

**T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KARS KAŞARININ MİKROBİYAL FLORASININ ÖN OLGUNLAŞTIRMA
PERİYODU BOYUNCA DEĞİŞİMİ VE GELİŞİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE YUVAŞEN

**Ocak - 2019
BAYBURT**

**KARS KAŞARININ MİKROBİYAL FLORASININ ÖN OLGUNLAŞTIRMA
PERİYODU BOYUNCA DEĞİŞİMİ VE GELİŞİMİ**

AYŞE YUVAŞEN

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Birinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine MACİT
İkinci Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ**

**T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KARS KAŞARININ MİKROBİYAL FLORASININ ÖN OLGUNLAŞTIRMA
PERİYODU BOYUNCA DEĞİŞİMİ VE GELİŞİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe YUVAŞEN

**2019
BAYBURT
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAY SAYFASI

Kars Kaşarının Mikrobiyal Florasının Ön Olgunlaştırma Periyodu Boyunca Değişimi ve Gelişimi

Dr. Öğr. Üyesi Emine MACİT ve Doç. Dr. Enes DERTLİ danışmanlığında, Ayşe YUVAŞEN tarafından hazırlanan bu tez çalışması 15/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İhsan BAKIRCI

İmza

: 

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Emine MACİT

İmza

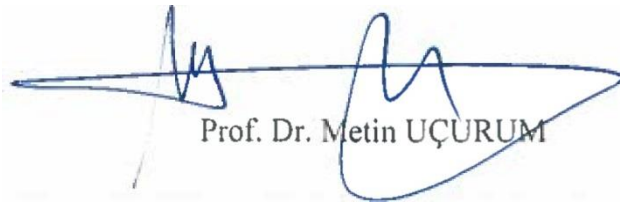
: 

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayla ARSLANER

İmza

: 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.


Prof. Dr. Metin UÇURUM

Enstitü Müdürü V.

Bu çalışma Bayburt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bu çalışmada şahsıma ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ayşe YUVAŞEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARS KAŞARININ MİKROBİYAL FLORASININ ÖN OLGUNLAŞTIRMA PERİYODU BOYUNCA DEĞİŞİMİ VE GELİŞİMİ

Ayşe YUVAŞEN

Bayburt Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Birinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine MACİT
İkinci Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

Kars Kaşarının bozulmadan günümüze kadar ulaşan üretim metodu ile olgunlaşma süresinin uzun sürdüğü bilinmektedir. Olgunlaşma esnasında peynirin yapısında bulunan laktik floranın tespit edilerek peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmasıyla daha kısa sürede olgunlaşma sağlanabileceği ve bunun ürün için oldukça önemli bir gelişme olacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışması Kars kaşarının ön olgunlaşması esnasında yapısında bulunan mikrobiyal floranın tespit edilmesi amacıyla yürütülmüştür.

Tez çalışması kapsamında Kars ilinde farklı üretim noktalarından yeni üretilmiş 6 adet Kars Kaşarı örneği temin edilmiş ve ön olgunlaştırma periyodu boyunca bazı fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik özellikleri ve mikrobiyal floralarında meydana gelen değişim ve gelişim incelenmiştir. Peynir örneklerinden uygun besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra toplam 533 bakteri, maya ve küf izolatu elde edilmiştir. İzolatlara uygulanan RAPD-PCR ve rep-PCR işlemlerinin ardından PCR ürünleri sekans analizine tabi tutulmuştur. Yürütülen bu işlemlerle bakteri, maya ve küf gruplarının tanımlaması yapılmış, böylece peynir örneklerindeki baskın türler belirlenmiş ve bu türler arasındaki filogenetik benzerlikler tespit edilmiştir.

Sonuçta; tanımlaması yapılan 285 adet bakteri izolatının 37'si *Lb. paracasei*, 24'ü *Lb. rhamnosus*, 24'ü *S. thermophilus*, 13'ü *Lb. graminis*, 12'si *Lb. mindensis*, 11'i *Lb. fermentum* ve 8 tanesi *Lb. plantarum* olarak belirlenmiştir. Bu türlerin yanında *E. faecium*, *E. faecalis* gibi NSLAB olabilecek türler diğer bakteri grupları arasında tanımlanmıştır. 168 adet maya-küf florasından 131 tanesinin maya, 37 tanesinin ise küf türü olduğu görülmüştür. Tanımlanan maya izolatlarının 54'ü *P. kudriavzevii*, 11'i *C. parapsilosis*, 24'ü *C. zeylanoides*, 20'si *K. marxionus*, 19'u *K. lactis*, 2'si *D. hansenii* ve 1'i *Y. lipolytica* olarak tespit edilmiştir. Küf izolatlarının ise 23'ü *P. crustosum*, 8'i *P. kewense*, 4'ü *P. commune* ve 2'si *G. candidum* olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Kars Kaşarının ön olgunlaştırma döneminde mikroflorasındaki biyolojik çeşitliliğin varlığını doğrulamış ve mevcut üretim metodunun starter kültür ilavesi ile geliştirilmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

2019, 74 sayfa

Anahtar kelimeler: Kaşar peyniri, Mikrobiyal flora, Ön olgunlaştırma periyodu, Bakteri, Maya-Küf

ABSTRACT

MS Thesis

**CHANGE AND DEVELOPMENT OF MICROBIAL FLORA OF KARS
KASHAR CHEESE DURING PRE-MATURATION PERIOD**

Ayşe YUVAŞEN

Bayburt University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food EngineeringDepartment of Food Engineering
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Emine MACİT
Second Supervisor: Ph. D. Enes DERTLİ

It is known that the ripening of Kars Kashar takes a long time with the production method that has reached to the present day. It is thought that ripening can occur in a shorter time by detecting and using the lactic flora in the structure of the cheese during the ripening period as a starter culture in cheese production and this will be a very important development for the product. This thesis study has been carried out in order to determine the microbial flora found in the structure of Kars kashar cheese during its pre-maturation period.

In the context of the thesis study, 6 Kars kashar cheese samples that had just been produced were obtained from different production places in Kars province and their some physical, chemical, microbiological characteristics and changes and development occurring in microbial flora of them were investigated during the pre-maturation period. After spreading from the cheese samples over appropriate media, a total of 533 bacteria, yeast and mold isolates were obtained. After RAPD-PCR and rep-PCR procedures applied to the isolates, PCR products were subjected to sequence analysis. Through these processes, bacteria, yeast and mold groups were defined, thus predominant species were identified in cheese samples and the phylogenetic similarities between these species were determined.

In conclusion, 285 bacterial isolates identified consisted of 37 *Lb. paracasei*, 24 *Lb. rhamnosus*, 24 *S. thermophilus*, 13 *Lb. graminis*, 12 *Lb. mindensis*, 11 *Lb. fermentum* and 8 *Lb. plantarum*. In addition to these species, species like *E. faecium*, and *E. faecalis* that may be NSLAB were identified among other bacterial groups. Of the 168 yeast-mold flora, 131 were found to be yeast and 37 were mold. Of the yeast isolates identified, 54 were *P. kudriavzevii*, 11 were *C. parapsilosis*, 24 were *C. zeylanoides*, 20 were *K. marxionus*, 19 were *K. lactis*, 2 were *D. hansenii* and 1 were *Y. lipolytica*. Of the mold isolates, 23 were identified as *P. crustum*, 8 as *P. kewense*, 4 as *P. commune* and 2 as *G. candidum*. These results have confirmed the existence of biodiversity in the microflora of Kars Kashar during the pre-maturation period and revealed the necessity of developing the current production method with the addition of starter culture.

2019, 74 pages**Keywords:** Kashar cheese, microbial flora, pre-maturation period, bacteria, yeast-mold

TEŞEKKÜR

Yürütmeye çalıştığım yüksek lisans eğitimimin ders aşamasından, tez konusu seçimine, analizlerin yürütülmesinden tezin yazımına kadar tüm aşamalarında benden bilimsel ve hayati tecrübelerini, bilgi birikimlerini esirgemedi her daim yardımcı olan, süreç boyunca bana karşı olan desteklerini ve inançlarını kaybetmeyen çok değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine MACİT ve Sayın Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye en içten ve samimi duygularıyla teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında desteklerini ve yardımlarını eksik etmeyen kıymetli arkadaşlarım Zühal ALKAY, Fatma Nur DEMİRBAŞ ve Hümeysra İSPİRLİ'ye yaptıkları her şey için çok teşekkür ederim.

En çok da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bana karşı duydukları güven ve inançlarıyla her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız....

Tüm bunların en başında bana doğumumdan şu anıma kadar her türlü nimeti sunan karşılığında hiçbir ücret talep etmeyen yalnızca kulluk bekleyen, onu dahi yapmadığımda benden rahmetini ve merhametini esirgemeyen asıl hak sahibine sonsuz hamd ve şükürler olsun.

Ayşe YUVAŞEN

Ocak /2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
3. MATERYAL YÖNTEM	14
3.1 Materyal	14
3.1.1 Kars kaşarı örnekleri	14
3.1.2 Besiyerleri	14
3.1.3 Primerler	14
3.2. Yöntem	15
3.2.1 Fiziksel ve kimyasal analizler	15
3.2.1.1 Kurumadde tayini	16
3.2.1.2 Kül tayini	16
3.2.1.3 Yağ tayini	16
3.2.1.4 Titrasyon asitliği tayini	17
3.2.1.5 Tuz tayini	17
3.2.1.6 pH tayini	17
3.2.2 Mikrobiyolojik analizler	18
3.2.2.1 Dilüsyon hazırlama	18

3.2.2.2	Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı	18
3.2.2.3	Laktobasillerin sayımı	18
3.2.2.4	Laktokokların sayımı	18
3.2.2.5	Maya ve küf sayımı	19
3.2.2.6	<i>Staphylococcus aureus</i> sayımı	19
3.2.3	Bakteri ve maya-küf izolasyonu	19
3.2.3.1	Laktobasil ve Laktokok bakterilerinin izolasyonu ve geliştirilmesi	19
3.2.3.2	Maya ve Küflerin izolasyonu ve geliştirilmesi	20
3.2.4	İzolatların stoklanması ve depolanması	20
3.2.5	Laktobasil ve Laktokokların fenotipik olarak tanımlanması	20
3.2.5.1	Kolonilerin morfolojik olarak tanımlanması	20
3.2.6	Laktobasil ve Laktokokların genotipik olarak tanımlanması	21
3.2.6.1	Fenol-kloroform:izoamil alkol ile DNA izolasyonu.....	21
3.2.6.2	RAPD-PCR analizi ile bakterilerin genotipik karakterizasyonu	21
3.2.6.3	16S rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması	22
3.2.7	Maya ve Küflerin genotipik olarak tanımlanması	22
3.2.7.1	Fenotipik ayırım	22
3.2.7.2	rep-PCR analizi ile maya ve küflerin genotipik karakterizasyonu.....	23
3.2.7.3	23S rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması	23
3.2.8	PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve UV görüntüleyicide görüntülenmesi	24
3.2.8.1	Sekans analizi	25
3.2.9	İzole edilen bakteri, maya ve küflerin filogenetik analizi	25
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1	Kaşar Peyniri Örneklerine Ait Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları....	26
4.2	Kaşar Peyniri Örneklerinin Bazı Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	28

4.2.1 Kaşar peyniri örneklerinin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı.....	28
4.2.2 Kaşar peyniri örneklerinin Laktobasil sayısı (log kob/g)	30
4.2.3 Kaşar peyniri örneklerinin Laktokok sayısı (log kob/g)	32
4.2.4 Kaşar peyniri örneklerinin Maya-Küf sayısı (log kob/g)	33
4.2.5 Kaşar peyniri örneklerinin <i>Staphylococcus aureus</i> sayısı (log kob/g).	37
4.3 Kaşar Peyniri Örneklerinden Bakteri ve Maya-Küf İzolasyonu	39
4.3.1 İzole edilen bakteri ve maya-küf türlerinin tanımlanması	39
4.3.1.1 RAPD-PCR ve rep-PCR ile genotipik karakterizasyon	39
4.3.1.2 Kaşar peynirlerinden izole edilen bakteri ve maya-küf türleri	41
4.3.2 Bakteri ve mayalara ait filogenetik benzerlikler	46
5. SONUÇ	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

a_w Su Aktivitesi Birimi

bp Baz Çifti

$^{\circ}\text{C}$ Santigrat Derece

dk Dakika

g Gram

x_g Yerçekimi İvmesi

kg Kilogram

L Litre

log Logaritma

mg Miligram

ml Mililitre

ng Nanogram

Na Sodyum

pH Asitlik Bazlık Birimi

s Saniye

V Volt

μl Mikrolitre

Kısaltmalar

AgNO ₃	Gümüş Nitrat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
KM	Kurumadde
Kob	Koloni Oluşum Birimi
K ₂ CrO ₄	Potasyum Kromat
LAB	Laktik Asit Bakterisi
MAP	Modifiye Atmosferde Paketleme
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MEB	Malt Extract Broth
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe
MSPRA	Mannitol Salt Phenol Red Agar
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit

NJ	Neighbour-joining
NSLAB	Non-starter Laktik Asit Bakterileri
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Potato Dextrose Agar
RAPD	Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimerik DNA
rep	Tekrarlayan Ekstragenik Palindromik
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	Tris Borat EDTA
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
TE	Tris EDTA
TPE	Türk Patent Enstitüsü
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılmak üzere taze olarak toplanan kaşar peyniri örneklerinin bazıları	14
Şekil 3.2 Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları	5
Şekil 4.1 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait TAMB sayılarının depolama süresince değişimi	30
Şekil 4.2 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Laktobasil sayılarının depolama süresince değişimi	31
Şekil 4.3 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Laktokok sayılarının depolama süresince değişimi.....	33
Şekil 4.4 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Küf sayılarının depolama süresince değişimi.....	35
Şekil 4.5 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Maya sayılarının depolama süresince değişimi.....	37
Şekil 4.6 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait <i>S. aureus</i> sayılarının depolama süresince değişimi.....	38
Şekil 4.7 Maya ve Küf izolatları için yapılan basit boyamaya ait bazı görüntüleri...	40
Şekil 4.8 Kaşar peyniri izolatlarının M13 agaroz jel görüntüleri	40
Şekil 4.9 Kaşar peyniri izolatlarının 16S agaroz jel görüntüleri.....	41
Şekil 4.10 Bakteri türlerine ait filogenetik dendogram.....	47
Şekil 4.11 Maya türlerine ait filogenetik dendogram	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan primerler	15
Çizelge 4.1 Kaşar Peyniri örneklerine ait toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sonuçları (log kob/g)	29
Çizelge 4.2 Kaşar peyniri örneklerine ait Laktobasil sonuçları (log kob/g)	31
Çizelge 4.3 Kaşar peyniri örneklerine ait Laktokok sayısı (log kob/g)	32
Çizelge 4.4 Kaşar peyniri örneklerine ait küf sayıları (log kob/g)	34
Çizelge 4.5 Kaşar peyniri örneklerine ait maya sayıları (log kob/g)	36
Çizelge 4.6 Kaşar peyniri örneklerine ait <i>S. aureus</i> sayısı (log kob/g).....	38
Çizelge 4.7 Kaşar peyniri örneklerinden elde edilen izolat sayıları	39
Çizelge 4.8 Kaşar peyniri örneklerinde bulunan bakteri türleri ve sayıları	44
Çizelge 4.9 Kaşar peyniri örneklerde bulunan maya-küf türleri ve sayıları	45

1. GİRİŞ

Fermente bir süt ürünü olan peynir farklı tanımları olmakla beraber genel anlamda yüksek besin değerine sahip, taze ve olgun olarak tüketilebilen ve her yörede farklı çeşitleri bulunabilen temel bir gıda maddesidir (Üçüncü, 2012; Turgut vd, 2012). Geçmişten günümüze kadar her toplumun kendi örf, adet, bilgisine özgü ve yörenin şartlarına uygun farklı peynir çeşitleri oluşmuştur (Anonim, 2014). Dünyada aroma ve tekstür karakteristikleri farklı yaklaşık 4000 peynir çeşidinin bulunduğu ve bunların birçoğunun üretim tekniğinin birbirleriyle benzer olduğu ve üretilip tüketildikleri alanların belirli bir coğrafyayla sınırlı kaldığı bilinmektedir (Çakmakçı vd, 1995). Ülkemizde ise son dönemlerde yapılan çalışmalarla beraber üretim yöntemi ve bileşimi bilinen yöresel düzeydeki bazı çeşitlerle birlikte üretilen peynir çeşidinin 100'den fazla olduğu ve bu peynirlerin yaklaşık %96'sının inek sütünden elde edildiği rapor edilmiştir (Çakmakçı vd, 2010; Demirel, 2013). Türkiye'de genel olarak Beyaz peynir üretilirken bunu Kaşar, Tulum, Mihaliç, Çerkez, Dil, Otlu, Antep, Çeçil, Lor ve Urfa peynirleri takip etmektedir. Beyaz, Kaşar, Tulum ve Mihaliç peynirleri tüm yörelerde modern işletmelerde üretilirken yöresel peynirler daha çok mandıra olarak tabir edilen küçük işletmelerde üretilmektedir (Özdemir vd, 2013; Kamber 2005b; Hayaloğlu, 2008).

Kaşar peyniri Türkiye'de en fazla üretimi ve tüketimi yapılan peynirler içerisinde Beyaz peynirden sonra gelen ikinci peynir çeşididir (Öksüz vd, 2001). İstatistik Kurumu verilerine göre 2016 yılı içerisinde ülkemizde yaklaşık olarak 610.535 ton peynir üretilmiş ve bunun yaklaşık 177.120 tonunu kaşar peyniri oluşturmuştur (TÜİK, 2016).

Kaşar peyniri sert ve yarı sert peynir grubunda yer almakta ve üretim yöntemi açısından Balkan ülkelerindeki Kashkaval ve Kasserli peynirleri ve İtalyan Caciocavallo, Provolone, Mozzarella peynirleri ile benzerlikler göstermektedir (Aran, 1998; Aydemir vd, 2015; Tekinşen, 2000; Çetinkaya ve Soyutemiz, 2006). Türk Standartları Enstitüsü (TS 3272) kaşar peynirini taze ve eski kaşar olarak iki

çeşide ayırmıştır. Eski kaşar peynirleri daha çok geleneksel üretim yöntemleri kullanılarak üretilmekte ve belirli koşullar altında en az 120 gün olgunlaştırılmaktadır. Buna karşılık taze kaşar peyniri üretiminde pastörize süt kullanılmasından dolayı olgunlaştırılmadan da satışa sunulabilmektedir (TSE, 2016).

Türkiye’de kaşar peyniri üretimi hemen hemen tüm illerimizde oldukça yaygın olup sütün işlenmesi ve peynirin üretim metodu benzerlikler göstermektedir. Bu bağlamda Kars Kaşarının diğer illerdeki kaşar peynirlerinden ayıran en temel farklılık; bulunduğu coğrafi alandaki sığır yetiştiriciliği ve mera yetiştiriciliğine dayanmaktadır. Mevcut bölgede havanın diğer yerlere göre daha geç ısınması ve daha geç soğuması mera tipi büyükbaş hayvancılık için çok uygun koşullar meydana getirmektedir. Bu koşullar olgun bir peynir olan Kars Kaşarının üretiminde istenilen ve aranan şartlardır. Çünkü bir dağ kaşarı olan Kars Kaşarı yapımında kullanılan sütte, 1600 civarında çiçekli bitkinin bulunduğu ve bunlardan 80 civarında taksonun endemik, 20 civarında taksonun ise nadir olduğu tespit edilmiştir. Bu durum resmi kaynaklarda da yer almıştır (TPE, 2014).

Kars Kaşarı üretiminde inek, koyun, keçi sütü veya bu sütün karışımları kullanılabilir (Kamber, 2007). Mayıs-Ağustos (mera döneminde) ayları arasında belirtilen coğrafi alanda bulunan mera bitkilerini tüketen hayvanların köy ve yaylalardan toplanan sütü ile yapılmaktadır. Kars Kaşarının en önemli özelliklerinden biri de üretiminde tam yağlı ve/veya yağlı süt kullanılmasıdır. Peynir üretimi için ısıtılmış çığ süt 32-35°C’ye kadar ısıtılır ve peynir mayası ile mayalanır. Pıhtılaşma işlemi bir saat kadar sürer ve mayalanmanın tamamlanıp tamamlanmadığı peynir ustaları tarafından kontrol edilir. Mayalanma işlemini pıhtının kırılması, pıhtı suyunun aktarılması, pıhtının süzülmesi ve baskıya alınması işlemleri takip eder. Elde edilen teleme 3-6 saat süren olgunlaştırma işleminden sonra çok ince ve küçük parçalara ayırmak için iki kez rendeleme işlemine tabi tutulur. Daha sonra 0,3 milimetre çapında delikleri olan krom sepetlere doldurularak pişirme derecesi 72-78 °C olan sulu haşlama kazanında 2-3 dakika haşlanır. Haşlanan teleme yoğurular ve göbek kesimi de denilen kalıplama işlemi uygulanır. 12-24 saat süren kalıplama işleminin ardından kalıptan çıkarılan kaşar peynirleri tuzlama ve dinlendirme (ön olgunlaştırma) odalarına alınmaktadır. Ön olgunlaştırma işlemi için olgunlaştırma odalarının pencerelerinin kuzey yönüne bakması,

sıcaklığının 12-18 °C arasında olması ve nispi nem oranının ortalama %60-70 olması gibi bazı fiziksel özelliklerinin bulunması gerekmektedir. Ön olgunlaştırma odalarında kaşar peynirleri kendini bırakmaması (gevşememesi), kaşar bloklarının çatlamaması ve çabuk kurumaması amacı ile Karayele (Kuzey rüzgarlarına) maruz bırakılarak olgunlaştırılmaktadır. Bu sayede kaşar peynirleri doğal şartlarda bozulmadan olgunlaşabilmektedir. Kaşar peynirleri daha sonra nihai olgunlaştırma için iç sıcaklığı 8 °C ve nispi nem oranı %60-65 olan soğuk hava depolarına alınmakta ve tüketilene kadar bu depolarda muhafaza edilmektedir (TPE, 2014). İki aşamada olgunlaştırılan kaşar peynirleri için ilk aşama olan ön olgunlaştırma süresi 30-40 gün kadar sürerken, ikinci aşama olan nihai olgunlaştırma süresi 4-5 ay kadardır (Aydemir, 2010; Aydemir vd, 2015).

Kaşar peyniri üretimi esnasında kalıptan ilk çıktığında dış yüzeyi ve kesit yüzeyi beyazımsı bir renge sahiptir, tadı ise hafif tuzlu olup sütü andıran yavan bir tadı vardır. Ancak bir hafta içerisinde peynirin yüzeyi kabuk bağlayarak başlangıçtaki beyaz rengini kaybeder ve sarımsı bir renk alır. Taze kaşar olgunlaştıkça kesit yüzeyi de sarımsı krem renge dönüşür ve yapısı da sertleşir. Eski kaşarın kendine has yoğun aroması olgunlaşma boyunca devam eden glikoliz, proteoliz ve lipoliz faaliyetleri sonucu meydana gelir. En sonunda olgunlaşmış kaşarın tadı hafif tuzludur, ağızda kolayca dağılır, kesit yüzeyi de düz ve pürüzsüzdür (TPE, 2014).

Kars Kaşarının kendi yöresine has bir olgunlaştırılma metodu bulunmaktadır. Bu metot Kars Kaşarının kendine has özelliklerinin oluşmasını sağlar (TPE, 2014). Kaşar peynirlerinin kendilerine özgü geleneksel özellikleri Non-starter laktik asit bakterilerinin (NSLAB) veya çiğ sütte bulunan maya türlerinin varlığı ile sağlanır (Settanni ve Moschetti, 2010). NSLAB türleri peynirlerin olgunlaşmasında, peynir türlerine özgü tat, aroma ve karakteristik özelliklerin oluşmasında önemli yere sahiptir (Beresford vd, 2001). Mayalar ise peynir örneklerinin daha çok fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedirler (Welthagen ve Viljoen, 1998). Maya türleri peynirlerde istenilen özellikleri sağlamanın yanı sıra bozulmaya da neden olabilmektedirler (Welthagen ve Viljoen, 1998). Bu nedenle geleneksel peynir türlerine ait maya mikroflorasının belirlenmesi, standart bir üretim süreci ve potansiyel starter kültür kullanımı için oldukça önemlidir.

Küf türleri açısından *Penicillium* cinsine ait türlerin geleneksel peynirlerin mikroflorasında bulunduğu söylenebilir (Sengun vd, 2008). Bunun yanında farklı peynir türlerinde fizikokimyasal ve duyuşsal özelliklerin iyileştirilmesinde starter küf kültürleri kullanılabilir (Aran ve Eke, 1987; Beresford vd, 2001). Ancak bazı küf türlerinin mikotoksin üretmesi gıda endüstrisi için önemli bir sorun oluşturmaktadır (Lund vd, 1995). Bu nedenle geleneksel peynir üretiminde starter küf kültürü olarak kullanılması hedeflenen küf türlerinin biyokimyasal fonksiyonları ve toksin üretme özelliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

İhtiva ettiği su oranı az olduğundan kıvam olarak sert ve yarı sert peynir grubunda yer alan Kars Kaşarında düşük pH, yüksek laktik asit konsantrasyonu ve hijyenik koşullar sağlandığı takdirde ihtiva ettiği yüksek NaCl içeriği ve düşük redoks potansiyeli nedeniyle mikrobiyal bozulma çok fazla görülmemektedir (Riemelt vd, 1996; Varnam ve Sutherland, 1996). Bu seçici faktörlere rağmen kaşar peynirinde yine nispeten mikroorganizma gelişimi söz konusu olmaktadır. Genel olarak Gram (-) bakterilerle bazı Gram (+) bakteriler, maya ve küf türleri de gelişebilmektedir (Varnam ve Sutherland, 1996).

Peynir gruplarında gerçekleşen tüm mikrobiyolojik değişimlerin bir bozulma sonucunda meydana geldiği söylenemez. Özellikle Kars Kaşarı gibi olgunlaşmış peynir gruplarında meydana gelen bazı mikrobiyolojik gelişmeler peynirdeki olgunluğun bir göstergesidir. Bu olgunluğu bakteri gruplarının ikincil floraları sağlamaktadır. Mikrobiyolojik olgunluk, iç ve/veya dış faktörlere bağlıdır ve genellikle her peynir çeşidinin mikrobiyolojik flora kombinasyonu yani ikincil floraları kendine özgüdür (Beresford vd, 2001).

Kars Kaşarı ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla fiziksel ve kimyasal özellikler, mikrobiyolojik sayımlar ve farklı uygulamaların kaşar peyniri üzerine olan etkileri ile ilgili olmuştur (Kıvanç, 1989; Gülmez vd, 2004; Öksüztepe vd, 2009; Akın, 2012;). Kars Kaşarının ihtiva ettiği mikrobiyolojik çeşitlilik ve olgunlaşma esnasındaki mikrobiyolojik kombinasyon üzerine yapılmış araştırmalar yeterli sayıda değildir (Aran ve Eke, 1987; Aran, 1998; Çetinkaya ve Soyutemiz, 2006; Aydemir, 2010; Aydemir vd, 2015). Halbuki olgunlaşma esnasındaki baskın mikrobiyolojik floranın bilinmesi üretimin daha standart hale getirilmesi ve üretim

süresinde kısaltmaların meydana gelebilmesi adına oldukça önemlidir. Belirlenebilecek flora kombinasyonları peynir üretiminde kontrollü olarak kullanılabilirse peynir kalitesi sadece çevre koşullarına bağlı kalmaz ve daha kaliteli ve sağlıklı peynirler üretilebilir.

Bu tez çalışmasında, taze üretilmiş Kars Kaşarının ön olgunlaştırma periyodu esnasında yapısında meydana gelen fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişimler incelenmiştir. Olgunlaşma sürecinde gelişme gösteren bakteri ve maya-küf çeşitleri tespit edilmiş ve olgunlaşma esnasında hangi türlerin baskın olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar dikkate alınarak olgunlaşmada aktif rol oynayan türler peynir üretimi esnasında starter kültür olarak kullanılırsa olgunlaşmanın hızlandırılması sağlanabilir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kars Kaşarı, kaşar peyniri denilince akla ilk gelen ve üretim miktarı olarak Türkiye’de ilk sıralarda yer alan bir peynir çeşididir. Kars’ta üretimi yapılan kaşar peynirinin diğer bölgelerdeki kaşar peynirlerinden en önemli farkı yuvarlak ve kalın yapısıdır. Bu peynire çoğunlukla olgunlaştırılarak aroma kazandırılmakta ve daha sonra tüketilmektedir (Kamber, 2005a). Kars Kaşarı 2014 yılında Kafkas Üniversitesi’nin çalışmaları ile coğrafi işaret almış, bu sayede markalaştırılmıştır. Türk Patent Enstitüsü Kars Kaşarını kısaca “1600 civarı çiçekli bitkinin bulunduğu ve bunlardan 80 civarında taksonun endemik ve 20 civarında taksonun da nadir bulunduğu Kars ve Ardahan illerindeki meralarda otlayan ineklerin sütlerinden yörenin kendine özgü üretim metodu ile üretilen olgun peynir sınıfındaki yarı sert peynir” olarak tanımlamıştır (TPE, 2014).

Kamber (2005a), Kars Piyasasında satışa sunulan kaşar ve çeçil peyniri örneklerinden 30’ar adet alarak bu örneklerin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerini incelemiş ve Türk Gıda Kodeksine uygunluklarını araştırmıştır. Mikrobiyolojik analizler sonucunda kaşar peynirlerinde ortalama TAMB sayısı 7,03 log kob/g düzeyinde, hijyen indeksi mikroorganizmalarından enterobakter sayısı %66,6’sında 4,30, koliform bakteri sayısı %40’ında 3,91, koagülaz pozitif stafilokok sayısı %46,6’sında 2,98, sülfid indirgeyen anaerob sayısı %3,3’ünde 2,30 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Maya ve küf sayısının ise 6,04 log kob/g düzeyinde olduğunu belirtilmiştir. Kimyasal analizler sonucunda kaşar peynirlerinde kurumadde miktarı %64,4, yağ oranı %21,5, yağsız kurumadde miktarı %42,8 ve protein oranı %22,3 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacı kaşar peyniri örneklerinde nişastaya rastlamamıştır.

Yaldız ve Kurdal (2003), taze ve eski kaşar peynirlerinin kimyasal bileşimi ve hijyenik kalitesini belirlemek için yaptıkları çalışmada; taze kaşar peyniri örneklerinde ortalama kurumadde oranı %52,58 iken protein oranı %20,32, titrasyon asitliği (laktik asit cinsinden) %0,90; kurumadde de süt yağı, kurumadede tuz ve kül değerleri de sırasıyla %50,96, %4,70, %3,00 olarak bulunmuştur. Mikrobiyolojik analizler sonucunda ortalama TAMB sayısının $3,65 \times 10^5$ kob/g, koliform bakteri sayısının 65,41 kob/g olduğu görülmüştür. Eski kaşar peyniri örneklerinde ise kurumadde miktarı %63,54, protein %25,26, titrasyon asitliği %1,07 (laktik asit), süt

yağı oranı %44,82 (kurumadde de), tuz miktarı %6,66 (kurumadde de) ve kül miktarı %4,36 olarak tespit edilmiştir. Ortalama TAMB sayısını $4,86 \times 10^5$ kob/g, koliform bakteri sayısını 16,25 kob/g olarak belirlemişlerdir.

Öksüztepe vd (2009), tarafından taze kaşar peynirleri üzerine yapılan benzer bir çalışmada ortalama TAMB sayısı $1,05 \times 10^7$, koliform bakteri $5,20 \times 10^6$, *Staphylococcus-Micrococcus* sayısı $1,39 \times 10^2$, *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* $1,05 \times 10^7$, *Lactococcus* $6,53 \times 10^6$ ve maya-küf sayısı $5,82 \times 10^6$ kob/g seviyelerinde tespit edilmiştir. Örneklerin 4 tanesinin *E. coli* ile kontamine olduğu ancak hiçbirinde *Staphylococcus aureus* bulunmadığı saptanmıştır. İncelenen örneklerin ortalama rutubet miktarı %35,85, tuz miktarı %2,74, kurumadde de tuz %4,30, kurumadde de yağ %41,31, asitlik derecesi (laktik asit cinsinden) %0,42, kül miktarı %3,47, pH değeri 5,49 ve a_w değeri 0,91 olarak belirlenmiştir.

Kars'ta tüketime sunulan kaşar peynirlerinin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerinin incelendiği diğer bir çalışmada; örneklerin 3'ünün koliform grubu mikroorganizmaları 10^2 kob/g'dan daha yüksek düzeyde içerdiği, 1'inin ise *E. coli* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Örneklerin tamamında maya ve küf tespit edilirken hiçbir örnekte *S. aureus*'a rastlanmamıştır. Yürütülen kimyasal testler sonucunda örneklerin 46'sının rutubet düzeyinin %40'ın üzerinde, 19'unun ise kurumadedeki tuz oranının %7'den yüksek olduğu saptanmıştır (Gülmez, 2004).

Günşen ve Büyükyörük (2003), vakum paketli taze kaşar peynirlerin bakteriyolojik kalitesini ve aflatoksin M1 düzeyini belirlemek için yaptıkları çalışmada koliform bakteri sayısını $3,9 \times 10^3$ kob/g, *Staphylococcus aureus* sayısını $6,25 \times 10^2$ kob/g, maya ve küf sayısını $2,4 \times 10^4$ kob/g olarak belirlemişlerdir. Aflatoksin düzeyi ise $206,23 \pm 15,88$ ng/kg olarak tespit edilmiştir. Örneklerinin hiç birinde *Salmonella* türüne rastlanmamıştır.

Benzer olarak Demirci ve Dıraman (1990), vakum paketlenmiş taze kaşar peyniri örneklerinin nem, kurumadde, yağ, kurumadde de yağ, yağsız kurumadde, tuz, kurumadde de tuz, toplam kül, ve protein oranlarını sırasıyla %42,71, %57,29, %24,11, %42,07, %33,18, %2,82, %5,03, %3,05, %26,42 olarak tespit etmişlerdir. pH ve TAMB değerleri ise 5,17, $3,7 \times 10^7$ kob/g olarak rapor edilmiştir.

Kıvanç (1989), Erzurum Piyasasında tüketime sunulan kaşar peynirlerinin bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerini inceledikleri çalışmada ortalama nem oranını %34,60, tuz oranını %4,32, titrasyon asitliği ve pH'yı sırasıyla %2,03 ve 5,42 olarak belirlemişlerdir. Bu araştırma kapsamında peynir örneklerinde TAMB, koliform bakteri, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, psikrofilik bakteri, *Salmonella-Shigella*, *Bacillus*, laktik asit bakterileri, proteolitik ve lipolitik bakteri ile maya ve küf sayımı yapılmıştır. Sonuçta mikroorganizma sayılarının örneğe bağlı olarak değiştiğini ve *Salmonella-Shigella* tespit edilmediğini ifade etmişlerdir. Standart kalitede ve hijyenik peynir üretimi için kaşar peynirinin standart bir üretim metoduna sahip olması, modern üretim şartlarında üretilmesi ve muhafaza koşullarının iyileştirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Kaşar peynirinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine potasyum sorbatın etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada peynir yapımında kullanılan süt ve salamuraya potasyum sorbat ilave edilmiştir. Sonuç olarak potasyum sorbatın nem, yağ, tuz, kül gibi fiziksel niteliklere herhangi bir etkisinin olmadığı, bunun yanında pH'yı artırdığı, asitliği düşürdüğü belirlenmiştir (Nizamlioğlu vd, 1996).

Doğal duman ve sıvı duman uygulamasının kaşar peynirinin kalitesi üzerine etkisini araştıran Atasever vd (2003), doğal dumanlamanın kaşar peynirlerinin nem ve kurumadadaki yağ oranlarını azalttığını ancak sıvı duman uygulamasının kimyasal özellikleri etkilemediğini tespit etmişlerdir. Doğal duman uygulaması, TAMB sayısını azalttığı halde koliform bakteri, *Staphylococcus-Micrococcus*, maya veya küf sayıları üzerinde etkili olmamıştır. Duyusal değerlendirmeler sonucunda sıvı tütsülenmiş örnekler ve kontrol grubu örneklerin benzer olduğu belirlenmiştir. Doğal tütsülenmiş örneklerin lezzet ve renk açısından diğer gruplardan daha düşük puanlar aldığı ifade edilmiştir.

Atamer vd (1997), laktoperoksidaz/tiyosiyanat/hidrojen peroksit sisteminin aktivasyonu ile korunmuş sütler ile bunlardan üretilen teleme ve kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerini inceledikleri çalışmalarında süte katılan $SCN^+-H_2O_2$ miktarındaki artışın sistemin antibakteriyel etkisini artırdığını gözlemlemişlerdir.

Modifiye atmosferde paketlenmenin (MAP) peynir kalitesi ve raf ömrü üzerine etkisini tespit etmek amacıyla yapılan bir çalışmada; vakum paketlenme,

karbondioksit ve nitrojen karışımları kullanılmıştır. TAMB sayısında direkt MAP tekniği ile ilişkili olarak bir değişim tespit edilmezken, *Staphylococcus-Micrococcus* grubu mikroorganizmaların sayısında sürekli düşüş gözlenmiştir. Grupların hiç birinde küf gelişmediği ve MAP'nin maya üremesini baskıladığı tespit edilmiştir. İncelenen örneklerin hiçbirinde koliform, fekal koliform ve sülfid redükte eden anaeroblara rastlanmamıştır (Erkan ve Aksu, 2006).

Farklı tuzlama yöntemlerinin ve potasyum sorbat uygulamasının kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkilerini araştıran Babacan ve Özdemir (2013) kuru tuzlanmış örneklerde TAMB sayısının haşlama suyunda tuzlanmış kaşar peynirlerine oranla daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Haşlama suyunda tuzlanmış peynirlerde, kontrol örneği ve sorbatlanmış örneklerdeki Laktik Asit Bakterisi (LAB) (MRS'de gelişen) sayıları arasındaki farklılığın önemli ($p < 0,05$), kuru tuzlanmış örneklerde ise önemsiz ($p > 0,05$) olduğu belirlenmiştir. Küf sayıları açısından kuru tuzlanmış kontrol grubuna ait küf sayılarının ($1,76 \log \text{ kob/g}$), haşlama suyu içerisinde tuzlanmış kontrol grubuna göre ($3,58 \log \text{ kob/g}$) daha düşük olduğunu ve en düşük küf sayısının ($1,48 \log \text{ kob/g}$) kuru tuzlanmış ve sorbat uygulanmış örneklerde olduğunu belirtmişlerdir. Tüm peynir örneklerindeki koliform grubu bakteri sayısının standartlarda yer alan değerinin altında ($< 1 \log \text{ kob/g}$) olduğunu ve *Staphylococcus aureus* sayılarının da $< 2 \log \text{ kob/g}$ düzeyinde olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçta kaşar peynirlerindeki küf gelişiminin azaltılması açısından potasyum sorbat uygulamasının gerekli bir işlem olduğunu vurgulamışlardır.

Taze ve eski kaşar peynirlerinin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yapılan birçok araştırma mevcuttur. Farklı bölgelerden temin edilen kaşar peyniri örneklerinin özellikle mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yapılan araştırmalar neticesinde birçok peynir örneğinin istenilen standartlara uygun olmadığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra üretim esnasında uygulanan farklı uygulamaların veya alternatif ambalajlama metotlarının kaliteyi arttırdığı saptanmıştır. Kaliteli ve dayanıklı ürün üretimi için benzeri uygulamaların gerekli olduğu ifade edilmiştir.

Mikroorganizmalar tüm doğal peynir çeşitlerinin üretilmesinde ve olgunlaşmasında önemli rol oynayan vazgeçilmez bileşenlerdir. Başlatıcı flora ve ikincil flora olarak iki ana gruba ayrılırlar. Başlatıcı flora denilen grup peynir yapılacak sütte doğal

olarak bulunabileceği gibi dışardan da eklenebilir. Bu grupta yer alan *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii* türleri kullanılacakları peynir çeşidine göre tek tek veya kombinasyonlar halinde kullanılabilir. Başlangıç florası ikincil flora grubu ile kullanıldığında lezzet ve dokunun iyileşmesine katkı sağlamaktadır. İkincil flora olarak adlandırılan grup bakteri, maya ve küf karışımlarından oluşabilir ve bu karışımlar üretilen peynir çeşidine göre belirlenmektedir. Doğru teknikler kullanılarak belirlenen mikrobiyal floralara göre hazırlanan starter kültürler üretilen peynirlerin kalitesinin iyileşmesine ve gelişmesine katkı sağlamaktadır (Beresford vd, 2001).

Halkman ve Halkman (1991), kaşar peyniri üretiminde kullanılacak starter kültür kombinasyonu oluşturmak için yaptıkları çalışmalarında 6 çeşit bakteri ile 4 farklı kombinasyon hazırlamışlardır. Her bir kombinasyon kendi içerisinde bakterilerin değişik oranlarını içeren 3 farklı şekilde hazırlanmıştır. 3 farklı katılma oranının hangisinin starter kültür olarak seçilebileceğine karar vermek için ilk 24 saat içerisindeki asit oluşturma durumları, pH, ve haşlama sonrası canlı kalma durumları dikkate alınmıştır. Sonuçta birinci gruptan %70 *S. thermophilus* + %30 *L. bulgaricus*, ikinci gruptan %25 *S. lactis* + %50 *S. faecalis* + %25 *L. bulgaricus*, üçüncü gruptan %25 *S. lactis* + %25 *S. thermophilus* + %50 *L. Helveticus* ve dördüncü gruptan %40 *L. Lactis* + %40 *S. cremoris* + %20 *S. thermophilus* en uygun starter kültür kombinasyonu olarak seçilmiştir. En yüksek laktik asit oluşturan grubun uygun starter kültür grubu olabileceği ifade edilmiştir.

Benzer bir çalışma yine Halkman vd (1992) tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmada; farklı starter kültür kombinasyonları kullanılarak geleneksel olarak üretilen kaşar peynirlerinin çeşitli nitelikleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda örneklerin incelenen özellikleri bakımından birbirinden önemli derecede farklı olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ülke genelinde tüm işletmelere önerilebilecek bir kaşar peyniri starter kültürü kombinasyonunun belirlenebilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir.

Aydemir (2010), Kars Kaşarlarının karakterizasyonu üzerine yaptığı çalışmada örneklerinin olgunlaşma süreleri boyunca göstermiş oldukları fiziksel, kimyasal, biyokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal değişimleri incelemiş ve çalışma süresince

peynir örneklerini oda sıcaklığında, %60-70 nispi nemde 20 gün ön olgunlaştırmış daha sonra $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de %70-80 nispi nemde 160 gün olgunlaştırmıştır. Aydemir analizlerini olgunlaşmanın 3, 30, 60, 120 ve 180. günlerinde yapmış ve olgunlaştırma boyunca peynirlerin kurumadde, tuz, kurumadde de tuz, yağ, kurumadde de yağ, titre edilebilir asitlik ve protein içeriklerinin arttığını belirtmiştir. Enterococci sayılarının olgunlaştırma boyunca azaldığını, *Lactobacilli*, *Lactococci* ve *Leuconostoc* sayılarının 30. güne kadar artıp, daha sonraki aşamalarda azaldığını, maya ve küf sayılarının olgunlaşma boyunca değiştiğini belirlemiştir. Aydemir sadece bir örneğinde Koliform grubuna rastlarken, *E. coli* ve koagülaz pozitif *S. aureus*'a rastlamamıştır. Peynir örneklerinde baskın aminoasit türlerini lösin, lizin, fenilalanin ve aspartik asit olarak belirlerken, baskın yağ asitlerini palmitik (C16:0), oleik (C18:1), stearik (C18:0) ve miristik (C14:0) asitler olarak belirlemiştir. Aroma puanlarının olgunlaşma süresince önemli derecede arttığını bildirmiştir.

Aydemir vd (2015), geleneksel olarak üretilen kaşar peynirlerinin mikrobiyal florasını belirlemek için 15 peynir örneğinde olgunlaşma periyodu boyunca Non-starter laktik asit bakterilerini (NSLAB) ve NSLAB dışında gelişen grupları araştırmışlardır. Çalışma süresince toplamda 594 izolat elde edilmiştir. Sonuçta; *Lactobacillus casei* (247 izolat), *Lactobacillus plantarum* (77) ve *Pediococcus acidilactic* (58) türlerinin baskın olduğu tespit edilmiş ve starter olarak kullanılmaları halinde bir biyoçeşitlilik oluşturulabileceği ifade edilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda uygun starter kültür kombinasyonlarının oluşturulup kullanılması halinde peynir üretiminde standart bir üretim tekniği ve kalite sağlanabileceği belirtilmiştir. Bunun yanında konuyla ilgili yapılan çalışma sayısının yetersiz olduğu ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

Akın (2012), kaşar peynirindeki olgunlaşmayı hızlandırmak için yaptığı çalışmasında proteaz enzimini, k-karragenan, jellan ve sodyum aljinat içersinde emülsiyon ve ekstrüzyon tekniklerini kullanarak kapsüllemiştir. Kapsüller ve rennet ile birlikte peynir sütüne katılarak kaşar peynirinin kimyasal, dokusal ve duyuşsal özellikleri araştırmıştır. Çalışmasının sonucunda proteaz taşıyıcı sistemlerinin başarıyla kullanılabilceği tespit edilmiştir.

Mağarada olgunlaştırılmış Geleneksel Divle peynirlerinin mikrobiyolojik çeşitliliği üzerine yapılan bir araştırmada yirmi üç bakteri türü tespit edilmiş ve olgunlaşmanın ilk aşamalarında Basil ve Gammaproteobakteri gruplarının, daha sonraki aşamalarda ise Actinobacteria sınıfının baskın olduğu belirlenmiştir. Maya ve küf türleri içerisinde ise *Penicillium polonikum*, *Penicillium biforme*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum* ve *Debaryomyces hansenii* türlerinin yaygın olarak bulunduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda; izole edilen floraların teknolojik karakteristiklerinin belirlenmesinin ardından yeni peynir starter kültürlerinin geliştirilebileceği vurgulanmıştır (Öztürkoğlu Budak vd, 2015).

Olgunlaşma döneminde kaşar peynirinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine natamisin (maya ve küf önleyici) ve ambalajlama materyalinin (PVC, Sperdex-Ref. 99017) etkilerini araştıran Var vd (2006), çalışmaları sonucunda natamisinin ve ambalaj materyallerinin, TAMB, maya ve lipolitik mikroorganizma sayıları üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı ancak natamisinin, tek başına proteolitik mikroorganizmalar üzerinde engelleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, olgunlaşma süresi boyunca örneklerin yapısında bozulma meydana gelmediği ve Enterobakter, Koliform, Salmonella spp. ve *Staphylococcus aureus* türlerinin hiç birinin tespit edilmediğini ifade etmişlerdir.

Carafa vd (2016), yeni bir starter kültür geliştirmek için geleneksel dağ peynirlerindeki mikrobiyal gelişmeyi incelemişlerdir. Çalışmalarında 640 koloni izole etmişler ve bunların 231 adetinin Laktik Asit Bakterisi (LAB) olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bağlamda çalışmalarının standart kültür geliştirmek için bir yol gösterici olabileceğini belirtmişlerdir.

Kars Kaşarı ülkemizde sevilen ve yaygın olarak tüketilen bir peynir çeşidi olduğu için geleneksel üretim metodunun aslına uygun olarak standardize edilmesi, olgunlaşma sürecinin kontrollü ve sağlıklı devam edebilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle olgunlaşma süreci boyunca peynirlerde meydana gelen mikrobiyal değişimin takip edilmesi, baskın floranın belirlenmesi ve tanımlanması yapılması gereken uygulamalar arasında yer almaktadır. Bu tez çalışmasında geleneksel olarak çiğ süttten üretilen Kars Kaşarının ön olgunlaştırma dönemindeki mikrobiyal

florasının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek sonuçların Kars Kaşarı için starter kültür hazırlama çalışmalarına zemin hazırlayacağı düşünülmektedir.

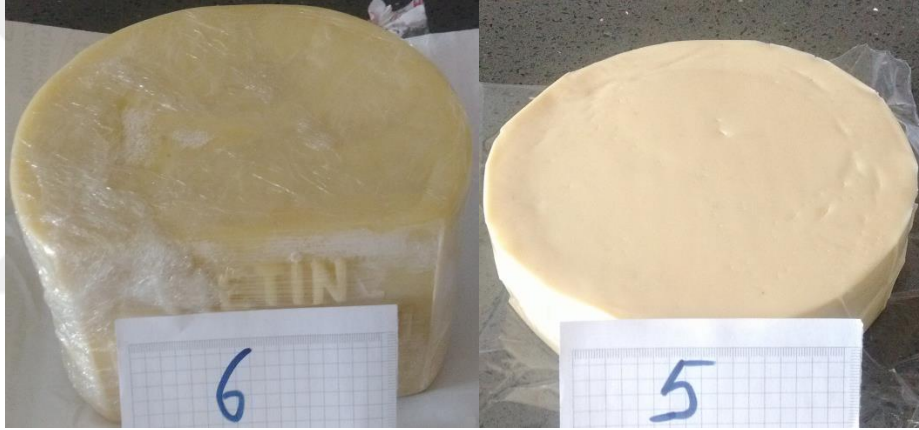


3. MATERYAL YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kars Kaşarı örnekleri

Çalışmada kullanılan kaşar peyniri örnekleri Kars ilinde geleneksel yöntemlerle üretim yapan altı farklı üretim yerinden temin edilmiştir. Peynir örneklerinin yeni üretilmiş (üretimnin ertesi günü) taze peynir olmasına özen gösterilmiştir. Toplanan örnekler steril numune poşetlerine konularak soğuk zincir bozulmadan laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılmak üzere taze olarak temin edilen kaşar peyniri örneklerinin bazıları

3.1.2 Besiyerleri

Tez çalışması süresince Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar ve MRS broth, M17 agar ve M17 broth, Plate Count Agar (PCA), Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSPRA), Potato Dextrose Agar (PDA) ve Malt Extract Broth (MEB) besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.3 Primerler

Kaşar peynirlerinden olgunlaşma periyodu boyunca farklı türlerin izole edilmesinde, genotipik karakterizasyonlarının yapılmasında ve türlerin tanımlanmasında

kullanılan primerler ve amplifiye edilmek istenen hedef gen boyutları aşağıda Çizelge 3.1’de verilmiştir. Primerlerin kullanım amaçları ve PCR şartları ilerleyen bölümlerde açıklanacaktır.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan primerler (Dertli vd, 2016; Baker vd, 2003; Vilela vd, 2005)

Primer	Sekans (5’-3’)	Hedef gen	Hedef gen boyutu (bp)
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	-	-
AMP_F	GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG	16S	1.500
AMP_R	AAGGAGGTGATCCARCCGCA		
GTG5	GTGGTGGTGGTGGTG	-	-
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG	23S	700
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		

3.2 Yöntem

3.2.1 Fiziksel ve kimyasal analizler

Kaşar peyniri örneklerinde kurumadde ve kül miktarı gravimetrik yöntemle, yağ tayini Gerber metoduyla, tuz miktarı ve asitlik (%laktik asit) titrasyonla, pH tayini WTW 340-1 model pH metre kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.1.1 Kurumadde tayini

Kurutulmuş ve desikatörde soğutulmuş kurutma kapları içerisine yaklaşık 5 g peynir örneği tartılmış ve kaplar 103-105°C sıcaklığındaki etüvde 3-4 saat kadar kurutulmuştur. Etüvden alınan örnekler desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Örnekler ikinci defa etüve konularak 1 saat daha kurutulmuş ve tekrar desikatörde soğutulup tartılmıştır. Bu işlemler örnekler sabit ağırlığa ulaşincaya kadar tekrarlanmıştır. Kurutmadan önceki ağırlık ve kurutmadan sonraki ağırlık farkından % kurumadde miktarı hesaplanmıştır (Kurt vd, 2012; Metin, 2012).

3.2.1.2 Kül tayini

Yakma işlemine başlamadan önce kül kapları temizlenip saf sudan geçirildikten sonra boşken kurutulup desikatörde soğutulmuştur. Daraları alınan porselen krozelerin içine yaklaşık 3'er gram peynir örneği tartılarak önce kurutma fırınında 105°C'de bir süre kurutulmuş ardından kül fırınına yerleştirilip sıcaklık tedrici olarak 550°C'ye yükseltilmiş ve bu sıcaklıkta yaklaşık 12 saat yakma işlemi yapılmıştır. Numuneler hiç siyahlık kalmayincaya kadar yakıldıktan sonra, desikatörde soğutulup tartılmıştır. % kül miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Kurt vd, 2012; Metin, 2012).

$$\% \text{ Kül} = (a-b) / (c-b) \times 100$$

a: Yakma işleminden sonra kül + Krozenin darası (g), b: Krozenin darası (g), c: Örnek + Krozenin darası (g)

3.2.1.3 Yağ tayini

Bütirometre beherciğine 3 g peynir örneği tartılarak bütirometre şişesine yerleştirilmiştir. Üzerine 10 ml 1,50 yoğunluklu sülfürik asit ilave edilerek 65-70°C'lik su banyosuna bırakılmıştır. Ara sıra çalkalanarak peynirin tamamen erimesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 1 ml amil alkol ve bütirometre içeriği taksimatlı kısma ulaşincaya kadar sülfürik asit eklenmiştir. Bütirometreler 10 dakika santrifüjlenerek 65°C'deki su banyosunda 5 dakika daha tutulduktan sonra

bütirometreden okunan değer % yağ oranı olarak ifade edilmiştir (Kurt vd, 2012; Metin, 2012).

3.2.1.4 Titrasyon asitliği tayini

Ufalanarak homojen hale getirilmiş peynir örneğinden 10 gram tartılarak havanda ezilmiş ve üzerine 40°C'deki saf sudan 100 ml eklenerek karıştırılmıştır. Karışım filtre kağıdından süzildükten sonra süzüntüden 25 ml alınarak %1'lik fenolftalein indikatörlüğünde 0,1 N NaOH ile hafif pembe renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan NaOH miktarı formülde yerine konularak laktik asit cinsinden % asitlik belirlenmiştir (Kurt vd, 2012; Metin, 2012).

$$\% \text{ Asitlik} = [\text{Harcanan NaOH miktarı (ml)} \times 0.009 \times 100] / \text{Örnek miktarı}$$

3.2.1.5 Tuz tayini

5 g peynir örneği 60-70°C sıcaklığındaki su ile havanda iyice ezildikten sonra sulu kısım 500 ml'lik ölçü balonuna aktarılmış peynirdeki tuzun tamamının suya geçmesi için bu işlem 5-6 kez tekrarlanmıştır. Balondaki su bir süre soğuduktan sonra saf su ile 500 ml'ye tamamlanıp kaba filtre kağıdından süzümüştür. Süzüntüden 25 ml alınıp potasyum kromat indikatörlüğünde 0,1 N AgNO₃ ile kırmızı kiremit rengi oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Peynirin % tuz oranı, harcanan AgNO₃ miktarı aşağıdaki formülde yerine koyularak hesaplanmıştır (Kurt vd, 2012; Metin, 2012).

$$\% \text{ Tuz} = \text{Harcanan AgNO}_3 \text{ (ml)} \times 0.585 / m$$

(m: Peynir örneği miktarı, 0.25 g)

3.2.1.6 pH tayini

Peynir örneklerinde pH tayini birleşik elektrotlu dijital pH-metre (WTW 340-1 marka) kullanılarak yapılmıştır. pH-metre tampon çözeltilerle (pH 4 ve 7) kalibre edilerek ölçüme hazırlanmıştır. Ölçüm için 10 gram peynir örneği tartılmış üzerine 15 ml saf su ilave edilerek homojen hale getirilmiş, daha sonra oda sıcaklığında ölçümler yapılmıştır (Kurt vd, 2012; Metin, 2012).

3.2.2 Mikrobiyolojik analizler

Kaşar peyniri örneklerinde Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB), Laktobasil, Laktokok, Maya-Küf ve *S. aureus* sayımı yapılmıştır.

3.2.2.1 Dilüsyon hazırlama

10 g peynir örneği tartılarak üzerine 90 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) eklenmiş ve stomacher de homojenize edilmiştir. 1/10'luk dilüsyon bu şekilde hazırlanmıştır. Bir sonraki dilüsyon bu dilüsyondan 1 ml alınıp içinde 9 ml FTS bulunan cam tüpe aktarılarak hazırlanmıştır ve bu şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir analiz için uygun dilüsyonlardan ilgili besiyerlerine ekim yapılmıştır. (Harrigan, 1998; Kurt vd, 2012).

3.2.2.2 Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı

Toplam mezofilik aerobik bakterilerinin sayımında Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463) besiyeri kullanılmıştır. Analiz için uygun dilüsyonlardan yayma metodu ile ekim yapılmış ve petri plakları 30°C'de 48±2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 10-300 arasında koloni bulunduran petri kutularında sayım yapılmış, sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpılarak TAMB sayısı log kob/g olarak hesaplanmıştır (Harrigan, 1998; Kurt vd, 2012).

3.2.2.3 Laktobasillerin sayımı

Laktobasil bakterilerinin sayımı için Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar) (Merck 1.10660) besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petri plakları 37°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 10-300 arası koloni bulunduran petri kutularındaki değerler dikkate alınmış, ilgili dilüsyon faktörü ile çarpıldıktan sonra sonuçlar log kob/g olarak ifade edilmiştir (Speck, 1984; Harrigan 1998).

3.2.2.4 Laktokokların sayımı

Laktokokların sayımında M17 Agar (Merck 1.15108) besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma yöntemiyle ekim yapılan petri plakları 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Sayımda 10-300 arasında koloni bulunduran petri kutuları dikkate alınmış sonuçlar log kob/g olarak hesaplanmıştır. (Speck, 1984; Harrigan, 1998).

3.2.2.5 Maya ve küf sayımı

Maya ve küf sayımı için Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130) besiyeri %10'luk tartarik asit çözeltisi ile asitlendirilerek (pH 3,5±0,1) kullanılmıştır. Bu sayede besiyerinde maya-küf gelişimi için uygun ortam oluşturulmuştur. Uygun dilüsyonlardan yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petripler 23±2°C'de 5-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda uygun sayım aralığındaki (10-300) petripler sayılarak sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpılmış ve maya-küf sayıları log kob/g olarak verilmiştir (Kurt vd, 2012).

3.2.2.6 *Staphylococcus aureus* sayımı

Staphylococcus aureus sayımı için Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSPRA) (Merck 1.05404) besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petripler 35-37°C'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerden etrafı sarı zon ile çevrili büyük parlak sarı-opak koloniler *S. aureus* olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar ilgili dilüsyon faktörü ile çarpılarak *S. aureus* sayısı log kob/g olarak hesaplanmıştır.

3.2.3 Bakteri ve maya-küf izolasyonu

3.2.3.1 Laktobasil ve Laktokok bakterilerinin izolasyonu ve geliştirilmesi

Yapılan çalışmada 6 adet Kars Kaşarının yaklaşık 1 ay süren ön olgunlaştırma periyodu boyunca mikrobiyal florasındaki değişim ve gelişmeleri incelemek için depolamanın 1., 7., 15. ve 30. günlerde ekim yapılmıştır. Laktobasillerin izolasyonu için MRS agar, geliştirilmesi için MRS broth, Laktokokların sayımı için M17 agar ve geliştirilmesi için M17 broth besiyerleri kullanılmıştır.

Kaşar peyniri örneklerinden bakteri türlerini izole etmek amacı ile örneklerden 10'ar gram steril Stomacher poşetine tartılmış ve üzerine 90ml steril FTS ilave edilerek homojenize edilmiştir. İlk dilüsyonu takip edecek şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmış ve olgunlaşmanın ilk dönemlerinde (1. ve 7. günlerde) 10⁻³ ve 10⁻⁴'lük dilüsyonlardan, devam eden dönemlerinde ise (15. ve 30. günlerde) 10⁻⁴ ve 10⁻⁵'lik dilüsyonlardan MRS agara ve M17 agara yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petripler her bir besiyeri için yukarıda belirtilen şartlara uygun olarak gelişmeye

bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda katı besiyeri ortamında gelişen kolonilerden morfolojik olarak farklı olanları seçilmiş, ilgili sıvı besiyeri ortamına steril kürdan yardımı ile aktarılmış ve her bir besiyeri kendi uygun şartlarında gelişmeye bırakılmıştır.

3.2.3.2 Maya ve Küflerin izolasyonu ve geliştirilmesi

Peynir örneklerinden olgunlaşma periyodu boyunca (1., 7., 15. ve 30. günler) maya ve küf izole etmek amacıyla PDA besiyeri, geliştirmek amacıyla MEB besiyeri kullanılmıştır.

Peynir örneklerinden hazırlanan seri dilüsyonlardan olgunlaşmanın ilk dönemlerinde (1. ve 7. günlerde) 10^{-3} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlardan, devam eden dönemlerinde ise (15. ve 30. günlerde) 10^{-5} ve 10^{-6} 'lık dilüsyonlardan PDA Besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve oda sıcaklığında 5-7 gün gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda katı ortamda gelişen kolonilerden morfolojik olarak farklı olanlar seçilmiş, MEB Besiyeri ortamına steril kürdan yardımı ile aktarılmış ve oda sıcaklığında 5-7 gün gelişmeye bırakılmıştır.

3.2.4 İzolatların stoklanması ve depolanması

İzole edilen bakteri, maya ve küflerin sonraki analizlerde kullanılmak üzere stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bunun için %40'lık gliserol kullanılmış ve hazırlanan stok solüsyonlar -80°C 'de depolanmıştır.

3.2.5 Laktobasil ve Laktokokların fenotipik olarak tanımlanması

3.2.5.1 Kolonilerin morfolojik olarak tanımlanması

Katı besiyeri ortamında gelişen bakteri kolonilerinin her biri kendi içerisinde birbirleri ile kıyaslanarak morfolojik açıdan farklılık gösteren koloniler seçilmiştir. Olgunlaşma periyodu boyunca bu işlem gerçekleştirildiği için farklı olgunlaşma dönemlerinde varlığını sürdüren türlerin belirlenmesi amacıyla benzer morfolojik özellikte olan koloniler seçilmiştir.

3.2.6 Laktobasil ve Laktokokların genotipik olarak tanımlanması

3.2.6.1 Fenol-kloroform:izoamil alkol ile DNA izolasyonu

Bakteri, maya ve küf hücrelerinden DNA izolasyonu amacıyla fenol-kloroform metodu kullanılmıştır. Sıvı kültür ortamında uygun şartlarda bir gece geliştirilen kültürden ependorf tüpü içerisine 1 ml alınmış hücreleri ayırmak için 7000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmın üzerine 450 µl TE (Tris EDTA) tamponu eklenmiş ve tüpler vortekslenerek hücrelerin süspanse olması sağlanmıştır. Ardından içeriğe 50 µl %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µl Proteinaz K ilave edilip karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 0,5 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) eklenip çalkalanarak içerik karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika daha inkübasyondan sonra tüpler 4°C'de 7000xg de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak başka bir tüpe aktarılmıştır. Aynı işlem Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı ile ikinci kez tekrarlanmış, elde edilen yüksek viskoziteli jel yeniden başka bir tüpe aktarılmıştır. Daha sonra jelin üzerine 50 µl 5M'lık sodyum asetat ve 1 ml izopropanol ilave edilip DNA'nın beyaz iplikçikleri görülünceye kadar alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Süpernatant kısmın uzaklaştırılması için karışım 3000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan pellet üzerine 0,5 ml %70 lik etanol ilave edilerek hafif karıştırılmış ve 3000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Etanollü süpernatant otomatik pipet ile alınıp kalan etanolün tamamen uzaklaşması için tüpler 37°C'de 5-10 dakika bekletilmiştir. Son olarak elde edilen DNA üzerine 100 µl destile su ilave edilip süspanse edilmiştir. Bu şekilde elde edilen genomik DNA PCR işlemlerinde template olarak kullanılmıştır.

3.2.6.2 RAPD-PCR analizi ile bakterilerin genotipik karakterizasyonu

Morfolojik olarak farklı kolonilerden seçilip geliştirilerek ardından saflaştırılan kolonilerin farklı olanlarını seçmek ve benzer olanlarını elemek amacıyla M13 primeri kullanılarak RAPD (Rastgele Amplifiye edilmiş Polimorfik DNA) PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 50 µl olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı 1µl Template DNA, 10µl 5X Phusion Buffer, 4 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTP miks, 0,75 µl

Primer (M13), 0,25 µl Taq polimeraz'dan oluşmaktadır. RAPD-PCR şartları; 1 döngü ön denatürasyon 94°C 2 dk, 40 döngü denatürasyon 94°C 1 dk, bağlanma 42°C 20 s, uzama 72°C 2 dk ve son uzama 72°C 10 dk şeklinde yürütülmüştür.

3.2.6.3 16S rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması

RAPD-PCR işleminin ardından genotipik olarak farklı olduğu düşünülen koloniler için 16S PCR işlemi uygulanmıştır. 16S geni tüm bakterilerde bulunmaktadır ve bakteriler için spesifik bölge olarak tanımlanan prokaryotik DNA'nın bir bölümü olduğundan bakterilerin taksonomik açıdan sınıflandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Parmak izi bölgesi de denilen bu genin 1500 bp uzunluğunda olması sekanslama işlemleri açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Bu bölgenin uzun olması tanımlama için yapılan analizlerde faydalı olmasının yanında farklı analiz metotlarının geliştirilmesinde de katkı sağlamaktadır.

16S geninin tespiti amacıyla 50 µl'lik PCR karışımı; 1 µl template DNA, 10 µl 5X Phusion Buffer, 4 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTP miks, 1,0 µl Primer 1 (AMP-F), 1,0 µl Primer 2 (AMP-R), 0,25 µl Taq polimeraz içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR şartları; 1 döngü ön denatürasyon 95°C 2 dk, 25 döngü denatürasyon 95°C 30 s, bağlanma 55°C 20 s, uzama 72°C 30 s ve son uzama 72°C 5 dk olarak uygulanmıştır (Saitou vd, 1987; Tamura vd, 2011; Baker vd, 2003).

3.2.7 Maya ve küflerin genotipik olarak tanımlanması

Maya ve küf izolatlarında fenotipik ayırım yapabilmek amacı ile izolatlar basit boyama metodu kullanılarak fiziksel ve morfolojik özelliklerine göre seçilmiş, daha sonra genotipik karakterizasyon için rep-PCR işlemi uygulanmıştır.

3.2.7.1 Fenotipik ayırım

Maya ve küfler sıvı besiyeri ortamında 5-7 gün geliştirildikten sonra santrifüjlenerek süpernatant kısımları uzaklaştırılmış ve pellet kısmı ayrılmıştır. Ayrılan pellet kısmından öze yardımı ile bir miktar alınarak temiz bir lam üzerine yayılmış, lam oda sıcaklığında bir süre kurutulmuş ve fiksasyon için alevden geçirilmiştir. Preparat kristal viyole ile 1 dk boyanmış ardından boya akıtılarak destile su ile yıkanmıştır. Kurutulan preparat ışık mikroskopunda immersiyon objektifinde (x100'lük objektif)

incelenmiştir. İnceleme sonucunda maya ve küfler için fenotipik bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Ayırım neticesinde hifli yapıda olanlar küf, tomurcuklu yapıda olanlar ise maya olarak tanımlanmıştır (Temiz, 2010). Tanımlanan küf ve mayalar kendi aralarında daha detaylı incelenerek (hif uzunluğu, tomurcuk büyüklüğü, dallanmış yapı vs.) farklı olduğu düşünülen kültürler devam eden işlemlere tabi tutulmuştur.

3.2.7.2 rep-PCR analizi ile maya ve küflerin genotipik karakterizasyonu

Maya ve küfleri ayırt etmek amacıyla gerçekleştirilen rep-PCR analizi için PCR karışımları primer farklı olmak üzere bakterilerin genotipik karakterizasyonunda olduğu gibi hazırlanmıştır. Rep-PCR analizi için primer olarak GTG5 kullanılmıştır. Uygulanan rep-PCR şartları; 1 döngü ön denatürasyon 94°C 10 dk, 35 döngü denatürasyon 94°C 60 s, bağlanma 40°C 60 s, uzama 65°C 8 dk ve son uzama 65°C 16 dk şeklinde yürütülmüştür.

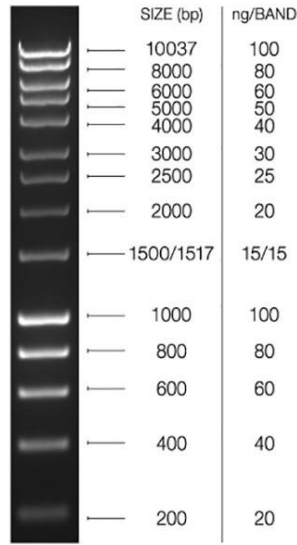
3.2.7.3 23S rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Mikroskopik ayırım ve rep-PCR işlemlerinin ardından farklı olduğu düşünülen kültürler için 23S PCR işlemi uygulanmıştır. 23S geni maya ve küfler için spesifik bölgedir ve taksonomik sınıflandırmalarda kullanılması açısından 16S geni ile benzer özellik göstermektedir. Genin uzun olması ve fazla sayıda bölgesinin bulunması maya ve küf gruplarını tür ve cins seviyelerine kadar ayırmada etkili rol oynamaktadır. Bu gen bölgesi sayesinde tanımlama işlemleri ve var olan analizlerin uygulanabilirliği kolaylaşmaktadır.

23S geninin tespiti amacıyla hazırlanan PCR karışımı 50 µl için; 1 µl DNA, 10 µl 5X Phusion Buffer, 4 µl MgCl₂, 0,4 µl dNTP miks, 1,0 µl Primer 1 (NL-1), 1,0 µl Primer 2 (NL-4) , 0,25 µl Taq polimeraz ölçülerinde hazırlanmıştır. Uygulanan PCR şartları; 1 döngü ön denatürasyon 95°C 10 dk, 40 döngü denatürasyon 94°C 1 dk, bağlama 54°C 2 dk, uzama 70°C 3 dk ve son uzama 72°C 7 dk şeklindedir (Vilela vd, 2005).

3.2.8 PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve UV görüntüleyicide görüntülenmesi

Yukarıdaki işlemlerde elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi için kullanılacak olan %1'lik agaroz jel 0,5X Tris Borat EDTA (TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Agaroz jel PCR küvetine dökülerek katılaşması beklenmiştir. Jel katılaştıktan sonra PCR ürününden 10µl alınarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE tamponu içerisinde elektroforez işlemine bırakılmıştır. Renkli olan örnekler için bu işlem yeterli iken renksiz örneklerde bir yükleme boyası ile boyama yapılmıştır. Bu amaçla örnekler agaroz jele yüklenmeden önce loading buffer (%0,015 brometil mavisi + %10 gliserol, 0,5xTBE buffer içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır) ile renklendirilmiştir. Renklendirme işlemi için ilk olarak loading buffer'dan temiz bir yüzey (Parafilm olabilir) üzerine 1 µl konulmuş ve üzerine 10 µl örnek aktarılmıştır. Otomatik pipet yardımı ile örnek ve renk bufferı karıştırılarak agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Jeldeki son kutucuğa 5 µl görüntüleme aşamasında referans olarak kullanılacak olan Hyperladder I (Bioline, UK) yüklenmiştir. Elektroforez cihazında yürütme işlemi 200V'da 30-45 dakika arasında uygulanmıştır. Yürütmenin ardından örnek yüklü agaroz jel 1 mgL⁻¹ 'lik etidyum bromid çözeltisi içerisine konulmuş ve 30 dakika yüklü DNA parçalarının boyanması beklenmiştir. Ardından jel distile su içerisinde kısa süre tutulmuş ve fazla etidyum bromidin durulanması sağlanmıştır. Daha sonra UV Transilluminatör (Clever) kullanılarak UV ışık altında jel üzerindeki DNA parçacıkları gözlenmiştir. Gözlemlenen jelerde referans kabul edilen boyutlayıcının fragmentlerinin boyutları ve miktarları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları

3.2.8.1 Sekans analizi

Mikroorganizma hücresinin ait olduğu tür ve cinsin belirlenmesi için DNA molekülünün nükleotit bileşiminin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle saflaştırdığımız PCR ürünlerimizin 16S ve 23S genlerinin sekans analizleri Molla Gürani Mahallesi Fındıkzade Sokak No:19/5 Fatih – İstanbul adresinde çalışmalarını sürdüren Medsantek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketine yaptırılmıştır.

3.2.9 İzole edilen bakteri, maya ve küflerin filogenetik analizi

Filogenetik analizler türlerden elde edilen DNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla yapılır. Bu analiz sonucunda türler için filogenetik ağaçlar ortaya çıkarılır ve farklı türler arasındaki genomik benzerlik ve farklılıklar tespit edilebilir. Ağaçların ortaya çıkması için farklı bilgisayar programları kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında MEGA 7.0 paket programından faydalanılmış, bakteri ve maya türleri için ayrı filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Bu işlemler için 1000 tekrarlı özyükleme çoğaltması ile komşu birleştirme (neighbour-joining (NJ)) metodu kullanılmıştır (Saitou vd, 1987).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Kaşar Peyniri Örneklerine Ait Bazı Fiziksel ve Kimyasal Analiz Sonuçları

Bu tez kapsamında 6 adet (A, B, C, D, E, F) Kars Kaşarının ön olgunlaşma periyodu boyunca fizikokimyasal analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer bazı sonuçlar ile karşılaştırılarak değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Peynir örneklerinin ortalama kurumadde miktarı %57,5 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değer Yıldız ve Kurdal (2003)'ın taze ve eski kaşar peynirleri için tespit ettikleri değerden (%52,58) yüksek, Kamber (2005a)'in ve Aydemir (2010)'in Kars Kaşarı için belirledikleri değerlerden (%64,4; %60,04) düşüktür. Bu durumun farklı tür hayvanlara ait süt kullanılmış olmasından, işleme metotlarındaki farklılıklardan ve olgunlaşma şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

TS 3272 no'lu Kaşar Peyniri Standardında (TSE) olgunlaşmamış kaşar peynirinde kurumadde oranının en az %55, olgunlaştırılmış kaşar peynirinde ise en az %60 olması gerektiği ifade edilmiştir (TSE, 2016). Kars Kaşarı Coğrafi İşaret Tescil Belgesinde ise 30 gün olgunlaştırılmış peynirin kurumadde oranı %57-61 olarak verilmiştir (TPE, 2014). Analizi yapılan kaşar peyniri örneklerinin bir kısmı kurumadde yönünden standartlarda belirtilen değer in altında kalırken, örneklerin çoğunun standartlara uygun olduğu görülmüştür.

Peynirin tat ve aromasını, yapısal özelliklerini, olgunlaşma sürecini ve bu süreçteki mikrobiyal stabilitesini belirlemede önemli yere sahip olan tuz miktarı olgun peynir sınıfındaki kaşar peyniri için oldukça önemli yere sahiptir. İncelenen peynir örneklerinde tuz miktarı ortalama %5,15 olarak bulunmuştur. Bu sonuç Yıldız ve Kurdal (2003)'ın taze ve eski kaşar peynirleri için bulmuş oldukları değerden (%4,70) yüksek, Öksüztepe vd (2009)'nin vakum paketlenmiş taze kaşar peynirleri için tespit ettikleri değerden (%2,74) ve Aydemir (2010)'in kaşar peynirleri için elde ettiği ortalama değerden (%3,30) oldukça yüksektir. Oranlar arasındaki bu farklılıkların üretimde kullanılan tuz miktarından, uygulanan üretim metodundan, örneklerin olgunluk derecelerinden, olgunlaştırma işleminin yapıldığı ambalaj materyalinden veya olgunlaştırma sürecinde peynir örneklerinin yüzeyinde meydana

gelen fiziksel değişimler sonucunda yapısında oluşan nem kaybindan kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

Türk Standartları (TS 3272) olgunlaştırılmış kaşar peyniri için ortalama tuz miktarını en çok %4 olarak belirtmiştir (TSE, 2016). İncelenen peynir örnekleri tuz miktarı yönünden bu değerin üstünde yer almıştır. Bu durumun başlıca Kars Kaşarı için standart üretim yönteminin uygulanmamasından kaynaklandığı düşünölmektedir.

İncelenen peynir örneklerinde yağ oranı ortalama %30 olarak tespit edilmiştir. Bu değer Yıldız ve Kurdal (2003)'in, Öksüztepe vd (2009)'nin elde ettiği sonuçlardan (%50,96 ve %41,31) düşük, Kamber (2005a)'in bildirdiği sonuçtan (%21,5) yüksektir. Sonuçlar arasında var olan bu farklılıkların başlıca peynir üretiminde farklı tür hayvanlara ait süt kullanılmış olmasından, peynir örneklerinin farklı olgunlaşma derecelerine sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünölmektedir. Ayrıca hayvanın cinsi de sütün bileşimini etkileyen faktörler arasında yer almakta buna bağlı olarak süttten işlenen ürünün yağ oranını da etkilemektedir. Kars Kaşarı Coğrafi İşaret Tescil Belgesi'nde 3 günlük kaşar peynirindeki yağ oranı %43,1-46,86, 30 günlük kaşar peynirinde ise %47,27-50,86 olarak verilmiştir (TPE, 2014).

Analizleri yapılan kaşar peyniri örneklerinin titrasyon asitliği % laktik asit cinsinden ortalama %1,08 olarak bulunmuştur. Bu sonuç Öksüztepe vd (2009)'nin buldukları sonuçlarından (%0,42) yüksek olmakla beraber, Yıldız ve Kurdal (2003)'in rapor ettiği sonuçlar (%0,90) ile benzerlik göstermektedir. Sonuçlar arasındaki farklılıkların örneklerin olgunlaşmanın farklı aşamalarında olmasından ve örneklerdeki mikroorganizma faaliyetlerinin seviyesinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

Coğrafi işaret belgesinde 30 günlük olgun kaşar peyniri için toplam asitlik değerleri %1,05-1,61 olarak bildirilmiştir (TPE, 2014). Kaşar peyniri örneklerinde tespit edilen titrasyon asitliği değerlerinin bu değerlerle uyum içerisinde olduğu görölmüştür.

Kaşar peyniri örneklerine ait pH değeri ortalama 6,1 olarak tespit edilmiştir. Öksüztepe vd (2009) vakum paketlenmiş örneklerde pH değerini 5,49 olarak bulmuşlardır. Değerlerin birbirine yakın olduğu gözlemlenirken var olan farklılığın ürünlerin farklı şartlarda muhafazasından veya olgunlaşmanın farklı aşamalarında

olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Coğrafi işaret belgesinde 30 günlük olgun kaşar peyniri için pH 2,99-6,46 olarak belirtilmiştir. Sonuçlar bu değerlerle karşılaştırıldığında örneklerin pH değerlerinin standartlara uygun olduğu görülmüştür (TPE, 2014).

İncelenen kaşar peyniri örneklerinin kül değerleri ortalama %3,3 olarak bulunmuştur. Bu değer Yıldız ve Kural'ın (2003) sonuçları (%3,00) ve Öksüztepe vd (2009)'nin sonuçları ile (%3,47) benzerlik göstermektedir.

4.2 Kaşar Peyniri Örneklerinin Bazı Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Farklı satış noktalarından temin edilen 6 adet (A, B, C, D, E, F) Kars Kaşarının bir aylık ön olgunlaştırma döneminin 1., 7., 15. ve 30. günlerinde TAMB sayısı, Laktobasil, Laktokok, Maya-Küf ve *Staphylococcus aureus* sayıları tespit edilmiştir.

4.2.1 Kaşar peyniri örneklerinin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı

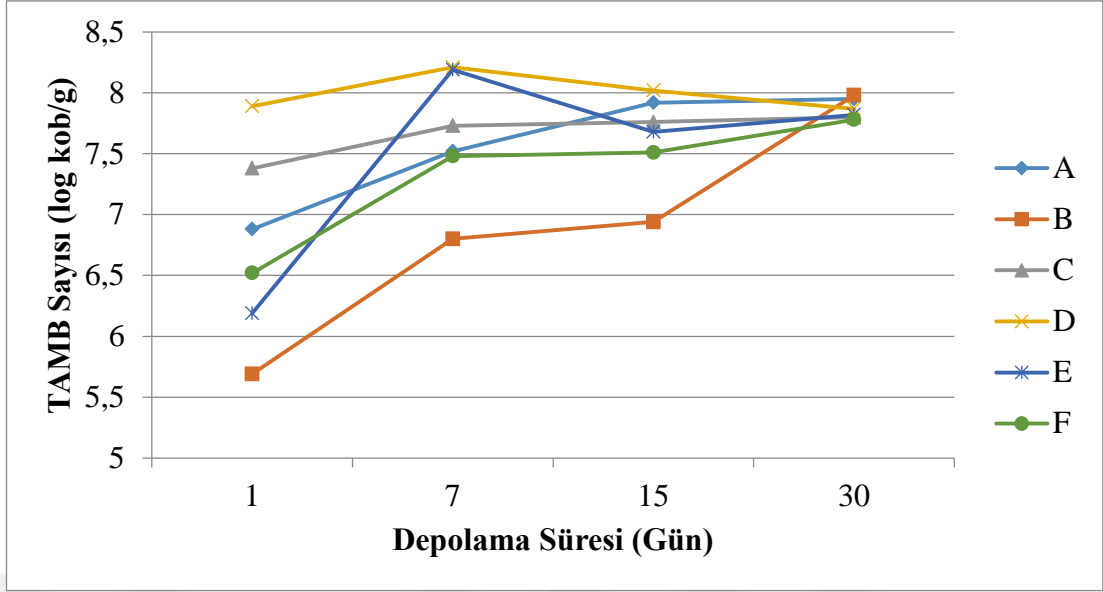
Kars Kaşarı örneklerinde belirlenen TAMB sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi peynir örneklerinin TAMB sayısı 5,69 ile 8,21 log kob/g arasında değişim göstermiştir. Olgunlaşma periyodunun 1. gününde ortalama TAMB sayısı 6,75, 7. günde 7,65, 15. ve 30. günlerde ise 7,63, 7,86 olarak bulunmuştur. Bu değerler Kamber (2005a)'in ve Öksüztepe vd (2009) tarafından kaşar peyniri örneklerinde tespit edilen TAMB sayılarına (7,03 log kob/g ve $1,05 \times 10^7$ kob/g) benzerlik göstermektedir.

Ön olgunlaştırma periyodu boyunca Kars Kaşarı örneklerinin TAMB sayılarında meydana gelen değişim ise Şekil 4.1'de sunulmuştur. Şekilden de görülebileceği gibi peynir örneklerinin TAMB sayıları depolama periyodu boyunca genel olarak artmış bazı örneklerde ise (D ve E) azalmıştır. En düşük değerler depolamanın 1. gününde tespit edilmiş, 1. gün örnekler arasındaki farklılığın en fazla olduğu dönem olmuştur. Örnekler arasındaki bu farklılığın üretimde çiğ süt kullanılmasından ve peynir üretim yerlerindeki hijyen şartlarından kaynaklandığı, depolama periyodu esnasında örneklerin TAMB sayıları arasındaki farklılıkların ise başlangıç mikroorganizma sayılarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.1 Kaşar Peyniri örneklerine ait toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sonuçları (log kob/g)

Örnek Kodu	1. Gün	7. Gün	15. Gün	30. Gün
A	6,88	7,52	7,92	7,95
B	5,69	6,8	6,94	7,98
C	7,38	7,73	7,76	7,8
D	7,89	8,21	8,02	7,87
E	6,19	8,19	7,68	7,82
F	6,52	7,48	7,51	7,78
Ort.	6,75	7,65	7,63	7,86
En Düşük	5,69	6,8	6,94	7,78
En Yüksek	7,89	8,21	8,02	7,98

Kaşar peyniri örneklerinin olgunlaşmanın ilk aşamasına ait eğrileri (Şekil 4.1) Var vd (2006)'nin olgunlaşmanın ilk günlerinde (15. gün) elde ettikleri TAMB grafiklerine benzerlik gösterirken, ilerleyen günlerde (30. gün) farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar Çetinkaya ve Soyutemiz (2006)'in TAMB grafiklerine ait eğriler ile de kısmen benzerlikler ve farklılıklar göstermektedirler. Şöyle ki; ilk günlerdeki (1. gün) değerlerin birbirlerinden daha farklı, ilerleyen günlerdeki (30. gün) değerlerin ise benzer olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşmanın aynı dönemlerindeki örnekler arasında mevcut farklılıkların örneklerin başlangıç mikrofloralarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.1 Ön Olgunlaştırma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait TAMB sayılarının depolama süresince değişimi

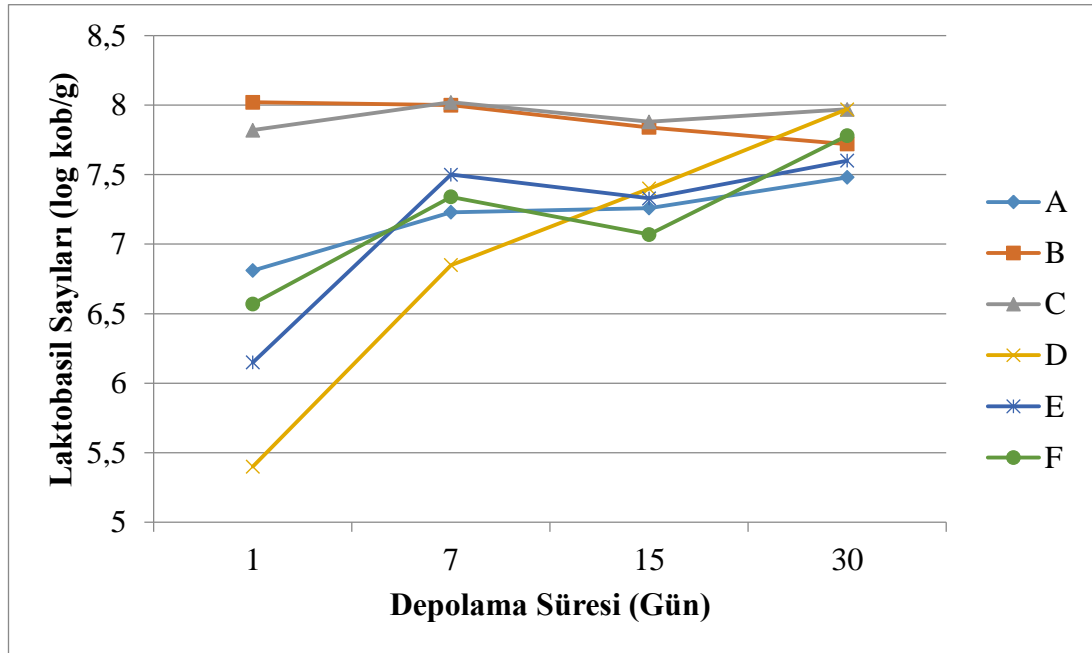
4.2.2 Kaşar peyniri örneklerinin Laktobasil sayıları (log kob/g)

Kaşar peyniri örneklerinde Laktobasil sayıları 5,40 ile 8,02 log kob/g arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.2). Kaşar peyniri örneklerinden elde edilen değerler Öksüztepe vd (2009)'nin, *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* sayısı için buldukları ortalama değere (7,02 log kob/g) yakın bulunmuştur. Sonuçlar arasındaki benzerliklerin peynir örneklerine ait fizikokimyasal analiz sonuçlarının ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının benzer olmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Peynir örneklerinin Laktobasil sayılarındaki değişimi gösteren Şekil 4.2 incelendiğinde 1. günde Laktobasil sayılarının TAMB sayılarında olduğu gibi birbirinden oldukça farklılık arz ettiği ancak 30. günde birbirine yakın değerlere ulaştığı görülmüştür. Örneklerin Laktobasil sayıları depolama periyodu esnasında genel olarak artmıştır. Laktobasil ve TAMB sayıları açısından B ve D örnekleri arasındaki farklılıklar dikkat çekmiştir. D örneği en düşük Laktobasil ve en yüksek TAMB sayısına, B örneği ise en düşük TAMB ve en yüksek Laktobasil sayısına sahip olmuştur. Bu durumun bazı laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.2 Kaşar peyniri örneklerine ait Laktobasil sonuçları (log kob/g)

Örnek Kodu	1. Gün	7. Gün	15. Gün	30. Gün
A	6,81	7,23	7,26	7,48
B	8,02	8,00	7,84	7,72
C	7,82	8,02	7,88	7,97
D	5,40	6,85	7,40	7,97
E	6,15	7,50	7,33	7,60
F	6,57	7,34	7,07	7,78
Ort.	6,79	7,49	7,46	7,75
En Düşük	5,40	6,85	7,07	7,48
En Yüksek	8,02	8,02	7,88	7,97



Şekil 4.2 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Laktobasil sayılarının depolama süresince değişimi

Genel olarak elde edilen sonuçlar Çetinkaya ve Soyutemiz (2006)'in olgunlaşmanın ilk günlerinde (7. gün) elde ettikleri eğrilerden farklı, ilerleyen günlerdeki (15. gün) eğrilere ise benzer bulunmuştur.

4.2.3 Kaşar peyniri örneklerinin Laktokok sayıları (log kob/g)

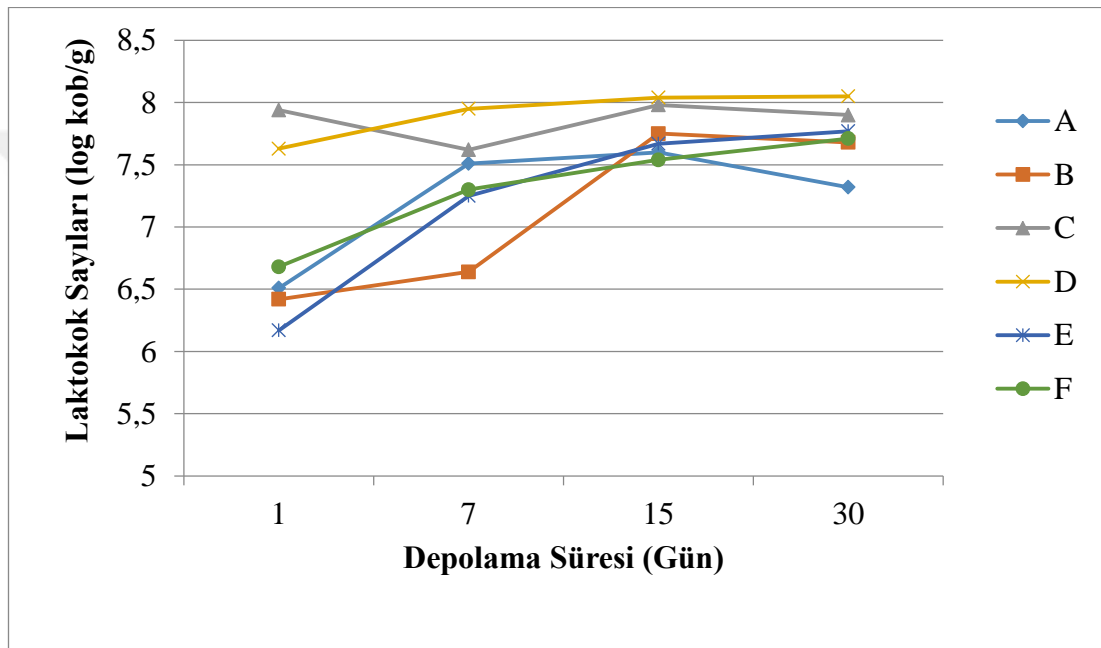
Kaşar peyniri örneklerinin Laktokok sayıları Çizelge 4.3'te, depolama periyodu boyunca Laktokok sayılarında meydana gelen değişim Şekil 4.3'te verilmiştir. Bu değerler 6,17 ile 8,05 log kob/g arasında değişim göstermiştir. Depolama periyotlarına ait ortalama Laktokok sayıları 6,89, 7,37, 7,76 ve 7,73 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Kars Kaşarlarının Laktokok sayıları 15. güne kadar artmış 30. günde azalmıştır.

Laktokok sayıları Öksüztepe vd (2009) tarafından tespit edilen sonuçlardan ($6,53 \times 10^6$ kob/g) yüksek bulunmuştur. Bu durumun; üretimde kullanılan sütün başlangıç mikroflorasının farklı olmasından, depolamada kullanılan ambalaj materyalinin farklılığından, depolama aşamasında örneklerde meydana gelen nem kaybından ve örneklerin olgunlaşmanın farklı evrelerinde olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.3 Kaşar peyniri örneklerine ait Laktokok sayıları (log kob/g)

Örnek Kodu	1. Gün	7. Gün	15. Gün	30. Gün
A	6,51	7,51	7,60	7,32
B	6,42	6,64	7,75	7,68
C	7,94	7,62	7,98	7,90
D	7,63	7,95	8,04	8,05
E	6,17	7,25	7,67	7,77
F	6,68	7,30	7,54	7,71
Ort.	6,89	7,37	7,76	7,73
En Düşük	6,17	6,64	7,54	7,32
En Yüksek	7,94	7,95	8,04	8,05

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te peynir örneklerinde hakim bakteri grubu açısından karşılaştırıldığında bazı örneklerin dikkat çekici olduğu görülmüştür. D örneğinin ortalama Laktokok sayısı en fazla, Laktobasil sayısı en düşüktür, B örneğinin de Laktokok sayısı en düşük, Laktobasil sayısı en fazladır. Buna göre B örneği için hakim bakteri grubunun Laktobasiller ve D örneği için ise Laktokoklar olduğu kanaatine varılmıştır.



Şekil 4.3 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Laktokok sayılarının depolama süresince değişimi

4.2.4 Kaşar peyniri örneklerinin Maya- Küf sayısı (log kob/g)

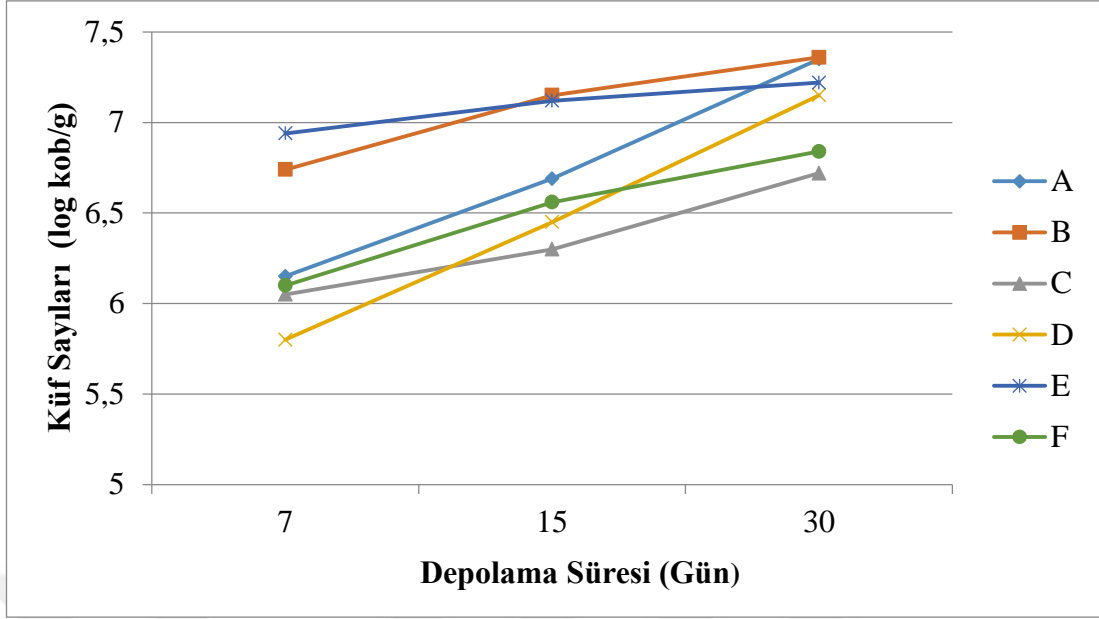
Kaşar peyniri örneklerine ait küf sayıları Çizelge 4.4'te, maya sayıları Çizelge 4.5'de verilmiştir. Depolamanın başlangıcında (1. gün) 10^{-3} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlardan ekim yapılmış ve bu dilüsyonlarda uygun sayım aralığında küf gelişimine rastlanmamıştır. Örneklerde sayım aralığında küf gelişimi 7. günden itibaren tespit edilebilmiştir. Depolamanın 7, 15 ve 30. günlerinde ortalama küf sayıları 6,29, 6,71 ve 7,10 log kob/g olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar Kamber (2005a) ve Nizamlioğlu vd (1996)'nun kaşar peyniri için belirlemiş olduğu değerlere (6,04 ve 8,20 log kob/g)

benzer, Demirci ve Dıraman (1990), Günşen ve Büyükyörük (2003) ve Atamer vd (1997) tarafından belirtilen değerlerden (4.44; 4,38 ve 2,72 log kob/g) yüksek bulunmuştur.

Gıda işletmelerinde küf sayımı hijyenik kaliteyi gösteren kriterlerden biridir. Küfler peynir üretim yerleri ve olgunlaştırma odalarının duvar ve raflarında üreyebilir. Küf sayısının yüksek tespit edilmesi bu alanlarda ciddi bir temizlik işleminin gerekli olduğunu göstermektedir (Marino vd, 2003).

Çizelge 4.4 Kaşar peyniri örneklerine ait küf sayıları (log kob/g)

Örnek Kodu	1. Gün	7. Gün	15. Gün	30. Gün
A	<10 ³	6,15	6,69	7,35
B	<10 ³	6,74	7,15	7,36
C	<10 ³	6,05	6,3	6,72
D	<10 ³	5,8	6,45	7,15
E	<10 ³	6,94	7,12	7,22
F	<10 ³	6,1	6,56	6,84
Ort.	<10 ³	6,29	6,71	7,10
En Düşük	<10 ³	5,80	6,30	6,72
En Yüksek	<10 ³	6,94	7,15	7,36



Şekil 4.4 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Küf sayılarının depolama süresince değişimi

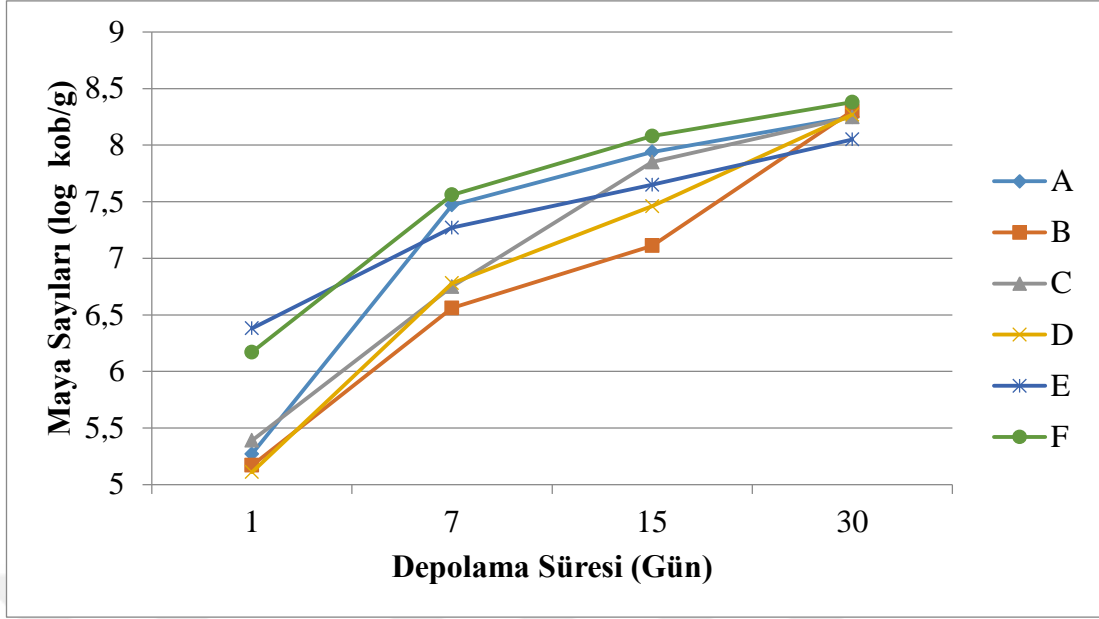
Ön olgunlaşma periyodu boyunca kaşar peyniri örneklerinin küf sayılarında meydana gelen değişim Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekilden de görülebildiği gibi peynir örneklerinin küf sayıları depolama periyodu boyunca artmış ve bu bakımdan elde edilen sonuçlar Aydemir (2010) tarafından tespit edilen sonuçlarla benzerlik (1,09 dan 5,36 log kob/g'a çıkmış) göstermiştir. Aydemir (2010) 30 günlük depolama periyodu boyunca 6 kaşar peyniri örneğinin 5'inde küf sayısının arttığını devam eden süreçte azaldığını tespit etmiştir. Var vd (2006) ise natamisin ilave ederek olgunlaştırdıkları peynir örneklerinde bir ay boyunca küf gelişimi olmadığını ve bunun paketlenme materyaline ilave ettikleri natamisinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Çetinkaya ve Soyutemiz (2006)'in verilerinde ise ilk günlerde (1. gün) örneklerin küf sayıları arasındaki farklılığın daha fazla olduğu ancak ilerleyen günlerde (30. gün) değerlerin birbirlerine yaklaştığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5 Kaşar peyniri örneklerine ait maya sayıları (log kob/g)

Örnek Kodu	1. Gün	7. Gün	15. Gün	30. Gün
A	5,27	7,47	7,94	8,25
B	5,17	6,56	7,11	8,30
C	5,39	6,75	7,85	8,25
D	5,11	6,78	7,46	8,27
E	6,38	7,27	7,65	8,05
F	6,17	7,56	8,08	8,38
Ort.	5,58	7,06	7,68	8,25
En Düşük	5,11	6,56	7,11	8,05
En Yüksek	6,38	7,56	8,08	8,38

Mayalar peynirlerde geniş bir çeşitlilikte bulunurlar. Bununla birlikte onların peynir olgunlaşmasındaki fonksiyonları tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Olgunlaştırılan peynirdeki düşük nem oranı, düşük pH, düşük sıcaklık ve yüksek tuz düzeyleri maya gelişimini destekler (Beresford vd, 2001). Bazı mayalar lipolitik ve proteolitik enzimleri sentezleyebilir ki bu da tat ve aromanın gelişimine katkı sağlayabilir (Aydemir, 2010).

Kaşar peynirlerinde ön olgunlaştırma döneminde tespit edilen maya sayıları 5,11 ile 8,08 log kob/g arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.5). Depolama periyotlarına ait ortalama maya sayıları 1. günde 5,58; 7. günde 7,06; 15. ve 30. günlerde 7,68 ve 8,25 log kob/g olarak belirlenmiştir. Maya sayıları depolama periyodu boyunca artmış 30. günde en yüksek değerlere ulaşmıştır (Şekil 4.5). Sonuçların Çetinkaya ve Soyutemiz (2006) ve Var vd (2006)'nin rapor ettikleri sonuçlardan yüksek olduğu görülmüştür. Üretimde çiğ süt kullanılması, üretim ve depolama koşulları bu farklılığın başlıca nedenleri olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.5 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait Maya sayılarının depolama süresince değişimi

4.2.5 Kaşar peyniri örneklerinin *Staphylococcus aureus* sayısı (log kob/g)

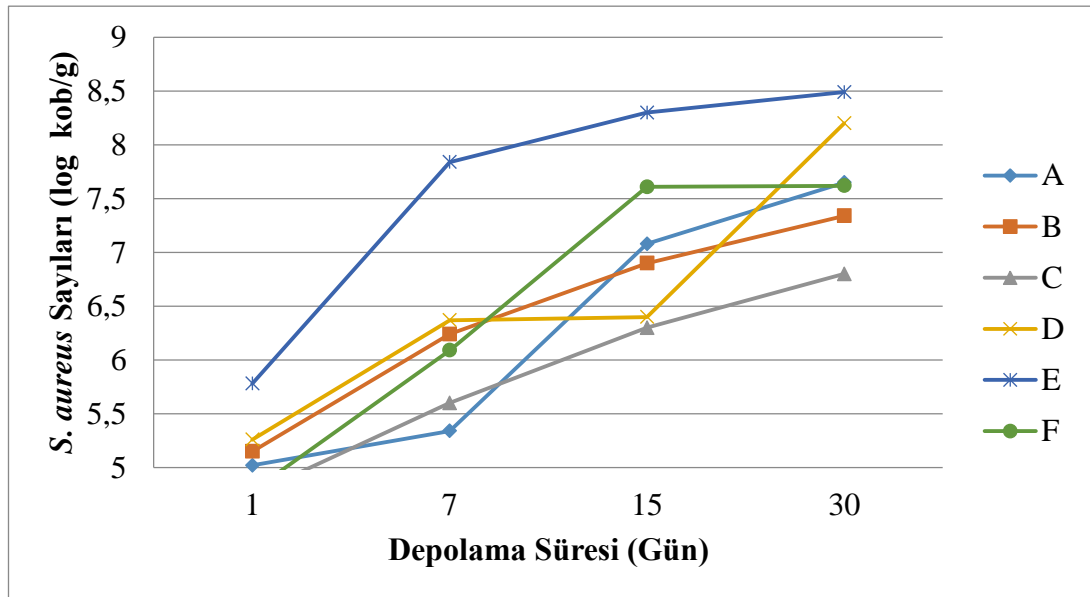
S. aureus'a süt ve süt ürünlerinde sık rastlanır. *S. aureus* intoksikasyonu gıdalar ile bulaşan en yaygın hastalıklardandır. Hastalığa bakterinin gıdada çoğalması sonucu ürettiği toksinin gıda ile birlikte alınması yol açmaktadır. Gıdalara genellikle çalışan personel vasıtası ile (eller, öksürme, hapşırma, vb.) geçebilmektedir (Bilge ve Karaboz, 2005).

Peynir örneklerinde *S. aureus* sayıları en düşük 4,75, en yüksek 8,30 log kob/g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Tespit edilen *S. aureus* sayıları Kıvanç (1989), Günşen ve Büyükyörük (2003) ve Öksüztepe vd (2009) tarafından belirlenen değerlerden ($2,98 \times 10^3$ kob/g; $2,4 \times 10^4$ kob/g; $1,39 \times 10^2$ kob/g) oldukça yüksek bulunmuştur. *S. aureus* sayılarının yüksek olmasının peynir üretiminde kullanılan sütün ısıtma işlemi tabii tutulmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun yanında üretim veya depolama sürecinde yeterli hijyen şartlarının sağlanmaması sonucunda *S. aureus* sayısında bir artışın meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Ön olgunlaştırma periyodu boyunca peynir örneklerinin *S. aureus* sayılarında meydana gelen değişim

Şekil 4.6’da verilmiştir. Eğriden de görülebildiği gibi örneklerin tümünde *S. aureus* sayısı depolama periyodu boyunca artış göstermiştir.

Çizelge 4.6 Kaşar peyniri örneklerine ait *S. aureus* sayıları (log kob/g)

Örnek Kodu	1. Gün	7. Gün	15. Gün	30. Gün
A	5,02	5,34	7,08	7,65
B	5,15	6,24	6,90	7,34
C	4,75	5,60	6,30	6,80
D	5,26	6,37	6,40	8,20
E	5,78	7,84	8,30	8,49
F	4,78	6,09	7,61	7,62
Ort.	5,12	6,24	7,09	7,68
En Düşük	4,75	5,34	6,30	6,80
En Yüksek	5,78	7,84	8,30	8,49



Şekil 4.6 Ön Olgunlaşma Dönemindeki Kars Kaşarı örneklerine ait *S. aureus* sayılarının depolama süresince değişimi

4.3 Kaşar Peyniri Örneklerinden Bakteri ve Maya-Küf İzolasyonu

Tez çalışması için toplanan 6 adet kaşar peyniri örneğinden MRS, M17 ve PDA besiyerlerine ekim yapılarak farklı oldukları düşünülen kolonilerden 361 bakteri, 172 maya-küf kolonisi izole edilmiştir. İzolat sayıları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Kaşar peyniri örneklerinden elde edilen izolat sayıları

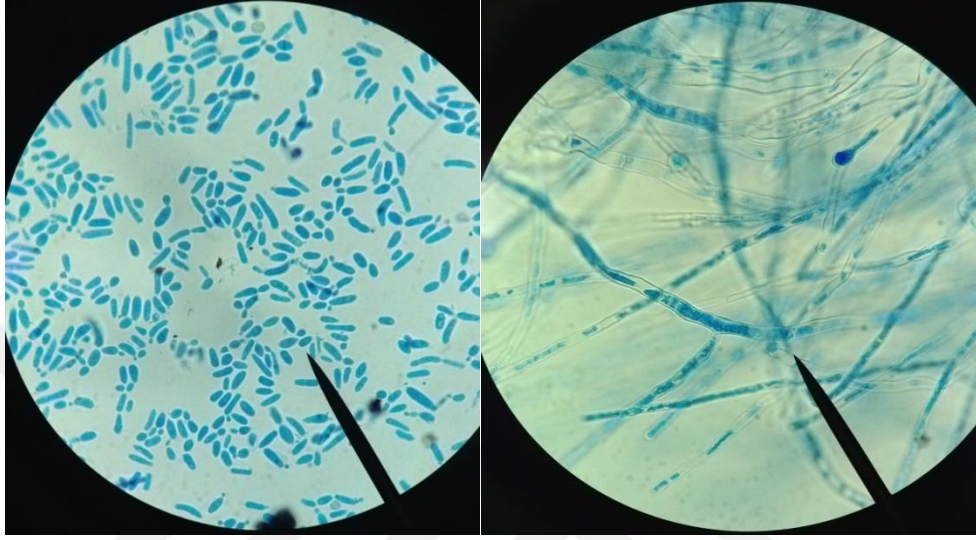
Örnek No	MRS agar	M17 agar	PDA
A	34	32	29
B	15	12	27
C	40	29	26
D	30	37	29
E	30	38	25
F	32	32	36

4.3.1 İzole edilen bakteri ve maya-küf türlerinin tanımlanması

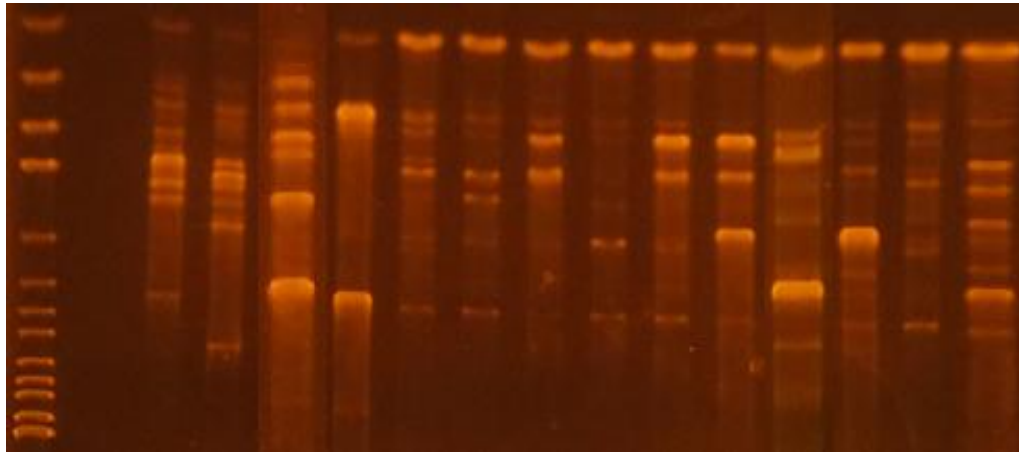
4.3.1.1 RAPD-PCR ve rep-PCR ile genotipik karakterizasyon

Kaşar peyniri örneklerinden izole edilen bakteri türlerinin genotipik olarak tanımlanmasında RAPD-PCR, maya ve küfler için rep-PCR analizi uygulanmıştır. Analizlerde genomik ayırım gerçekleştirebilmek için M13 ve GTG5 primerleri kullanılmış ve ürünler %1’lik agaroz jelde 90V’da 1-1,5 saat yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından görüntülerden yola çıkarak genotipik profili aynı ve farklı olanlar belirlenmiştir. Maya-Küf örnekleri için genomik tanımlamadan önce fenotipik ayırım yapılmıştır. Fenotipik ayırım için maya-küf izolatları basit boyama ile fiziksel ve morfolojik özelliklerine göre seçilmiş, daha sonra 23S rRNA geni çoğaltılmak üzere rep-PCR işlemine tabi tutulmuşlardır. Şekil 4.1’de maya ve küf izolatları için yapılan basit boyamaya ait maya-küf görüntüleri yer almaktadır. Fenotipik ayırım ve genotipik karakterizasyonun ardından 361 adet bakteri izolatından 51 tanesi 16S rRNA geninin çoğaltılması için, 172 adet maya-küf

izolatından 26 tanesi 23S rRNA geninin çoğaltılması için seçilmiştir. Şekil 4.2, 4.3'de kaşar peyniri izolatlarının RAPD-PCR işleminin ardından elde edilen M13 ve 16S agaroz jel görüntülerinin bazıları sırasıyla gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Maya ve Küf izolatları için yapılan basit boyamaya ait bazı görüntüler



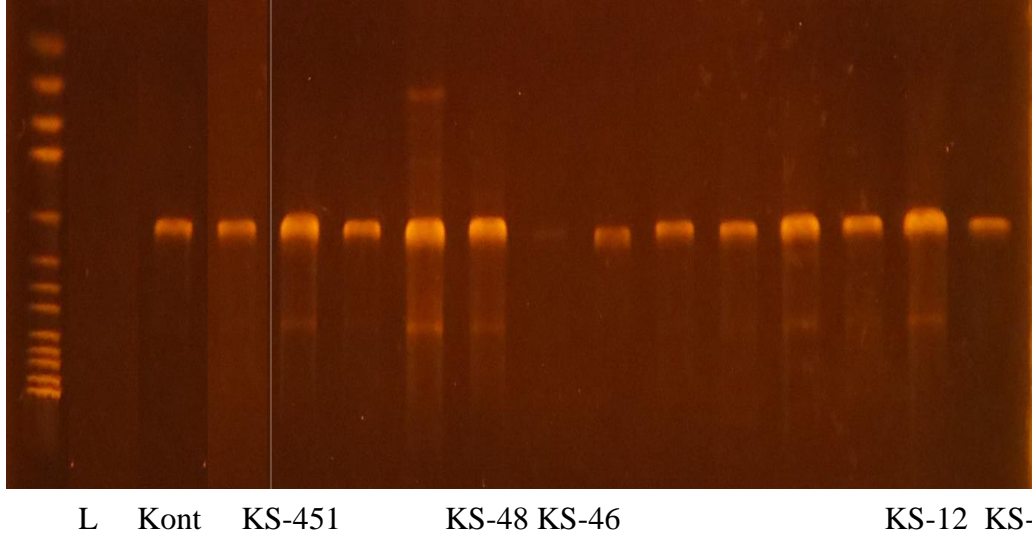
L Kont

KS-451 KS-48

KS-46

KS-12

Şekil 4.8 Kaşar peyniri izolatlarının M13 agaroz jel görüntüleri



Şekil 4.9 Kaşar peyniri izolatlarının 16S agaroz jel görüntüleri

4.3.1.2 Kaşar peynirlerinden izole edilen bakteri ve maya-küf türleri

Endüstriyel düzeyde kaşar peynir üretiminde genel olarak Laktobasil türlerinden olan *Lb. delbruckei* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *Lb. casei* bakteri grupları kullanılmaktadır (Üçüncü, 2004). Yapılan bu çalışmada genotipik karakterizasyon ve tanımlama işlemlerinin ardından kaşar peyniri örneklerinden toplam 15 çeşit bakteri izole edilmiştir. Bunlardan 7 tanesinin mezofilik Laktobasil türü olduğu (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mindensis*, *Streptococcus thermophilus*) ve Kars Kaşarı yapımında starter kültür olarak kullanılabilen bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Bu türlerin kaşar peyniri örneklerinde olgunlaşmanın ilk gününden itibaren baskın olarak buldukları belirlenmiştir. Özellikle *Lactobacillus paracasei* türünün 6 örnekte de baskın olduğu ve olgunlaşma süresince gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. Starter olmayan mezofilik Laktobasil türlerinin, çoğu peynir çeşidinde mikrofloranın önemli bir kısmını oluşturduğu ve bu sayede peynir olgunlaşmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir. (Beresford vd, 2001). Bu türler dışında kalan grupta yer alan *Enterococcus* türleri de örneklerde bulunmakla birlikte baskın florayı oluşturmamaktadır. Gelsomino vd (2002) süt ve süt ürünlerinde özellikle peynirlerde

Enterokok türlerinin bulunmasının üretimde kullanılan ekipmanların ve süt depolama ünitelerinin çiftlik hayvanlarının dışkıları ile kontamine olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. İzole edilen bakteri grupları içerisinde tespit edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin peynirlerde sıklıkla rastlanan türler olduğu, pastörizasyon sıcaklığında canlı kalabildikleri, yüksek tuz konsantrasyonlarına dirençli oldukları ve düşük sıcaklıklarda gelişebildikleri bilinmektedir. Özellikle olgunlaştırılmış peynirlerde enterokok sayısının 10^5 - 10^7 kob/g seviyelerine ulaşabildiği taze peynir türlerinde ise 10^4 - 10^6 kob/g seviyelerinde gelişebildikleri bildirilmiştir (Giraffa, 2002; Manolopoulou vd, 2003). Kaşar peynirleri üzerine yapılan bu çalışmanın enterokok türleri açısından yukarıda adı geçen çalışmalar ile benzerlikler gösterdiği görülmüştür. 6 adet kaşar peyniri örneğinde bulunan bütün bakteri türleri, ve toplamda izole edilen bakteri sayıları Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Kaşar peyniri örneklerinde genomik karakterizasyon ve maya-küf tanımlama işlemleriyle toplam 11 adet maya ve küf türü izole edilmiştir. Bunların 7 tanesi maya, 4 tanesi küflerden oluşturmaktadır. Maya izolatlarında *Pichia kudriavzevii*, küf izolatlarında *Penicillium crustosum* baskın florayı oluşturmaktadır. Geleneksel peynir örneklerinin ön olgunlaşma dönemlerinde *P. kudriavzevii* türünün olgunlaşmada aktif rol oynadığı ve yüksek oranlarda bulunduğu bilinmektedir (Banjara vd, 2015). *D. hansenii* türü olgunlaşmada rol oynayan diğer bir maya türüdür (Pereira-Dias vd, 2000). Bu türe çalışmamız esnasında yalnızca bir örnekte rastlanılmıştır.

Kars Kaşarlarının üretim aşamalarında doğal bir küflenmenin meydana geldiği bilinmektedir. Küf türleri içerisinde *Penicillium* türlerinin peynirlerde en sık rastlanan türler olduğu bildirilmiştir (Lund vd, 1995). Bu bilgi kaşar peynirler için de geçerlidir (Aran ve Eke, 1987). Adı geçen türler kaşar peynirlerinde biyokimyasal fonksiyonların geliştirilmesinde ve olgunlaşmada önemli role sahiptirler. Aynı zamanda bu küf türlerinin bazıları toksikolojik etki meydana getirebilmektedir (Hayaloğlu ve Kırbağ, 2007). Bu nedenle olgunlaşmış peynir örneklerinin üretiminin ardından depolama ve tüketim süresi boyunca doğal şartlarında gelişebilecek küf gruplarının özellikle toksik etki meydana getiren türlerinin gelişimini önleyebilmek için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır.

Kaşar peyniri örneklerinde bulunan maya-küf türleri, örneklerde bulunma sayıları ve toplamda izole edilen maya-küf sayıları Çizelge 4.9'da verilmiştir.



Çizelge 4.8 Kaşar peyniri örneklerinde bulunan bakteri türleri ve sayıları

Bakteri Türleri	Örnek Numaraları												Yüzde (%)	
	A		B		C		D		E		F			Toplam
	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	3,86
<i>Lactobacillus graminis</i>	5	2	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	13	4,56
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	3	-	2	8	8	-	-	-	-	-	-	24	8,42
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	-	1	2	6	7	5	8	1	5	1	1	37	12,98
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	7	1	-	-	-	-	-	-	8	2,81
<i>Lactobacillus mindensis</i>	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-	-	-	12	4,21
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	2	-	-	-	-	4	4	2	12	-	-	24	8,42
<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	4	-	-	-	9	8	-	-	6	10	40	14,04
<i>Enterococcus hirae</i>	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	2,11
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	2	4	-	-	-	-	2	5	8	7	28	9,82
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	0,70
<i>Pediococcus lolii</i>	7	9	1	3	-	-	-	-	9	2	3	2	36	12,63
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,70
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	7	12	4,21
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	1	2	5	12	1	9	-	-	30	10,53
Toplam	25	26	9	12	30	22	23	32	21	33	24	28	285	100

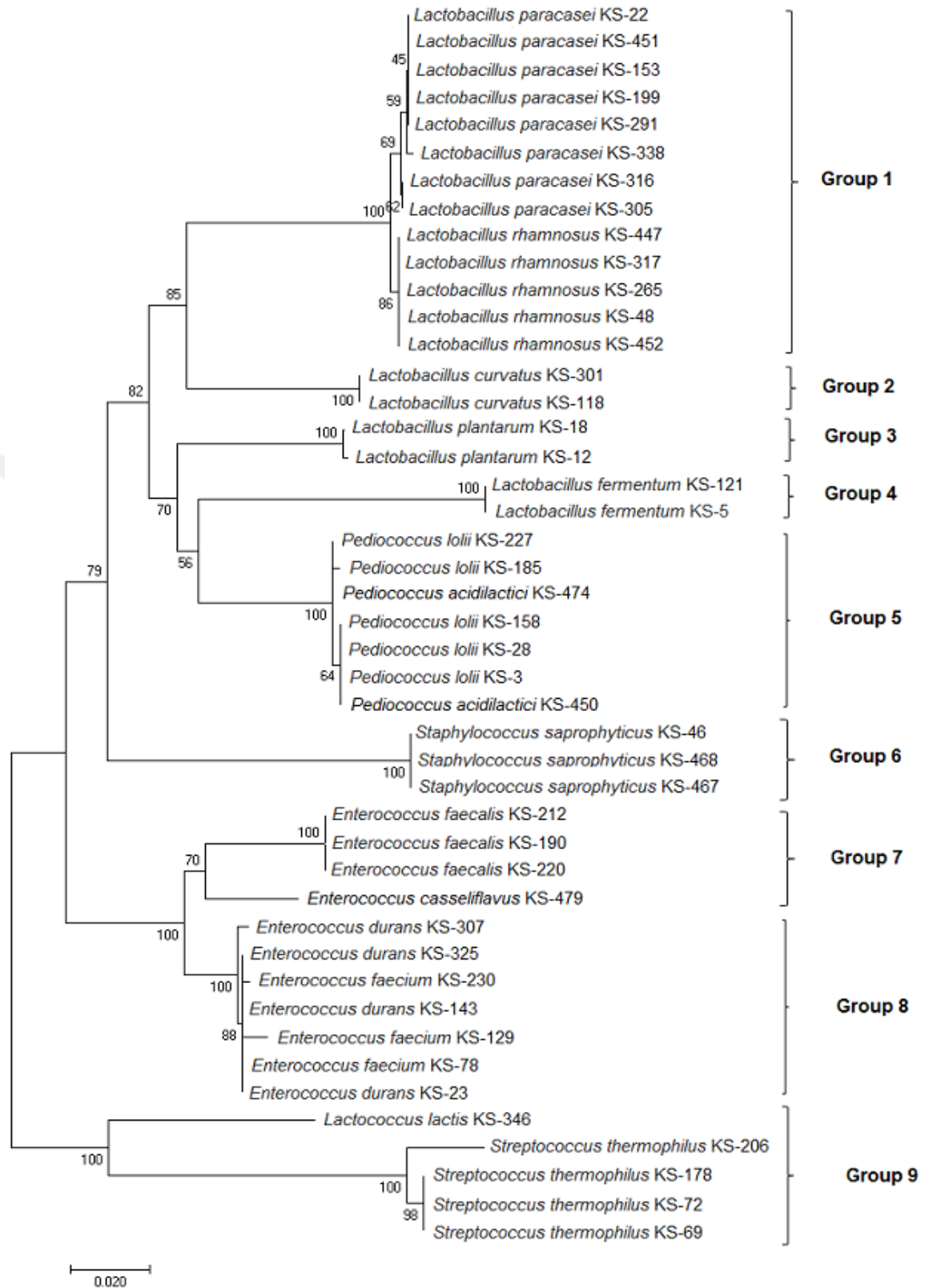
Çizelge 4.9 Kaşar peyniri örneklerde bulunan maya-küf türleri ve sayıları

Maya-Küf Türleri	Örnek Numaraları						Toplam	Yüzde (%)
	A	B	C	D	E	F		
<i>Candida poropsilosis</i>	3	1	-	2	1	4	11	6,55
<i>Kluyveromyces marxionus</i>	3	3	4	3	1	6	20	11,90
<i>Candida zeylanoides</i>	3	4	8	1	4	4	24	14,29
<i>Pichia kudriavzevii</i>	8	9	5	11	9	12	54	32,14
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2	-	-	-	-	-	2	1,19
<i>Kluyveromyces lactis</i>	3	1	4	7	1	3	19	11,31
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	-	-	-	1	1	0,60
<i>Penicillium crustosum</i>	2	4	2	4	3	8	23	13,69
<i>Penicillium kewense</i>	-	1	-	1	3	3	8	4,76
<i>Penicillium commune</i>	2	1	-	-	-	1	4	2,38
<i>Galactomyces candidum</i>	1	-	-	-	1	-	2	1,19
Toplam	27	24	23	29	23	42	168	100

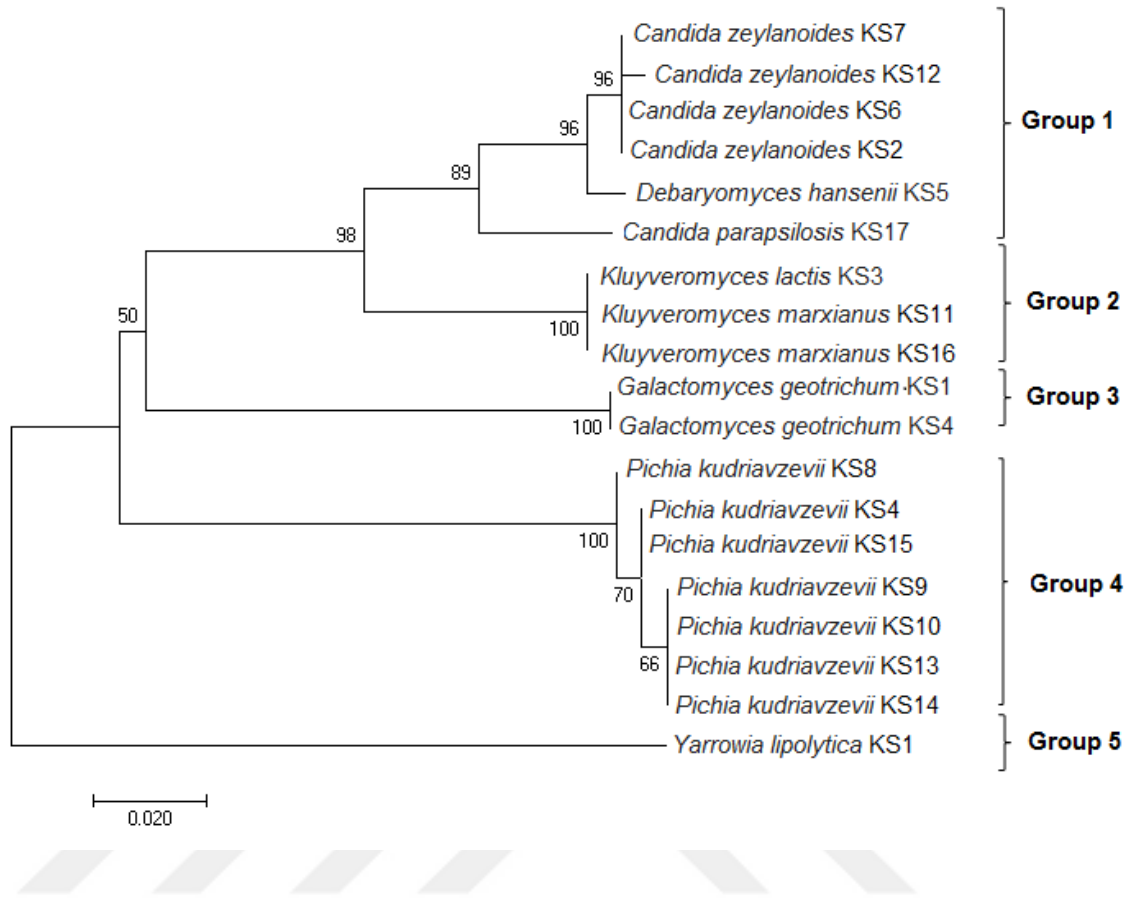
4.3.2 Bakteri ve mayalara ait filogenetik benzerlikler

Bakteri gruplarına ait filogenetik analiz sonuçları Şekil 4.10'da mayalara ait filogenetik analiz sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir. Bakterilere ait filogenetik analiz sonucunda 9 farklı grup oluşmuştur. Dendograma bakıldığında 1. grubun *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus rhamnosus*, 5. grubun *Pediococcus lolii* ve *Pediococcus acidilactici* türlerinden oluştuğu görülmüştür. 7. grupta *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus casseliflavus*, 8. grupta *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecium* türlerinin bulunduğu, diğer türlerinde kendi grupları arasında bir araya geldikleri tespit edilmiştir. Farklı suş ve türlerin 16S genine bağlı olarak bir araya gelişi kaynakları itibariyle de benzerlik gösterebilecekleri anlamına gelmekte ve bu açıdan önem taşımaktadır.

Şekil 4.11'e göre mayaların filogenetik analizi sonucunda 5 grup oluştuğu, 1. grupta bulunan *C. Zeylanoides*, *D. hansenii* ve *C. Parapsilosis*'in filogenetik açıdan benzer olduğu tespit edilmiştir. *K. marxianus* türleri ve *K. lactis* türleri birlikte 2. grupta yer alırken 3. grubun iki *G. Geotrichum* türünü, 4. grubun 7 *P. kudriavzevii* türünü içerdiği belirlenmiştir. Son olarak 5. grubu oluşturan *Y. Lipolytica* bu çalışmada izole edilen diğer maya türlerine en az benzeyen tür olmuştur.



Şekil 4.10 Bakteri türlerine ait filogenetik dendrogram



Şekil 4.11 Maya türlerine ait filogenetik dendrogram

5. SONUÇ

Bu çalışma; geleneksel yöntemlerle üretim yapan altı farklı üretim yerinden temin edilen Kars Kaşarlarının ön olgunlaştırma dönemlerinde mikrobiyal floralarındaki gelişimi ve değişimi belirlemek için yapılmıştır. Bu kapsamda kaşar peyniri ile ünlü ilimiz Kars'tan temin edilen peynir örneklerinden bakteri, maya ve küf izolasyonu için uygun besiyerlerine ekim yapılmış akabinde RAP-PCR ve rep-PCR analizleri yürütülmüş ve PCR ürünlerine sekans analizi uygulanmıştır. Böylece izole edilen mikroorganizma gruplarının tanımlaması yapılmış, bu gruplar içindeki hakim türler belirlenmiş ve akrabalık ilişkileri incelenmiştir. Ayrıca peynir örneklerinin bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Kars Kaşarının bakteri, maya ve küf türleri bakımından zengin bir flora ile sahip olduğunu göstermiştir.

Olgunlaşma süresince peynir örneklerinde bulunan bakteri grupları içerisinde yer alan LAB türleri ve NSLAB türleri belirlenmiştir. LAB türleri içerisinde hakim florayı *Lactobacillus paracasei*'nin oluşturduğu (%12,98) tespit edilmiştir. Bunu %8,42 ile *Lactobacillus rhamnosus* takip ederken, en az bulunan tür %2,81'lik oran ile *Lactobacillus plantarum* olmuştur. Örneklerde tespit edilen diğer bakteri gruplarında en baskın türler %14,04 ile *Enterococcus faecium* ve %12,63 ile *Pediococcus lolii*'dir. Bu gruplardan NSLAB türü olabilecek veya patojen özellik gösterebilecek floralar da izole edilmiştir. NSLAB türlerinin taze peynirlerde düşük seviyelerde buldukları ve olgunlaşma süreci esnasında sayılarının arttığı düşünülmektedir. NSLAB türlerinin starter kültürlerin oluşturdukları son ürünleri, amino asitleri, organik asitleri, yağ asitlerini ve gliserolü enerji kaynağı olarak kullanabildikleri bilinmektedir.

Peynir örneklerinin olgunlaşma sürecinde maya-küf florasının da oldukça zengin olduğu gözlemlenmiştir. Maya gruplarında en baskın tür olan *Pichia kudriavzevii* toplam maya-küf florasının %32,14'ünü oluşturmaktadır. Bunu %14,29 ile *Candida zeylanoides* takip ederken, %0,60 ile *Yarrowia lipolytica* grupta en az sayıda bulunan tür olmuştur. Maya türlerinin örneklerde olgunlaşmanın ilk günlerinden itibaren hakim olduğu ve olgunlaşma süresince çok fazla çeşitlilik göstermedikleri tespit edilmiştir. Küf gruplarında *Penicillium* türleri hakim florayı oluştururken en yaygın

olan tür %13,69 ile *Penicillium crustosum* olmuştur. Küf grupları örneklerde olgunlaşmanın ilerleyen safhalarında gelişme göstermişlerdir.

Peynir örneklerinden izole edilen bakteri grupları değerlendirildiği takdirde gruplar içerisinde starter kültür özellik gösterebilecek türlere ek olarak üretimde ilave kültür olarak kullanılabilir türler de izole edilmiştir. Bu floraların peynir üretiminde peynirin yapısı ve tadı üzerine olan etkileri bu çalışmayı takip eden çalışmalarda belirlenmeye çalışılacaktır. Benzer olarak belirlenen bakteri gruplarının farklı ortam koşullarında gelişimleri incelenip peynir özelliklerine göre oluşturulabilecek starter kültür kombinasyonlarının belirlenmesi de araştırılması planlanan çalışmalar arasındadır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile kaşar peyniri örneklerinin olgunlaşmanın ilk aşamalarındaki hakim bakteri-maya-küf türleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların ülkemizde gerçekleştirilmesi hedeflenen starter kültür kombinasyonu çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, (2014). Dünya’da ve Türkiye’de Peynir Üretimi. **Ankara Ticaret Borsası Raporu**
- Akın, M. S. (2012). *Accelerated Ripening of Kashar Cheese with Encapsulated Protease*. **African Journal of Biotechnology**. 11 (66), 13007-13015.
- Aran, N. ve Eke, D. (1987). *Mould Mycoflora of Kashar Cheese at The Stage of Consumption*. **Food Microbiology**. 4, 101-104.
- Aran, N. (1998). *A Microbiological Study of Kashar Cheese*. **Milchwissenschaft**. 53, 565-568.
- Atamer, M., Yamaner, N., Odabaşı, S., Tamuçay, B. ve Çimen, A. (1997). *Laktoperoksidaz / Tiyosiyanat / Hidrojen Peroksit (LP) Sisteminin Aktivasyonu ile Korunmuş Sütler ile Bunlardan Üretilen Teleme ve Kaşar Peynirlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri*. **Gıda (1997)**. 22 (5), 317-325.
- Atasever, M., Uçar, G., Keleş, A. ve Köse, Z. (2003). *Kaşar Peynir Üretiminde Doğal ve Sıvı Duman Uygulamalarının Kaliteye Etkisi*. **Türk J Vet. Anim. Sci.** 27, 781-787.
- Aydemir, O. (2010). *Kars Kaşar Peynirinin Karakterizasyonu*. **Doktora Tezi**, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Aydemir, O., Harth, H., Weckx, S., Dervişoğlu, M. ve De Vuyst, L. (2015). *Microbial Communities Involved in Kashar Cheese Ripening*. **Food microbiology**. 46, 587-595.
- Babacan, A. ve Özdemir S. (2013). *Farklı Tuzlama Yöntemlerinin ve Potasyum Sorbat Uygulamasının Kaşar Peyniri Mikrobiyolojisine Etkisi*. **8. Gıda Kongresi**, Ankara.

- Baker, G. C., Smith, J. J., and Cowan, D. A. (2003). *Review and Re-analysis of Domain-Specific 16S Primers*. **Journal of Microbiological Methods**. 55.3: 541-555.
- Banjara, N., Suhr, M. J., ve Hallen-Adams, H. E. (2015). *Diversity of Yeast and Mold Species From A Variety of Cheese Types*. **Current Microbiology**. 70, 792–800.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. and Cogan, T. M. (2001). *Recent Advances in Cheese Microbiology*. **International Dairy Journal**. 11, 259-274.
- Bilge F. ve Karaboz, İ. (2005). *İzmir'de Piyasada Açıkta Satışa Sunulan Bazı Gıdaların Staphylococcus aureus ve Enterotoksinleri Bakımından İncelenmesi*. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi (2005)**. 3 (6) 6.
- Carafa, I., Clementi, F., Touhy, K. and Franciosi, E. (2016). *Microbial Evolution of Traditional Mountain Cheese and Characterization of Early Fermentation Cocci for Selection of Autochthonous Dairy Starter Strains*. **Food Microbiology**. 53, 94-108.
- Çakmakçı, S., Dağdemir, E., Gürses, M., Çetin, B., Hayaloğlu, A.A., Hasenekoğlu, İ., Kahyaoğlu, D.T. (2010) *Küflü Civil Peynir Üretimi için Bazı Küflerin İzolasyonu, Tanımlanması, Peynir Üretiminde Kullanılması ve Üretilen Peynirlerin Karakterizasyonu* **TÜBİTAK Projesi, TOVAG 108O509**
- Çakmakçı, S., Şengül, M., Çağlar, A. (1995) *Karın Kaymağı Peynirinin Üretim Tekniği ve Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri*. **Gıda (1995)**. 20 (4) 199-203
- Çetinkaya, F. ve Soyutemiz, G.E. (2006). *Microbiological and Chemical Changes Throughout The Manufacture and Ripening of Kashar: A Traditional Turkish Cheese*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. 30, 397-404.
- Demirci, M. ve Dıraman, H. (1990). *Trakya Bölgesinde Üretilen Vakum Paketlenmiş Taze Kaşar Peynirlerinin Yapım Tekniği Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Nitelikleri ve Enerji Değerleri Üzerinde Bir Çalışma*. **T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Teknolojileri Bölümü**. 15 (2), 83-88.

- Demirel, M. (2013) **Dünya Ve Türkiye’de Süt Sektör İstatistikleri (1. Baskı)**. Ulusal Süt Konseyi, 31-59.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T. and Sağdıç, O. (2016). *Characterisation of Lactic Acid Bacteria From Turkish Sourdough and Determination of Their Exopolysaccharide (EPS) Production Characteristics*. **LWT-Food Science and Technology**. 71, 116-124.
- Erkan, M. E. ve Aksu, H. (2006). *Modifiye Atmosfer Paketleme Tekniğinin Dilimlenmiş Taze Kaşar Peynirinin Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi*. **İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**. 32 (1), 57-68.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condon, S., ve Swings, J., (2002). *Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-milk Cheese*. **Applied and Environmental Microbiology**. 68 (7), 3560-3565.
- Gülmez, M., Oral, N., Güven, A., Baz, E., Sezer, Ç. ve Duman, B. (2004). *Kars’ta Tüketime Sunulan Kaşar Peynirlerinin Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikleri*. **Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**. 10 (2), 183-188.
- Giraffa, G. (2002). *Enterococci From Foods*. **FEMS Microbiology Reviews**. 26, 163-171.
- Günşen, U., ve Büyükyörük, İ. (2003). *Piyasadan Temin Edilen Taze Kaşar Peynirlerinin Bakteriyojik Kaliteleri ile Aflatoksin M1 Düzeylerinin Belirlenmesi*. **Türk J Vet Anim Sci**. 27 (2003) 821-825.
- Halkman, A. K. and Halkman Z. (1991). *Kaşar Peyniri Starter Kültür Kombinasyonları Üzerine Bir Araştırma*. **Gıda (1991)**. 16(2), 99-105.
- Halkman, A.K., Yetişmeyen, A., Halkman, Z. ve Çavuş, A. (1992). *Kaşar Peyniri Üretiminde Starter Kültür Kullanımı Üzerinde Araştırmalar*. **TÜBİTAK, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu. Proje No: TOAG – TARMİK – 12**.

- Harrigan, W.F. (1998). **Laboratory Methods in Food Microbiology**. USA, San Diego: Academic Press. 532.
- Hayaloğlu, A. A. ve Kırbağ, S. (2007). *Microbial Quality and Presence of Moulds in Kufllu Cheese*. **International Journal of Food Microbiology**. 115, 376–380.
- Hayaloğlu, A. A. (2008). *Türkiye'nin Peynirleri-Genel Bir Perspektif*, **Türkiye 10. Gıda Kongresi**. Erzurum, 729-732.
- Kamber, U. (2005a). *Kars'ta Satışa Sunulan Kaşar ve Çeçil (Civil) Peynirlerinin Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalite Nitelikleri*. **Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**. 11 (1), 33-38.
- Kamber, U. (Ed.) (2005b) **Geleneksel Anadolu Peynirleri**. Miki Matbaacılık San. Tic. A.ř. Ankara, 84-87.
- Kamber, U. (2007). *The Traditional Cheeses of Turkey: Cheeses Common To All Regions*. **Food Reviews International**. 24,1–38.
- Kıvanç, M. (1989). *Erzurum Piyasasında Tüketime Sunulan Kaşar Peynirlerinin Mikrobiyal Florası*. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi TÜT Bölümü**. 14 (1), 23-30.
- Kurt, A., Çakmakçı S. ve Çağlar A. (2012). **Süt ve Mamülleri Muayene Analiz Metotları Rehberi** (10. Baskı). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 149-154.
- Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J.C. (1995). *Associated Mycoflora of Cheese*. **Food Microbiology**. 12, 173-180.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Mosehopoulou, E., Kandarakis, I.G. ve Anifantakis, E.M. (2003). *Evolution of Microbial Populations During Traditional Feta Cheese Manufacture and Ripening*. **International Journal of Food Microbiology**. 82 (2), 153-161.
- Marino, M., Maifreni, M. ve Rondinini, G. (2003). *Microbiological Characterization of Artisanal Montasio Cheese Analysis of Its İndigenous Lactic Acid Bacteria*. **FEMS Microbial Lett.**, 229, 133–140.

Metin, M. (2012). **Süt ve Mamülleri Muayene Analiz Metotları Rehberi** (6. Baskı). İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları Rektörlük Yayın No: 9, 321-329.

Mikrobiyoloji.org, (2016). *Staphylococcus aureus* Analiz Yöntemleri. www.mikrobiyoloji.org. 27.05.2016.

Nizamlıoğlu, M., Doğruer, Y. ve Gürbüz, Ü. (1996). *Potasyum Sorbatın Beyaz Peynirin Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kalitesine Etkisi*. **Veterinerlik Bilimleri Dergisi**. 12 (1), 190-116.

Öksüz, Ö., Kurultay, S., and Şimşek, O. (2001). *The Effect of Brevibacterium Linens On Some Physico-Chemical Properties and Colour Insenty of Kashar Cheese*. **Milchwissenschaft**. 56 (2), 82-85.

Öksüztepe, G., Padır, B., Dikici, A. ve İlhak O. İ. (2009). *Elazığ'da Tüketime Sunulan Vakum Paketli Taze Kaşar Peynirlerinin Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi*. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veterinerlik Fakültesi Dergisi**. 23 (2), 89-94.

Özdemir, S., Yangılar, F., Özdemir, C. 2013 *Some Chemical Properties of Karin Kaymagi Cheese Samples Produced in Dairy Plant*. **African Journal of Food Science and Technology**. 4 (3), 48-52.

Öztürkoğlu Budak, S., Figge, M. J., Houbraken, J. and P. de Vries, R. (2015). *The Diversity and Evolution of Microbiota in Traditional Turkish Divle Cave Cheese During Ripening*. **International Dairy Journal**. 1-4.

Pereira-Dias, S., Potes, M. E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M., ve Loureiro, V. (2000). *Characterisation of Yeast flora Isolated From An Artisanal Portuguese Ewes' Cheese*. **International Journal of Food Microbiology**. 60, 55–63.

Riemelt, I., Bartel, B. and Malczan, M. (1996). *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*. **Hamburg: Behr's Verlag**. 382.

- Sahan, N., Yasar, K., Hayaloğlu, A.A., Karaca, O.B. and Kaya, A. (2008). *Influence of Fat Replacers on Chemical Composition, Proteolysis, Texture Profiles, Metability and Sensory Properties of Low-Fat Kashar Cheese*. **Journal of Dairy Research**. 75, 1-7.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). *The Neighbor-Joining Method: A New Method For Reconstructing Phylogenetic Trees*. **Molecular Biology and Evolution**. 4, 406-425.
- Sengun, I., Yaman, D., Gonul, S. (2008). *Mycotoxins and Mould Contamination in Cheese: A Review*. **World Mycotoxin Journal**. 1, 291-298.
- Settanni, L., Moschetti, G. (2010). *Non-Starter Lactic Acid Bacteria Used To Improve Cheese Quality and Provide Health Benefits*. **Food microbiology**. 27, 691-697.
- Speck, M. L. (1984). *Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Foods*. **Washington: American Public Health Association**.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. **Molecular Biology and Evolution**. 28, 2731-2739.
- Tekinşen, O.C. (2000). **Süt Ürünleri Teknolojisi (3. Baskı)**. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Temiz. A. (2010). **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri (5. Baskı)**. Ankara: Hatipoğlu Yayınları: 96, 212-215.
- TPE (2014), *Kars Kaşarı Coğrafi İşaret Kayıt Sertifikası Türk Patent Enstitüsü*, Ankara, Türkiye.
- TSE 3272 (2016), *Kaşar Peyniri Standardı*. **Türk Standartları Enstitüsü**, Necati Bey Cad. No:112, Bakanlıklar, Ankara.

TÜİK (2016), *Sanayi Ürünleri Yıllık Üretim ve Satış İstatistikleri*, **Türkiye İstatistik Kurumu**, Devlet Mah. Necati Bey Cad. No:114, Çankaya, Ankara.

Turgut, T., Erdoğan, A. ve Atasever, M. (2012) *Karın Kaymağı Peynirinden İzole Edilen Laktobasillerin Tanımlanması*. **Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**. 18 (2): 209-213.

Üçüncü, M. (2004). **A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi**. İzmir: Meta Basım Matbaacılık.

Üçüncü, M. (2012). **Süt ve Mamülleri Teknolojisi (3. Baskı)**. İzmir: Meta Basım Matbaacılık, 185.

Welthagen, J.J., Viljoen, B.C. (1998). *Yeast Profile in Gouda Cheese During Processing and Ripening*. **International Journal of Food Microbiology**. 41, 185-194.

Var, I., Erginkaya, Z., Güven, M. and Kabak, B. (2006). *Effect of Antifungal Agent and Packaging Material on Microflora of Kashar Cheese During Storage Period*. **Food Control**. 17, 132-136.

Varnam, A. H. and Sutherland, J. P. (1996). *Milk and Milk Products*. **London: Chapman and Hall**. 451.

Vilela, R., Mendoza, L., Rosa, P. S., Belone, A. F. F., Madeira, S., Opromolla, D. V. A., Resende, M. A. (2005). *Molecular Model for Studying the Uncultivated Fungal Pathogen *Lacazia loboi**. **Journal of Clinical Microbiology**. 43 (83) 657–3661.

Yaldız, O. ve Kurdal, E. (2003). *Kırklareli İl Merkezinde Tüketime Sunulan Taze ve Eski Kaşarların Kimyasal Bileşimlerinin ve Hijyenik Kalitesinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma*. **Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi**. Sayı:3.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe YUVAŞEN



Memur bir baba ve ev hanımı bir annenin beş çocuğundan dördüncüsü olarak 4 Eylül 1992 yılında doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini memleketi olan Erzurum'da tamamladıktan sonra 2010 yılında Bayburt Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde okumaya hak kazandı. 2014 yılında eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl içerisinde Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladı.

Yayınlanan Makaleler

Akın, N., Dertli, E., İspirli, H., **Yuvaşen, A.**, Akaya, Z. 2016. Determination of functional characteristics, presence of virulence factors and antibiotic resistance of Enterococci isolated from Turkish White-Cheese. *Journal of Biotechnology* 231S: S4 - S109.

Yuvaşen, A., Macit, E., Dertli, E. 2018. Microbial species playing roles for the production of traditional Kasar cheese during pre-maturation period. *LWT - Food Science and Technology* 91: 406–413.