci H.A., Oztekin S., 2006, Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *B. bifidum* BB-12 microencapsulated by emulsion or extrusion techniques in white brined Turkish cheese, TUBITAK Project No: TOVAG 3227, Final Report.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2007. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey, Le Lait, 87(6), 521-534.
- Paul, E., W., 2003, Fundamental Immunology, Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 407-422.
- Puertollano, E., Puertollano, M.A., Cruz-Chamorro, L., de Cienfuegos, G.A., Ruiz-Bravo, A., and de Pablo, A.M., 2008, Orally administered *Lactobacillus plantarum* reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from *Listeria monocytogenes* infected mice British Journal of Nutrition, 99(04), 819–825.
- Quere, F., Desschamps A., and Urdaci C., 1997, DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*, Journal of App. Microbiology, 82(6), 783-790.

- Raubertas. R.F., and G.E. Shook, 1982, Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield, *J. Dairy Sci.*, 65(3), 419-425.
- Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L., 1998, Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1134-1137.
- Riley, M.A., 2011, Prokaryotic Antimicrobial Peptides, from genes to applications. Drider, D., Rebuffat, S., (Eds). Springer, London, England. 13-100 pp.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., 1985, Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Schrack F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowler, H.H., Oliver, S.P., 2001, Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.*, 84(6) 1407–1412.
- Sheehan, J. J., 2007, Cheese Problem Solved, McSweeney, P. L. H., (Ed). CRC Press LLC, USA, 36-37pp.
- Smit, B.A., Johan E. T., Vlieg, van H., Wim J. M. Engels, Meijer, L., Jan Wouters, T.M., and Smit, G., 2005, Identification, Cloning, and Characterization of a *Lactococcus lactis* Branched-Chain -Keto Acid Decarboxylase Involved in Flavor Formation, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 303–311.
- Smith K.L., and Hogan, J.S., 2008, Environmental Mastitis: Know Your Opponent, NMC Regional Meeting Proceedings.
- Somoro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K., 2002, Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in food preservation and human health-A review. *Pak. J. Nut.*, 1 (1), 20-24.
- Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M., and Mikelsaar, M., 2004, A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *J. Dairy Sci.*, 87(7), 2017–2023.
- Stapleton, P.D., Taylor, P.W., 2002, Methicilin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Modulations, *Science Progress*, 85(Pt 1), 57-72.
- Su, Y.C. and Ingham, S.C., 2000, Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 54(3), 147-154.

- Taban, B., 2007, İmmünomanyetik Ayırma-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İMA-PZR) Yönteminin Uygulanması ile Tavuk etlerinde Salmonella spp. Belirlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 25-40s.
- Theron, M.M., 2011, Organic Acid and Food Preservation, Theron, M.M., Rykers Lues, J.F., (eds)., CRC Press Taylor&Francis Group, USA. 1-50 pp.
- Tornadajo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martin, R. and Carballo, J., 1995, Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). Le Lait 75(6), 551–570.
- Toufeili I., Ozer B.H., 2006. Brined Cheeses from the Middle East and Turkey, in: Tamime A.Y. (Ed.), Brined Cheeses, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 188–210 pp.
- Tuckey, S.L., Stiles, M.E., Ordal, Z.J. and Witter, L.D., 1964, Relation of cheese making operations to survival and growth of *Staphylococcus aureus* in different varieties of cheese. Journal of Dairy Science 47(6), 604–611.
- Tükel, Ç. ve Doğan, H.B., 2000, *Staphylococcus aureus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 81-184 s.
- Tuncer, Y., Özden, Ö., Akçelik, M., 2008. Tulum Peynirlerinden İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBML9 ve YBML21 Suşları Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Kısmi Karakterizasyonları, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(2),141-148.
- Türkoğlu, H., Atasoy, F., Özer, B., 2003, Şanlıurfa İlinde Üretilen Ve Satışa Sunulan Süt Yoğurt Ve Urfa Peynirlerinin Bazı Kimyasal Özellikleri, HR. Ü.Z.F.Dergisi, 7 (3-4), 69-76.
- Upadhyay, V.K., MCSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A. and Fox, P.F., 2004. Proteolysis in cheese during ripening, in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume1 General Aspects, 3rd edn, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P.Guinee (Eds.), Elsevier Academic Press, Amsterdam, 392-433 pp.
- Uymaz, B. Ve Akçelik, M., 2009. Probiyotik Özellik Taşıyan Gıda ve İnsan Kaynaklı Laktobasillerin İzolasyonu Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Vignolo, G. and Castellano, P., 2004, Meat–model system development for antibacterial activity determination. Methods Mol. Biol., 268(5), 367-370.

- Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J. A. 2000, Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco cheese. J. Dairy Sci. 83(9), 1905-1911.
- Wang, R.F., Cao, W.W., Cerniglia C.E., 1997, A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods, Journal of Applied Microbiology, 83(6), 727-736.
- Wilson D.J., Gonzalez, R.N. , Das, H.H., 1997, Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. J. Dairy Sci., 80(10), 2592–2598.
- Wilson, A.R., Sigee D., and Epton, H.A.S., 2005, Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production, Journal of Applied Microbiology, 99, 1516–1522.
- Wishah, R., 2007, Peynir üretiminde starter kültürlerle ek olarak bazı bakteri suşlarının kullanımı ve bunun peynir özelliklerine etkisi, Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Anabilim Dalı, Doktora tezi, 1-22s.
- Wongsuttichote, K., Nitisinprasert, S., 2009, Identification of Antimicrobial Substance Producing Lactic Acid Bacteria Isolate KUB-KJ174 and Its Application as a Biopreservative Substance for Bakery Products. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43(4), 796 – 807.
- Yıldırım, Y., Sarımehtemtoğlu, B., 2006, Beyaz Peynir Yapımında Bazı Probiyotik Bakterilerin Kullanılmasının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg., 3(1), 1-7.
- Yousef AE, Marth, E.H., 1988, Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese, J. Food Prot, 51(1), 7-13.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meltem Çolaklar

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Yılı : 14 Haziran 1985

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 2000 - 2003 İzmir Bornova Yunus Emre Anadolu Lisesi

Lisans: 2004 – 2009 Hacettepe Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (çok iyi), Almanca (orta)

İş Tecrübesi : Aralık 2010 – Nisan 2011 Üretim Mühendisi

Aynes Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Eylül 2011 – Devam ediyor Kurumsal İlişkiler Sorumlusu

Yaşar Holding A.Ş.

EK 1. EMS Tablosu

Dilüsyonlar			EMS	% 95 Güvenlik Sınırları	
10 mL	1 mL	0.1 mL		En az	En çok
0	0	0	>0,02	-	-
1	0	0	0,02	<0,01	0,13
1	1	0	0,04	0,01	0,16
1	1	1	0,06	0,02	0,19
2	0	0	0,04	0,01	0,18
2	1	0	0,07	0,02	0,21
2	1	1	0,09	0,03	0,25
2	2	0	0,09	0,04	0,25
2	2	1	0,12	0,05	0,28
2	2	2	0,14	0,06	0,32
3	0	0	0,08	0,03	0,24
3	1	0	0,11	0,04	0,29
3	1	1	0,14	0,06	0,33
3	2	0	0,14	0,06	0,33
3	2	1	0,17	0,08	0,38
3	2	2	0,2	0,1	0,42
3	3	0	0,17	0,08	0,38
3	3	1	0,21	0,1	0,43
4	0	0	0,13	0,05	0,34
4	1	0	0,17	0,07	0,4
4	1	1	0,21	0,1	0,47
4	2	0	0,22	0,1	0,48
4	2	1	0,26	0,13	0,55
4	2	2	0,32	0,16	0,63
4	3	0	0,27	0,13	0,57

Dilüsyon			EMS	% 95 Güvelik Sınırları	
10 mL	1 mL	0.1 mL		En az	En çok
4	3	1	0,33	0,16	0,65
4	3	2	0,39	0,02	0,74
4	4	0	0,34	0,17	0,67
4	4	1	0,4	0,21	0,77
5	0	0	0,23	0,1	0,56
5	1	0	0,33	0,15	0,73
5	1	1	0,46	0,22	0,96
5	2	0	0,49	0,24	1,03
5	2	1	0,7	0,35	1,4
5	2	2	0,94	0,49	1,81
5	3	0	0,79	0,4	1,58
5	3	1	1,09	0,57	2,09
5	3	2	1,41	0,76	2,61
5	3	3	1,75	0,97	3,16
5	4	0	1,3	0,68	2,5
5	4	1	1,72	0,93	3,2
5	4	2	2,21	1,22	3,99
5	4	3	2,78	1,58	4,9
5	4	4	3,45	2,01	5,95
5	5	0	2,4	1,29	4,46
5	5	1	3,48	1,93	6,28
5	5	2	5,42	3,08	9,55
5	5	3	9,18	5,33	15,81
5	5	4	16,09	9,53	27,19
5	5	5	>160,00	-	-