

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

DOKTORA TEZİ

**GELENEKSEL URFA PEYNİRİNDE YER ALAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
STARTER KÜLTÜR OLARAK KULLANIM OLANAKLARI**

Hüseyin Avni KIRMACI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2010**

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	4
2.1.1. <i>Lactobacillus</i> spp.....	5
2.1.2. <i>Lactococcus</i> spp.....	5
2.1.3. <i>Enterococcus</i> spp.....	6
2.1.4. <i>Leuconostoc</i> spp.....	6
2.1.5. <i>Streptococcus</i> spp.....	7
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Fonksiyonel Özellikleri.....	7
2.2.1. Asit Üretimi.....	8
2.2.2. Aroma Oluşumu.....	9
2.2.3. Antimikrobiyel Özellikleri.....	10
2.3. Peynir Üretiminde Starter Olarak Kullanılan Laktik Kültürler.....	10
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması.....	12
2.4.1. Fenotipik ve Biyokimyasal Yöntemlere Dayalı Sınıflandırma.....	12
2.4.2. Moleküler Tanı Metotları.....	13
2.5. Geleneksel Peynirlerdeki Doğal Laktik Flora ve Önemi.....	16
2.6. Geleneksel Urfa Peyniri.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Örnek Alma.....	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	25
3.2.2. Laktik Asit Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu.....	26
3.2.2.1. Morfolojik, Fenotipik ve Biyokimyasal Yöntemlerle İdentifikasyonu.....	26
3.2.3. Suşların 16S rDNA Sekans Analizi ile Moleküler Olarak Sınıflandırılması.....	27
3.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	27
3.2.3.2. PCR.....	28
3.2.3.3. 16S rDNA PCR Parametreleri.....	28
3.2.3.4. PCR Örneklerinin Agoroz Jelde Yürütülmesi.....	29
3.2.4. İzolatların Teknolojik Karakterizasyonu.....	29
3.2.4.1. İzolatların Bakteriyosin Üretebilme Durumları.....	29
3.2.4.2. İzolatların Asidifikasyon Kapasitesi.....	30
3.2.5. Peynir Üretimi.....	31
3.2.5.1. Materyal.....	31
3.2.6. Yöntem.....	32
3.2.6.1. Kültürlerin Aktifleştirilmesi.....	32
3.2.6.2. Peynir Yapımı.....	33
3.2.7. Peynir Denemesinde Uygulanan Analizler.....	38

3.2.7.1. Çiğ Süt Analizleri.....	38
3.2.7.1.1. Kurumadde.....	38
3.2.7.1.2. pH.....	38
3.2.7.1.3. Titrasyon asitliği.....	38
3.2.7.1.4. Yağ.....	38
3.2.7.1.5. Toplam azot (TN).....	38
3.2.7.1.6. Laktoz.....	39
3.2.7.2. Peyniraltı Suyu Analizleri.....	39
3.2.7.2.1. Kurumadde.....	39
3.2.7.2.2. pH.....	39
3.2.7.2.3. Titrasyon asitliği.....	39
3.2.7.2.4. Yağ.....	39
3.2.7.3. Peynir Analizleri.....	40
3.2.7.3.1. Kimyasal analizler.....	40
3.2.7.3.1.1 Titrasyon asitliği.....	40
3.2.7.3.1.2. pH.....	40
3.2.7.3.1.3. Kurumadde.....	40
3.2.7.3.1.4. Yağ.....	40
3.2.7.3.1.5. Tuz.....	40
3.2.7.3.1.6. Toplam Azot (TN).....	40
3.2.7.3.1.7. Suda çözünen azot (WSN).....	41
3.2.7.3.1.8. Suda çözünen azotların ayrıştırılması.....	41
3.2.7.3.1.9. Toplam serbest amino asit konsantrasyonu.....	42
3.2.7.3.1.10. SPME GC-MS ile uçucu maddelerin analizi.....	42
3.2.7.4. Elektroforetik Analizler.....	43
3.2.7.4.1. Ekstraksiyon ve Fraksiyon.....	43
3.2.7.4.1.1. pH 4.6'da ekstraksiyon.....	43
3.2.7.4.1.2. %70 Etanol ile alt fraksiyonlara ayırma.....	43
3.2.7.4.2. Üre poliakrilamid jel elektroforezi (Urea-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi.....	43
3.2.7.5. RP-HPLC ile peptit profil analizi.....	46
3.2.7.6. Duyusal Analizler.....	47
3.2.7.7. İstatistik.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	50
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	50
4.2. Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler.....	51
4.3. 16S rDNA Sekans Dizi Analizi İle İzolatların Moleküler Olarak Karakterizasyonu.....	58
4.3.1. Tanımlaması Yapılan Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri.....	71
4.4. Tanımlaması Yapılan İzolatların Teknolojik Özellikleri.....	73
4.4.1. Asit Üretimi.....	73
4.4.2. Bakteriyosin Üretim Özelliğinin Belirlenmesi.....	82
4.5. Deneme Peyniri Araştırma Bulguları ve Tartışma.....	89
4.5.1. Urfa Peynirine İşlenen Koyun Sütünün ve PAS Kimyasal Kompozisyonu.....	89
4.5.2. Deneme Peynirinin Kimyasal Kompozisyonu.....	90
4.5.2.1. Kurumadde.....	90
4.5.2.2. Kurumaddede Yağ.....	90

4.5.2.3. Kurumaddede Tuz Değerleri.....	91
4.5.2.4. pH.....	92
4.5.2.5. Toplam Asitlik.....	92
4.5.2.6. Toplam Aerofilik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayısı	94
4.5.2.7. Proteoliz.....	95
4.5.2.7.1. Toplam azot (TN) değişimi	95
4.5.2.7.2. Suda çözünen azot (WSN) değişimi.....	96
4.5.2.7.3. Olgunlaşma katsayısı değişimi (WSN/Toplam azot N x 100).....	97
4.5.2.7.4. Deneme peynirinin elektroforetik özellikleri.....	98
4.5.2.7.5. Deneme peynirinin peptid profili.....	102
4.5.2.7.5.1. Suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profili.....	102
4.5.2.7.5.2. % 70 etanolde çözünen ve çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptid profilleri.....	107
4.5.2.8. Peynirlerin Toplam Serbest Aminoasit Konsantrasyonu Değişimi.....	110
4.5.2.9. Uçucu Aroma Bileşikleri.....	112
4.5.2.9.1. Esterler.....	113
4.5.2.9.2. Alkoller.....	114
4.5.2.9.3. Aldehitler.....	116
4.5.2.9.4. Ketonlar.....	117
4.5.2.9.5. Terpenler.....	119
4.5.2.9.6. Asitler.....	120
4.5.2.9.7. Diğer bileşenler.....	121
4.5.2.10. Duyusal Değerlendirmeler.....	123
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	126
KAYNAKLAR.....	133
ÖZGEÇMİŞ.....	148
ÖZET.....	149
SUMMARY.....	151

ÖZ
Doktora Tezi
GELENEKSEL URFA PEYNİRİNDE YER ALAN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
STARTER KÜLTÜR OLARAK KULLANIM OLANAKLARI

Hüseyin Avni KIRMACI
Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Barbaros ÖZER
Yıl:2010, Sayfa: 152

Bu çalışmada biyokimyasal, fenotipik ve genotipik yöntemler yardımı ile çiğ koyun sütünden geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde hakim laktik floranın suş düzeyinde karakterizasyonunun yapılması ve endüstriyel düzeyde Urfa peyniri üretiminde kullanılabilecek özgün starter kültür çeşidinin belirlenmesine yönelik veri elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; Şanlıurfa ilinin farklı bölgelerinde geleneksel olarak üretilen 20 adet taze peynir örneği toplanmış ve % 14 (w/v) tuz içeren salamura içerisinde 3 ay depolandıktan sonra mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Farklı besiyerlerinden izole edilen (MRS, M17 ve KAA) 180 izolatın Gram boyama ve katalaz testlerinden sonra 143 izolat laktik asit bakterisi olarak tanımlanmıştır. Fenotipik testler ve 16S rDNA sekans dizi analizi ile izolatların tür ve suş düzeyinde sınıflandırmaları yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre 143 izolatın % 48.95 *Enterococcus* spp., % 40.55'inin *Lactococcus* spp., % 9.10'unun *Lactobacillus* spp., % 0.69'unun *Streptococcus* spp., % 0.69'unun ise *Leuconostoc* spp. türüne ait olduğu belirlenmiştir. En baskın tür olarak tespit edilen enterokokların % 40,0'ı *Enterococcus faecium*, % 32.8'i *E. durans*, % 18.5'i *E. faecalis*; laktokoların % 62.71'i *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, % 30.50'si ise *Lactococcus garvieae* olarak sınıflandırılmıştır. Laktokok grubu bakterilerin büyük bir çoğunluğu (%74.57) % 6.5 NaCl'de gelişim göstererek laktokoklara göre atipik özellik göstermiştir. İzole edilen tüm suşların kapasiteleri ve bakteriyosin üretime yetenekleri incelenmiştir. Bu sonuçlar ışığında 3 laktokok izolatı (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* suş no:62, *Lactococcus garvieae* suş no:44, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* suş no:63) starter kültür olarak kullanılarak Urfa peyniri üretilmiştir. 90 gün olgunlaştırılan peynirlerde depolama süresince kimyasal analizler yapılmış ve elde edilen sonuçlar önceki çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Depolama süresince deneme peynirinin proteoliz düzeyinin belirlenmesinde üre-PAGE elektroforez, RP-HPLC peptid profilleri ve toplam serbest amino asit analizleri yapılmıştır. Depolamanın 90. gününde α_{s1} -kazein parçalanma ürünlerinin açığa çıktığı belirlenmiştir. Olgunlaşma periyodu süresince hem hidrofilik hem de hidrofobik peptidlerin konsantrasyonunda artış meydana geldiği belirlenmiştir. Toplam serbest amino asit içeriğinde de depolama süresince sınırlı ancak düzenli bir artış olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar piyasa örnekleri ile karşılaştırıldığında deneme peynirinde meydana gelen proteoliz düzeyinin piyasa örneklerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Deneme peynirinin uçucu maddelerin bileşen profilinde olgunlaşma süresince meydana gelen değişimler SPME GC-MS tekniği ile izlenmiş ve buna göre 66 farklı uçucu aroma bileşeni tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Urfa peyniri, laktik flora, genotipik testler, 16S rDNA, proteoliz, starter kültür

ABSTRACT
Ph.D. Thesis
ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN
TRADITIONAL URFA CHEESE AND POSSIBLE USE AS A STARTER CULTURE

Hüseyin Avni KIRMACI
Harran University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. H. Barbaros ÖZER

Year:2010, Pages: 152

In this study, characterization of dominant strains of lactic flora in traditional Urfa cheese made from sheep's milk, was done using biochemical, phenotypic and genotypic methods. Selection of promising species and strains of lactic acid bacteria for the purpose of development of novel starter culture candidates was the prime aim of the present study. For this purpose, 20 fresh Urfa cheese samples were collected from 4 different regions of Şanlıurfa province. The cheeses were stored in dense brine solution (14%, w/v) under controlled conditions for a period of 3 months. Microbiological cultivation was carried out using M17, MRS and KAA mediums. In total, 180 isolates were harvested and 143 of them were characterized as lactic acid bacteria. 143 isolates were classified using phenotypic tests and 16S rDNA sequence analysis. According to the results obtained the percentage distributions of the lactic acid bacteria isolated were as follows: 48.95 % *Enterococcus* spp., 40.55 % *Lactococcus* spp., 9.10 % *Lactobacillus* spp., 0.69 % *Streptococcus* spp. and 0.69 % *Leuconostoc* spp. Among the *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecium* (40.0 % of total enterococcus strains) was the most frequently present species, followed by *E. durans* (32.85 %), *E. faecalis* (18.57 %), respectively. *Lactococcus lactis* spp. (62.71 % of total lactococcus species) and *Lactococcus garvieae* (30.50 %) were the most frequently present lactococci species. The majority of lactococcal isolates showed an atypical phenotypic behaviour since they grew in the presence of 6.5 % NaCl. Acidification and bacteriocin production abilities were also determined for each isolate. Three lactococcus isolates (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* (strain no:62), *Lactococcus garvieae* (strain no:44), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (strain no:63) were used as candidate starter culture in the production of Urfa cheese. During 90 days of storage, chemical analysis were carried out and the results of the experimental cheese were compared with previous studies. To determine the level of proteolysis during ripening period of the experimental cheese, urea-PAGE electrophoresis, RP-HPLC and total free amino acid analysis were carried out. Urea-PAGE electrophoretograms revealed that at the end of ripening period, α_{s1} -casein degradation products became visible. The peptide profile of the cheese sample as determined by RP-HPLC during ripening period showed that both hydrophilic and hydrophobic peptide concentrations were increased. Accordingly, total free amino acid content increased to a limited extend during ripening period. Results revealed that the development of proteolysis in Urfa cheese was rather limited, compared with the market samples. A total of 66 volatile components were identified during ripening period of cheese samples by solid-phase microextraction by gas chromatography-mass spectrometry.

KEY WORDS: Urfa cheese, lactic flora, genotypic methods, 16S rDNA, proteolysis, starter culture

TEŞEKKÜR

Araştırma konusunun seçiminde ve çalışmanın yürütülmesi aşamasında ilgi ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Barbaros ÖZER'e, Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Nuray Güzeler'e ve Yrd. Doç. Dr. Mutlu AKIN'a; Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı hocalarından Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e, Arş. Gör. Nefise AKKOÇ'a, lisans öğrencisi Seyit NESİMOĞLU'na; İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği'nden Doç. Dr. Adnan HAYALOĞLU'na, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni Ve Teknolojisi'den Yrd. Doç. Dr. Ahmet DİNÇOĞLU'na, ayrıca tezin yazımı sırasında bana her yönüyle destek olan sevgili eşim Zuhal KIRMACI ve biricik kızım Ceren KIRMACI'ya teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Urfa peyniri üretim aşamaları	34
Şekil 3.2. Sağım yapılan İvesi ırkı koyunlar	35
Şekil 3.3. Sağılan sütün kapta toplanması.....	35
Şekil 3.4. Sütün mayalanması.....	35
Şekil 3.5. Pıhtı oluşumu için kabın sarılması.....	35
Şekil 3.6. Pıhtının kesilmesi.....	35
Şekil 3.7. Pıhtının parzınlara doldurulması.....	35
Şekil 3.8. Pıhtının şekillendirilmesi.....	36
Şekil 3.9. Peynir toplarının süzdürülmesi.....	36
Şekil 3.10. Pastörize edilen sütün tekneye aktarılması.....	36
Şekil 3.11. Peynir pıhtısının kesilmesi.....	36
Şekil 3.12. Peynir altı suyunun süzülmesi.....	36
Şekil 3.13. Teleme.....	36
Şekil 3.14. Telemenin parzınlara konulması.....	37
Şekil 3.15. Parzınların bağlanması.....	37
Şekil 3.16. Peynirlerin süzülmesi.....	37
Şekil 4.1. Urfa peynirlerinden izole edilen toplam 143 izolata ait Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bantları.....	61
Şekil 4.2. 2 nolu suşun 18 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu zon.....	84
Şekil 4.3. 42. nolu suşun 18 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu zon.....	84
Şekil 4.4. 8. nolu suşun 18 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu zon.....	85
Şekil 4.5. 42 nolu suş, D; direk N; pH nötrlenmiş.....	85
Şekil 4.6. 24 nolu suş, D; direk N; pH nötrlenmiş.....	86
Şekil 4.7. 28 nolu suş, D; direk N; pH nötrlenmiş.....	86
Şekil 4.8. 2 nolu suş, D; direk N; pH nötrlenmiş.....	87
Şekil 4.9. 8 nolu suş, D; direk N; pH nötrlenmiş.....	87
Şekil 4.10. 9 nolu suş, D; direk N; pH nötrlenmiş.....	88
Şekil 4.11. Depolama süresince pH 4.6 çözünmeyen azot fraksiyonlarının Üre-PAGE elektrogramları.....	100
Şekil 4.12. Piyasada satışı sunulmuş geleneksel olgun Urfa peynirlerine ait Elektroforetogram.....	100
Şekil 4.13. Depolama süresince deneme peynirinin suda çözünen azot fraksiyonlarının Üre-PAGE elektrogramları.....	101
Şekil 4.14. Depolama süresince deneme peynirinin % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının Üre-PAGE elektrogramları.....	101
Şekil 4.15. Deneme peynirinin depolama süresince suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler.....	105
Şekil 4.16. Piyasada satılan geleneksel Urfa peynirlerinin suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler.....	106
Şekil 4.17. Deneme peynirinin depolama süresince % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler	108
Şekil 4.18. Deneme peynirinin depolama süresince % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler ...	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Bazı spesifik peynir çeşitlerinde kullanılan starter bakteriler.....	12
Çizelge 2.2. Fenotipik ve genotipik metotların bakterilerin sınıflandırılmasındaki etkileri.....	15
Çizelge 2.3. Farklı türde sütlerden geleneksel olarak üretilen peynirlerde laktik asit bakterilerinin dağılımı.....	19
Çizelge 2.4. Geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinde TAMB sayıları (log kob/g)	23
Çizelge 2.5. Farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinin kimyasal bileşimlerinde meydana gelen değişimler.....	24
Çizelge 3.1. Urfa peyniri duyuusal değerlendirme formu.....	49
Çizelge 4.1. 3 ay olgunlaştırılmış 20 adet peynir örneğine ait mikrobiyel sayım sonuçları.....	51
Çizelge 4.2. Tanımlaması yapılan laktokok ve enterekok izolatlarının bazı morfolojik ve fenotipik özellikleri.....	52
Çizelge 4.3. Tanımlaması yapılan laktobasil izolatlarının bazı morfolojik ve fenotipik özellikleri.....	57
Çizelge 4.4. 16S rDNA dizi analizi sekans sonuçlarına göre bakteri gruplarının alt türlere göre sınıflandırılması ve yakınlık dereceleri.....	62
Çizelge 4.5. İzolatların yağsız UHT sütte 3, 6, 9 ve 24 saatlik inkübasyon süresince oluşan pH değerleri.....	75
Çizelge 4.6. İzolatların yağsız UHT sütte 3, 6, 9 ve 24 saatlik inkübasyon süresince oluşan laktik asit değerleri (% l.a).....	79
Çizelge 4.7. Urfa peynirine işlenen çiğ koyun sütlerinin kimyasal kompozisyonu.....	89
Çizelge 4.8. Urfa peynirinden elde edilen PAS özellikleri.....	90
Çizelge 4.9. Depolama süresince deneme peynirinin kimyasal bileşimlerinde meydana gelen değişimler...	93
Çizelge 4.10. Depolama süresince deneme peynirindeki TAMB sayıları (log kob/g).....	96
Çizelge 4.11. Depolama süresince deneme peynirinin toplam serbest amino asit (mg/100 g) içeriğinde meydana gelen değişimler.....	112
Çizelge 4.12. Urfa peynir örneklerinde saptanan ester bileşikleri.....	114
Çizelge 4.13. Urfa peynir örneklerinde saptanan alkoller.....	115
Çizelge 4.14. Urfa peynir örneklerinde saptanan aldehitler	117
Çizelge 4.15. Urfa peynir örneklerinde saptanan metil ketonlar.....	118
Çizelge 4.16. Urfa peynir örneklerinde saptanan terpen bileşikleri.....	120
Çizelge 4.17. Urfa peynir örneklerinde saptanan asitler.....	121
Çizelge 4.18. Urfa peynir örneklerinde saptanan çeşitli bileşikler.....	122
Çizelge 4.19. Deneme örneklerine ait duyuusal değerlendirme sonuçları.....	123

1. GİRİŞ

Gerek kullanılan süt türü, gerekse üretim metodundaki farklılıklardan dolayı bugün dünyada yüzlerce peynir çeşidi üretilmektedir. Bu çeşitlerden yalnızca bir kısmı ticari anlamda önem taşıırken, çoğu peynir çeşidi yerel olarak üretilip, tüketime sunulmaktadır. Ülkemizde de bir kısmı ticari anlamda önem kazanmış ve yaygın tüketim alanı bulmuş, bir kısmı ise tamamen yerel olarak bilinen ve tüketilen birçok peynir çeşidi bulunmaktadır. Son yıllarda, yerel ölçekte üretimi gerçekleştirilen süt ürünlerinin endüstriyel boyuta taşınmasına yönelik çabalarda artış meydana gelmiştir. Bu çabaların temel çıkış noktaları hem yerel bilginin kaybının önlenmesi hem de süt ürünleri pazarında ürün çeşitliliğinin artırılmasıdır. Bu konu, AB 7. Çerçeve Programı'nın da öncelikli çalışma konuları arasında yer almaktadır.

Urfa peyniri de yerel peynir çeşitlerimizden olup Şanlıurfa ve çevresinde yaygın olarak tüketilmektedir. Urfa peynirinin geleneksel üretiminde genel olarak Şanlıurfa ili Karacadağ bölgesinin güneyi ile Suriye sınırı arasında kalan alanda yetiştirilen İvesi cinsi koyunlardan sağılan çiğ süt kullanılmakla birlikte, gerektiği durumlarda koyun ve keçi ile az da olsa koyun-inek sütü karışımlarından da yararlanılmaktadır (Özer ve ark., 2002a, b). Urfa peyniri üretiminde, süt sağım sıcaklığında ticari peynir mayası ile pıhtılaştırılmakta ve pıhtı parçalandıktan sonra yöresel olarak "*parzın*" adı verilen üçgen süzme bezlerine aktarılarak süzülmetedir. Serum ayrılmasının tamamen sona ermesinin ardından ham peynirler kaba tuz aracılığı ile 1-2 gün kuru tuzlama işlemine tabi tutulmakta ve sonrasında peynir kalıpları %15-17 NaCl, w/v salamura içerisinde olgunlaştırılmaktadır (Özer ve ark., 2002a).

Çiğ sütün kompleks laktik mikroflorası, Urfa peyniri gibi geleneksel olarak çiğ süttten üretilen peynirlerin özgün tat ve aromasının oluşumunda etkin rol oynamaktadır. Hijyenik üretim modelinin önemli bir basamağı olan ısıtma işlemi

ile doğal laktik flora inhibe/inaktive edildiğinden standart tat ve aroma ile tekstürel özelliklere sahip peynir eldesi için starter kültür kullanımı zorunlu hale gelmektedir.

Laktik asit bakterileri, süt ve süt ürünleri başta olmak üzere doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinin en önemli özelliği laktozdan ürettikleri laktik asit aracılığı ile sütün asitliğini yükseltmeleridir. Asitlik artışı hem kazein stabilitesini zayıflatmakta hem de rennin aktivitesini teşvik etmektedir. Dolayısıyla, peynir üretiminde kullanılan sütün pıhtılaşması kolaylaşmaktadır. Ayrıca, lipolitik ve proteolitik aktivitelerinden dolayı, peynirin olgunlaştırılması sırasında karakteristik tat, aroma ve tekstürün oluşumunda da laktik asit bakterilerinin önemli etkileri bulunmaktadır.

Geleneksel süt ürünlerinin endüstriyel düzeyde üretilmelerini olanaklı kılmak başlıca yolu, geleneksel ürünün florasının doğru tespit edilmesinden geçmektedir. Ardından, hakim floranın karakterizasyonunun yapılması ve starter kültür olarak üretimin uygunluğunun test edilmesi gerekmektedir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla bu bakterilerin morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile antibiyotik duyarlılıkları ve faj tiplerinin belirlenmesi ve serolojik olarak tiplendirilmelerini içeren klasik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Suş düzeyinde daha yüksek duyarlılıkta tanımlamayı sağlayan moleküler tekniklerden de son yıllarda faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerden her biri bakteri izolatlarını cins, tür, alttür ve suş düzeyinde sınıflandırmayı, tanımlamayı ve karakterize etmeyi amaçlamaktadır.

Bilindiği kadarı ile Urfa peyniri üretiminde kullanılmak üzere starter kültür geliştirilmesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu gerekçe ile, bu tez çalışması kapsamında biyokimyasal, fenotipik ve genotipik yöntemler aracılığı ile çığ koyun sütünden üretilen ve üç ay olgunlaştırılan Urfa peynirlerinde hakim laktik floranın suş düzeyinde karakterizasyonu ve endüstriyel üretimlerde kullanılabilir olacak özgün starter kültür çeşidinin belirlenmesine yönelik veri elde edilmesi amaçlanmıştır. Böylece, hakim floradan seçilecek suş(lar)ın, deneme üretiminde

kullanılabilmesi, peynir ortamındaki davranışının izlenebilmesi ve peynir kalitesine etkileri saptanarak endüstriyel anlamda veri aktarım olanağı sağlanacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri genel olarak; Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz-negatif, morfolojik olarak kok veya çubuk şeklinde, karbonhidrat fermentasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit üreten bakteriler olarak tanımlanırlar. Laktik asit bakterileri; süt, et ve sebze gibi besin içeriği bakımından zengin olan gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Laktik asit bakterileri gıdanın bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ile patojen mikroorganizmalar üzerinde sentezledikleri organik asitler, hidrojen peroksit, laktoperoksidaz, diasetil ve bakteriyosinler aracılığı ile antagonistik etki yaratmaktadır. Bu nedenle, bu mikroorganizmalar kullanılarak üretilen gıdalar, insan sağlığı açısından “güvenli gıdalar” olarak, bu tip bakteriler de ‘güvenli bakteriler’ olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri, karbonhidratları homofermentatif ya da heterofermentatif yolla fermente edebilmekte ve laktik asit başta olmak üzere asetik asit, formik asit, etanol ve CO₂ üretebilmektedir. Farklı türlerdeki laktik asit bakterileri morfolojik özellikleri, glikozu fermente edebilme yetenekleri, farklı sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında gelişebilme ve asit ve alkali ortamlara karşı dirençliliklerine göre sınıflandırılabilirler. Son yıllarda, gelişmiş moleküler tiplendirme teknikleri yardımı ile laktik asit bakterileri, fenotipik özellikleri esas alınarak yapılan gruplandırma ile daha doğru bir şekilde sınıflandırılabilirler. Toplam 12 adet laktik asit bakterisi cinsi bulunmaktadır. Bunlar: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella*. Bu cinsler içerisinde yalnızca 5 tanesi (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus*) süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Klein ve ark., 1998).

2.1.1. *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus cinsi bakteriler, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, DNA'larında genellikle % 50'den daha az Guanin+Sitozin (G+C) içeren çubuk ya da kokobasillerdir. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanan *lactobacillus* cinsi bakteriler ya homofermentatif (% 85'den fazla laktik asit üretirler) ya da heterofermentatifler [eşit molar oranlarda laktik asit, karbondioksit ve etanol ve/veya asetik asit üretirler]. *Lactobacillus* cinsi bakteriler gastrointestinal sistem dışında fermente gıdalarda da bulunmaktadır. *Lactobacillus* cinsi bakteriler starter ve/veya destek kültür (adjunct culture) ya da starter olmayan mikroflora (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB) olarak peynir olgunlaşması ve aroma gelişimine etki etmektedirler. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sitrat metabolizması sonucu oluşan asetat, etanol, asetaldehit ve diasetil gibi karbonil bileşikleri ve alkoller peynirin tat ve aroma gelişimine katkı yapmaktadır (Rea ve Cogan, 2003). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sitrat metabolizması suştan suşa farklılık göstermektedir. Bu bağlamda, peynir mikroflorasında bulunan bir çok *Lactobacillus* tür/alt türü peynirin aroma ve lezzetine katkıda bulunan çeşitli bileşenlerin üreticileri olarak görülmektedir (Mama ve ark., 2002). *Lactobacillus paracasei* subsp., *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'e ait suşlar peynir üretiminde kültür ya da destek kültür olarak kullanılabilir (Giraffa ve Rosetti, 2004).

2.1.2. *Lactococcus* spp.

N streptokok Lancefield grubunda yer alan mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğu *Lactococcus* olarak tanımlanmaktadır. *Lactococcus* cinsi bakteriler; homofermentatif, mikroaerofilik, Gram-pozitif bakterilerdir. Bu bakteri cinsinin üyeleri 10 °C'de gelişebilirken 45 °C'de gelişim gösteremezler ve glukozdan L(+) laktik asit oluşturma yeteneğine sahiptirler. Morfolojik olarak sarmal ve oval zincir hücreler şeklinde karakterize edilirler. *Enterococcus*, *Streptococcus*, ve *Leuconostoc* cinsi bakteriler ile benzer morfolojik özellik gösterdiği için bu bakterileri morfolojik olarak birbirinden ayırt etmek oldukça zordur. *Lactococcus* grubu bakteriler *Lactococcus garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* ve *Lc. lactis*

olmak üzere beş farklı tür içermektedir. Ancak, bu türler arasında yalnızca *Lc. lactis* süt teknolojisinde starter kültür olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu tür, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* olmak üzere iki alt tür ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* olmak üzere bir biovaryete içermektedir (Schleifer ve ark., 1985; Stiles ve Holzapfel, 1997). *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, yüksek diasetil üretme yeteneği ile *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alt türlerinden ayırt edilmektedir (Samarzija ve ark., 2001). *Lc. lactis* spp. *lactis* ise arjininden amonyak üretebilmesiyle *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alt türünden ayırt edilmektedir.

2.1.3. *Enterococcus* spp.

Enterococcus cinsi bakteriler hayvan ve insan bağırsak sisteminde yer almasının yanında süt ürünleri ve diğer fermente gıdalarda yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileridir. 0.5-1.0 µm çaplı oval, uzun zincir formunda bulunurlar ve genellikle hareketsizdirler. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* süt ürünlerinde en sık rastlanan türleridir. Bu türler özellikle Akdeniz havzasında hem çiğ hem de pastörize sütlerden geleneksel olarak üretilen peynirlerde yoğun olarak bulunmaktadır (Andrighetto ve ark., 2001; Giraffa, 2003; Suzzi ve ark., 2000). Tuza ve asitliğe karşı olan dirençlerine de bağlı olarak popülasyonları peynirlerde 5-7 kob/g düzeylerine kadar ulaşabilmektedir. Sitrati metabolize edebilme yeteneklerinden dolayı peynirin olgunlaşmasına ve aroma gelişimine katkıda bulunabilmektedirler. *Enterococcus* cinsi bakteriler, Feta, Mozzarella ve Cebreiro gibi farklı Avrupa tipi peynirler başta olmak üzere peynir endüstrisinde starter kültür kombinasyonunda kullanılmaktadır (Giraffa, 2003).

2.1.4. *Leuconostoc* spp.

Leuconostoc cinsi bakteriler de *Lactococcus* spp. gibi morfolojik olarak zincir ya da grup kok şeklindedirler. *Leuconostoc* spp. şekeri heterofermentatif olarak fermente etmeleri, L-laktat yerine D-laktat oluşturmaları gibi özellikleri ile *Lactococcus* spp.'den ayırt edilmektedir. *Leuconostoc* cinsi bakteriler, süt ve süt

ürünlerinde yer almayan asidofilik (*Leuconostoc oenos*) ve asidofilik olmayan (*Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesentereoides* ve *Leu. lactis*) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bu iki grup benzer RNA tipine ancak farklı DNA/DNA homolojisine sahiptirler. *Leuconostoc* cinsi bakteriler süt teknolojisinde starter kültürler grubu içerisinde yer alırlar ve sitrat metabolizmaları sonucunda diasetil oluşturmaları nedeniyle aroma oluşumunda önemli role sahiptirler.

2.1.5. *Streptococcus* spp.

Streptococcus cinsine ait yaklaşık 50 tür ve alttür bulunmaktadır. Gram-pozitif olan bu tür ve alttürler yuvarlak şekilli ve zincir formunda (0,2–0,5 µm çapında) bulunurlar (Cogan, 1995). *Streptococcus* spp.'lerin en tipik özellikleri kalın bir hücre duvarına sahip olmaları ve glukozu aerobik yolla metabolize etmeleridir. *Streptococcus* cinsine ait bazı türler patojenik karakter taşıırken bazı türler ise hastalık etmeni olmayan saprofit karakterlidir. *Streptococcus* cinsine ait 50 tür ve alttür arasında yalnızca *Streptococcus thermophilus* starter kültür olarak kullanılmaktadır. *Str. thermophilus*'un en yaygın kullanıldığı süt ürünleri yoğurt ve bazı İtalyan ve İsviçre tipi peynirlerdir (Limsowtin ve ark., 2002). *Str. thermophilus* termofilik bir bakteri olup fakültatif aerobiktir. Bu bakteri türü hareketsizdir ve spor oluşturmaz. Optimum gelişim sıcaklığı 40-45 °C olup en düşük ve en yüksek gelişim sıcaklıkları sırasıyla 20-25 °C ve 47-50 °C'dir. Isıl işlem uygulamalarına nispeten dirençli olan *Str. thermophilus* 60 °C'de 30 dakikalık ısıl işleme karşı canlılığını koruyabilmektedir. *Str. thermophilus*'un laktoz fermentasyonunun hakim son ürünleri laktik asit, asetaldehit ve diasetil, baskın laktik asit izomeri ise L (+)-laktattır. Bu bakteri türünün bir çok suşu polisakkarit materyal sentezleme yeteneğine sahiptir. Laktoz metabolizması ise fosfoenolpiruvat (PEP)'a bağlı fosfotransferaz (PTS) sistemi aracılığı ile gerçekleşmektedir. *Str. thermophilus*'un galaktoz metabolizması ile proteolitik ve peptidolitik etkileri *Lactococcus* spp.'lere oranla çok daha sınırlıdır (Sinha, 1991).

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Fonksiyonel Özellikleri

Laktik asit bakterileri, peynir başta olmak üzere birçok süt ürününün üretimi ve olgunlaşmasında endüstriyel düzeyde önem taşıyan mikroorganizmalardır. Peynir teknolojisi açısından laktik asit bakterilerinin teknolojik öneme sahip mikroorganizmalar olarak tanımlanmasında; bu mikroorganizmaların aroma geliştirme yeteneğinin olması, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit oluşturabilmeleri, bakteriyofajlara olan dirençlilikleri, laktoz ve sitrat metabolizmaları, antibiyotik ve ağır metallere dirençleri dikkate alınmaktadır (Samarzija ve ark., 2001; Aquilanti ve ark., 2006; Morandi ve ark., 2006; Fortina ve ark., 2007)

2.2.1. Asit Üretim Yetenekleri

Fermente süt ürünlerinin üretiminde yararlanılan starter mikroorganizmalar enerji gereksinimlerinin önemli bir bölümünü karbonhidrat metabolizması aracılığı ile karşılamaktadır. Karbonhidrat metabolizması hücre içerisinde gerçekleştiğinden karbonhidrat molekülünün hücre içerisine taşınımı fermentasyon mekanizmasının başlangıcını oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri karbonhidratları hücre içerisine iki farklı yol ile taşımaktadır. Birinci yolda hücre içi ile dışı arasındaki proton hareketliliği (laktoz-galaktoz antiport sistemi) ile teşvik edilen bir permeaz sistemi etkili olmaktadır (Zourari ve ark., 1992; Poolman, 1990). Bu sistemde hücre içerisinde metabolize edilmeyen galaktoz hücre dışına atılırken oluşan proton farklılığı nedeniyle hücre dışından laktoz hücre içerisine taşınmaktadır (de Vos, 1996). Laktozun hücre içerisine transferinde kullanılan ikinci metabolik yol ise fosfoenolpiruvata (PEP) bağlı fosfotransferaz sistemidir (PTS). Ağırlıklı olarak *Lactococcus* spp.'lerde yaygın olan bu sistemde glukoz hücre içerisine transfer edilirken aynı anda PTS tarafından fosforilize edilerek glukoz-6-fosfata dönüşmektedir. Hangi mekanizma ile hücre içerisine alınırsa alınsın laktozun katabolizması öncesinde laktozu oluşturan monosakkaritlerin (glukoz ve galaktoz) bir seri metabolik dönüşüme daha uğraması zorunludur. Glukoz hücre içerisinde piruvat ve ardından laktik asite kadar metabolize olurken galaktoz, permeaz sistemine sahip birçok suş tarafından kullanılamamaktadır. Genel olarak, starter bakteriler tarafından karbonhidratların metabolik ürünlere dönüşümü sırasında açığa çıkan enerji bakteriler tarafından yaşamsal enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Homolaktik fermentasyonda glukozun %90'ından fazlası laktik aside dönüşmektedir. Anaerobik koşullar altında gerçekleşen heterolaktik fermentasyonda ise eşit molar konsantrasyonlarda laktik asit, etanol ve CO₂ oluşumu da söz konusudur (Özer, 2007b).

Laktik asit bakterileri fermentatif olarak karbonhidratı kullanarak laktik asit üretmeleri sonucu pH'da azalmaya neden olurlar. Laktoz fermentasyonu nedeni ile pH'da meydana gelen düşüş sütte pıhtılaşmaya neden olmasından dolayı önem teşkil etmektedir. Asitlikte meydana gelen artış, ürünün tat, aroma ve tekstür özelliklerinde önemli değişimlere neden olmaktadır (Ross ve ark., 2000).

2.2.2. Aroma Oluşumu

Süt ürünlerinin karakteristik tat ve aroması, ağırlıklı olarak mezofilik ve termofilik starter bakteriler tarafından sentezlenen laktik asit, asetik asit, formik asit, bütirik, piruvik, oksalik ve süksinik asit gibi uçucu ya da uçucu olmayan organik asitler ile asetaldehit, diasetil, aseton gibi karbonil bileşiklerinden kaynaklanmaktadır (Tamime ve Robinson, 2007). Ayrıca, birçok laktik asit bakterisi amino asitlerden aroma bileşenleri sentezleme yeteneğine sahiptirler. Örneğin, *Lc. lactis* spp. *lactic*, *Lc. lactis* spp. *cremoris*, *Lactobacillus lactis*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *L. casei* metiyoninden metanetiyoil, dimetilsülfid ve dimetiltrisülfid oluşturma yeteneğine sahiptir. Peynir teknolojisi açısından aroma oluşumunu destekleyen en önemli metabolik yol sitrat metabolizmasıdır. Laktik asit bakterilerinin sitrat metabolizması zayıf olmakla birlikte özellikle bazı mezofilik starter laktik asit bakterilerinin sitrat metabolizması süt ürünlerinde tat/aroma oluşumunda birincil öneme sahiptir (Özer, 2007a). Sitrat, ağırlıklı olarak *Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. gibi mezofilik bakteriler tarafından metabolize edilirken, termofilik starter kültürler sitrat metabolizmasında rol oynayan enzim sistemine sahip değildir. Cit(+) *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Leuconostoc* spp.'lerin sitratı metabolize etme yetenekleri sitrat permeaz enzimine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Sitrat permeaz'ın optimum çalışma pH'sı 5.0-6.0'dır ve bu

enzimin aktivitesi büyük ölçüde pH'ya bağımlılık göstermektedir. Sitrat metabolizmasında etkili bir diğer parametre ise sıcaklıktır.

2.2.3. Antimikrobiyel Özellikleri

Laktik asit bakterilerinin patojen ya da patojen olmayan mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisi ağırlıklı olarak ürettiği laktik asitten kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılan bakterilerin bazı suşları tarafından sentezlenen bakteriyosinler de Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi yaratmaktadır (Gonzales ve ark., 2007). Bakteriyosinler, protein yapısında ve biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Bazı istisnalar dışında bakteriyosinler ısıya karşı dirençlidirler. Ülkemizde üretilen süt ürünlerinden izole edilen ve starter bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosin benzeri maddelerin 100 °C'de 10-20 dakikalık ısı işleme direnç gösterdiği ve *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* ve *Eschericia coli* gibi patojenik bakterilere karşı bakterisidal etkiye sahip oldukları bulunmuştur (Aslım ve ark., 2005). Molekül ağırlıklarına göre bakteriyosinler 3 sınıfa ayrılmaktadır (Nes ve ark., 1996). Bunlar; Class I (lantibiyotikler), Class II ve Class III bakteriyosinleridir.

Nisin bilinen en önemli lantibiyotik bakteriyosindir. Bazı *Lc.lactis* suşları tarafından üretilen nisin 50'den fazla ülkede, patojen bakteriler ve sporlarının gelişimini kontrol ederek gıdaların korunmasında ticari olarak kullanılmaktadır (McAuliffe ve ark., 2001). Son yıllarda; özellikle peynir ve yoğurt üretiminde kullanılan starter kültürlerin nisin üretme yetenekleri, starter kültür seçiminde bir kriter olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Bu tip kültürler "koruyucu kültür" adı verilmektedir. Bunun yanında, bakteriyosinler peynir olgunlaşması sırasında starter hücrelerin peynir matrisi içerisinde otolizini hızlandırmakta ve bu yolla aroma gelişiminin hız kazanmasına neden olmaktadır (Ross ve ark., 1999).

2.3. Peynir Üretiminde Starter Olarak Kullanılan Laktik Kültürler

Birçok peynir çeşidinin üretiminde, pıhtılaştırıcı enzim ilavesinin hemen öncesinde seçilmiş bazı laktik asit bakteri suşları peynire işlenecek sütte katılmaktadır. Laktik starterlerin başlıca fonksiyonu laktik asit ile asetik asit, asetaldehit ve diasetil başta olmak üzere aroma maddesi üretmektir. Bunun dışında üretilen, laktik asit hem rennet aktivitesini hızlandırmakta, hem de peyniraltı suyunun ayrılmasını (sinerez) kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda, istenmeyen mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisi yaratmaktadır. Starter kültür olarak da adlandırılan bu laktik asit bakterileri özellikle ısıtma işlemi uygulanan sütlerden üretilen peynirlerde standart bir tat ve aroma gelişiminin sağlanması açısından önem taşımaktadır. Günümüzde, süt ürünlerinin birçoğunun üretiminde kullanılan süt yasal ya da teknolojik zorunluluklar nedeniyle ısıtma işlemi tabii tutulurken peynir ayrıcalıklı grubu oluşturmaktadır. Hem teknolojik olarak sütün peynire dönüşümü sürecinde ısıtma işleminin zorunlu olmaması hem de olgunlaşma sürecinde ortaya çıkan metabolitlerin ve olgunlaşma sürecinde kullanılan tuzun istenmeyen mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkisi nedeniyle ısıtma işlemi peynir teknolojisinde gıda güvenliği açısından birincil öncelikli teknolojik işlem olmaktan çıkmaktadır.

Çiğ sütte üretilen peynirler özellikle Akdeniz şeridi boyunca yaygındır. Bu tip peynirlerde tat ve aroma ile tekstür gelişimi tamamen doğal laktik floraya bağlıdır. Bu peynir çeşitlerinin üretiminde yararlanılan doğal laktik floraya starter olmayan laktik asit bakterileri (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB) adı verilmektedir. NSLAB'ın flora kompozisyonu sütün elde edildiği bölgenin faunası ile yakından ilişkilidir ve geleneksel üretim bölgelerinin dışında üretimi gerçekleştirilen peynir çeşitlerinde karakteristik tat, aroma ve tekstürel özelliklerin elde edilmesi oldukça güçtür. Bu gerekçe ile geleneksel olarak çiğ sütte üretilen peynirlerin coğrafi orijinlerine uygunluk belgesi almalarına yönelik çabalar önem kazanmıştır.

Starter kültürler genel olarak mezofilik (optimum gelişim sıcaklığı ~30 °C) ve termofilik (optimum gelişim sıcaklığı ~42 °C) kültürler olarak iki grup altında sınıflandırılmaktadır. Peynir çeşitlerinin büyük çoğunluğunun üretiminde mezofilik kültürlerden yararlanılırken, termofilik kültürler üretim sırasında yüksek ısıtma işlemi

uygulanan peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bunun yanında, Mozzarella (Limsowtin ve ark., 1996; Parente ve ark., 1997) ve Cheddar (Beresford ve ark., 2001) peynirlerinde hem termofilik hem de mezofilik kültürler kullanılabilir. Çizelge 2.1’ de bazı yabancı tip peynirlerin üretiminde kullanılan starter kültür kombinasyonları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı spesifik peynir çeşitlerinde kullanılan starter bakteriler (Cogan ve ark., 1997; Hayaloglu ve ark., 2002)

	Peynir Çeşidi	Laktik Asit Bakteri Türü
1	Parmesan, Romano	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ve <i>Streptococcus thermophilus</i> karışımı
2	Cheddar	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i> .
3	İsviçre tipi Emmental	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i>
4	Provolone	Isıya dayanıklı <i>Lactobacillus</i> ve <i>Str. thermophilus</i>
5	Blue, Gorgonzola, Roquefort, Stilton	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> + <i>Penicillium roqueforti</i>
6	Camembert	<i>Lactococcus</i> spp.+ <i>Penicillium camemberti</i>
7	Brick, Limburger	<i>Str. thermophilus</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ; <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> + <i>Str. thermophilus</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>Str. thermophilus</i>
8	Muenster	<i>Str. thermophilus</i> + <i>Lactobacillus</i> türleri
9	Gouda ve Edam	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> + <i>Leuconostoc</i> spp.
10	Mozzarella	Isıya dayanıklı <i>Lactobacillus</i> ve <i>Str. thermophilus</i>
11	Cottage peyniri ve krem peyniri	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> + Cit(+) <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i>
12	Beyaz peynir	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> + <i>L. helveticus</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> + <i>L. plantarum</i>

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

2.4.1. Fenotipik ve Biyokimyasal Yöntemlere Dayalı Sınıflandırma

Laktik asit bakteri türlerinin izolasyonu ve sayımı seçici/ayırıcı ortamlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Uygun besiyerlerinden saf kültürler olarak izole edilen bakterilerin daha sonra klasik yöntemlerle Gram reaksiyonu, mikroskopik morfolojisi ve katalaz aktiviteleri belirlenmektedir. Yapılan testler sonucunda sporsuz çubuk veya kok şeklinde, Gram-pozitif ve katalaz-negatif olarak

değerlendirilen izolatlar laktik asit bakterisi olarak ayrılmaktadır (Schillinger ve Lücke, 1987). Bakteri suşlarının cins düzeyinde tanımlanmasında, bakterilerin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilmeleri, karbonhidratları fermente edebilme durumları, oksijene karşı toleransı, besinsel gereksinimleri, antibiyotiklere karşı duyarlılıkları, morfolojisi ve boya maddeleri ile verdiği reaksiyonlar gibi fizyokimyasal ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmaktadır. Tuz, pH, sıcaklık dirençliliği fenotipik testler; katalaz reaksiyonu, oksidaz aktivitesi ve şeker fermentasyonu gibi testler ise biyokimyasal testler içerisinde yer almaktadır. Fenotipik ve biyokimyasal testler çoğu zaman bakterilerin sınıflandırmasında karışıklığa neden olmalarından dolayı bakterilerin alttür ve suş düzeyinde net olarak tanımlanmalarında yeterli görülmemektedir. Bunun yanında antibiyotik dirençliliği, faj içeriği, hücre duvarı kompozisyonlarının tanımlanması, toplam hücre proteinlerinin molekül ağırlıklarının (SDS) PAGE tekniği ile karşılaştırılması, laktat dehidrogenaz gibi (LDH) enzimlerin elektroforetik teknikler ile belirlenmesi, fenotipik testlere dahil olup serolojik tiplendirme gibi yöntemlerden daha kesin sonuçlar vermektelerdir.

Bunun yanı sıra, mikroorganizmaların genel grup profillerine göre hazırlanmış çeşitli sayıda klasik biyokimyasal testten oluşan, hazır API 50 CH, LRA Zym ve API AZM gibi enzimatik kitler, saf kültürlerin karbonhidratları fermente edebilme özelliklerinden faydalanılarak çiğ süt, fermente süt ürünleri ve peynirde bulunan laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Test kitinden alınan sonuçlar, bilgisayar programının veri tabanında yer alan bakteri türleri ile sınırlı olarak tanımlanmaktadır (Coeuret ve ark., 2003).

2.4.2. Moleküler Tanı Metotları

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve fenotipik metotlar hem uzun sürmekte hem de çoğu zaman sınıflandırmada yetersiz kalmaktadır. Sınıflandırmanın esas amacı türlerin alt gruplarını ya da klonlarını tekrar üretilebilir uygun belirteçler (marker) kullanarak tanımlamaktır. Son yıllarda geliştirilen bazı moleküler tekniklerin bakteri türlerinin sınıflandırılmasında kullanılabileceği belirlenmiştir (Giraffa ve Rossetti, 2004). Aynı

türe ait farklı suşların birbirlerinden ayrıştırılması ve tanımlanmasında SDS-PAGE, spesifik problemler ile DNA hibritasyonu, Randomly Amplified Polymorphic-PCR (RAPD-PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve 16S-23S rDNA sekans dizisi analizi gibi modern moleküler tekniklerden yararlanılmaktadır (Giraffa ve ark., 2000). Bu yöntemlerin her biri bakteri izolatlarını cins, tür, alt tür ve suş düzeyinde ve yüksek duyarlılıkta sınıflandırmaya, tanımlamaya ve karakterize edebilmektedir. Her yöntemin uygulama kolaylığı, tekrar edilebilirlik, ekipman gereksinimi ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri açısından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

Bir bakteri suşu eğer aynı koşullar altında gelişimini sürdürürse her zaman aynı tipte proteinler üretmektedir. Tam-hücre (whole-cell) proteinlerinin SDS-PAGE yöntemiyle ayrıştırılması, tanılamada kullanılan protein parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Bu teknik basit ve ucuz olması nedeni ile laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (de Angelis ve ark., 2001; Hebert ve ark., 2000). PCR (Polymerase Chain Reaction), klasik tanımlama yöntemlerinin yanı sıra bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla yaygın olarak başvurulan bir tekniktir. PCR tekniği, bir mikroorganizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile çoğaltılmasını (amplifikasyon) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. RAPD-PCR tekniği laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Baruzzi ve ark., 2002; Berthier ve ark., 2001; Bouton ve ark., 2002). RAPD-PCR tekniğinde genellikle 10 nükleotid uzunluğunda ve rastgele seçilmiş primerler kullanılmaktadır. Tür/alt tür ve suşlar arasındaki genetik farklılıkların ortaya konulabildiği bir yöntem olan RAPD-PCR'da çoğaltılan gen bölgeleri hakkında bir bilgiye sahip olunmasına gerek bulunmamaktadır. AFLP genetik marker teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Fenotipik ve genotipik metodların bakterilerin sınıflandırılmasındaki etkileri Çizelge 2.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.2. Fenotipik ve genotipik metotların bakterilerin sınıflandırılmasındaki etkileri

Metot	Prensip	Düzyey	Sonuç
Fenotipik Metotlar			
Morfolojik analiz	Mikroskopik gözlem	Cins	++
Fizyolojik analiz	Üreme karakteristikleri	Cins	+
Biyokimyasal testler	Fermentasyon özellikleri/ API Kit	Cins-Tür	++
Protein profilleri	Poliakrilamid jel	Tür	+++
Genotipik Metotlar			
Spesifik Primer	PCR	Primere Göre Değişmektedir	+++
Sekans	16S rDNA	Cins-Tür	+++
RFLP	Restriksiyon enzim	Tür-Suş	+++
RAPD-PCR	Rastgele PCR	Tür-Suş	++
AFLP	RFLP+PCR	Tür-Suş	+++
PFGE	Vuruşlu alan jel elektroforezi	Suş	+++
Ribotiplendirme	Oligonükleotid proplar	Tür-Suş	+++
Hibridizasyon	DNA-DNA hibridizasyonu	Cins-Tür	+++

(+: düşük, ++: orta, +++: yüksek)

Pek çok moleküler karakteristik, filogenetik ilişkilerin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. 16S RNA dizilişlerinin analizi, evrim sırasında molekülün farklı kısımları üzerinde de fonksiyonel baskının farklı derecelerini yansıtan yüksek derecede korunmuş bölgelerde bu molekülün bulunduğunu ortaya koymuştur. 3000'den fazla bakteri türünden izole edilen 16S ribozomal RNA'ların sekanslarının karşılaştırılmasından sonra 16S rRNA, filogenetik sınıflandırmanın temelini oluşturan en önemli faktör olarak kabul edilmiştir (Tunail, 2009). 16S rRNA analizleri ile mikroorganizmalar arasında bilinmeyen ilişkiler (akrabalıklar ve evrimsel gelişmeler) ortaya çıkmakta ve bilinen sınıflandırmalar hızlı bir değişimle çok farklı filogenetik ağaçlara dönüşmektedir. Karşılaştırmalı DNA dizi analizi mikrobiyel tanımlamada kullanılan en iyi genotipik yöntemdir. En yaygın olan yaklaşım 16S rRNA genin farklı boyuttaki baz çiftlerinin (500-900 baz) bir bölümünün veya hepsinin PCR ile çoğaltılması ve DNA dizi analizinin yapılmasıdır.

Daha sonra elde edilen veriler onaylanmış mikrobiyel dizileri içeren veri tabanlarındaki diziler ile karşılaştırılmaktadır.

2.5. Geleneksel Peynirlerdeki Doğal Laktik Flora ve Önemi

Farklı türdeki çiğ sütlerden geleneksel olarak üretilen peynirlerin kompleks biyokimyasal yapıları ve değişken duyuşal özellikleri peynirlerin mikrobiyel çeşitliklerinden kaynaklanmaktadır. Mikrobiyel floranın peynir kalitesi üzerinde kesin etkilerini belirleyebilmek için mikrobiyel ekosistemin tür ve suş düzeyinde tanımlanması ve tanımlanan suşların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir (Callon ve ark., 2004).

Ülkemizde üretilen yöresel peynirlerin çeşitliliği özellikle kendine özgü tatlara sahip olmaları ve köyden kente göçen aileler tarafından talep görmesi nedeniyle, bu tip peynirlerin orjinlerine uygun şekilde, endüstriyel boyutta üretimlerinin ekonomik açıdan önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Son yıllarda birçok ülkede ürün çeşitliliğini artırmak, bölge ekonomisine katkıda bulunmak ve ürün güvenliğini geliştirmek için birçok geleneksel ürünün üretim yönteminin orta ve küçük ölçekli sanayiye aktarılması konusunda çalışmalar yapılmaktadır (Benkerroum ve Tamime, 2004). Özellikle son yıllarda, Avrupa Birliği ülkelerinde, geleneksel ürünleri korumak, geleneksel ürünlerin buldukları coğrafyada üretilmesini sağlamak amacıyla “orijine uygunluk” sistemleri geliştirilmiştir. Örneğin; İspanya’da “Cabrales”, Portekiz’de “Picante”, İtalya’da “Pecorino del Poro”, “Canestrato Pugliese”, Fransa’da “Comte” peynirleri bu sistem dahilinde üretimleri kontrol altına alınarak tescil edilmiştir. Yurt içi ve yurt dışı pazarlarda rekabet şansı yakalayabilmek ve güvenilir ürün çeşitliliğini artırmak amacıyla, bu ürünlerin özelliklerinin ortaya çıkarılması ve üretim aşamalarının standardize edilerek süt teknolojisine kazandırılması ve endüstriyel olarak üretilen peynir çeşitliliğinin artırılması gerekmektedir. Geleneksel peynirlerden izole edilerek tanımlanan suşların spesifik kültürler olarak peynir üretiminde tek başlarına ya da diğer klasik peynir kültürleri ile birlikte kullanılmasıyla var olan peynir

üretiminde orta ve küçük işletmelerde orjinine uygun olarak üretimlerinin artırılabilmesi düşünülmektedir.

Birçok Akdeniz ülkesinde pıhtısı haşlanan ya da haşlanmayan yarı sert/sert peynirler farklı isimler altında çığ sütlerden geleneksel olarak üretilmektedir. Bu tip peynirler PDO (Protected Designation of Origin) peynirleri olarak da adlandırılmaktadır. PDO peynirlerde özgün tat ve aroma ile tekstür gelişimi çığ sütün doğal laktik mikroflorası aracılığı ile şekillenmektedir. Ayrıca, süt hayvanının ırkı, beslenme rejimi, doğal flora ve fauna da bu süreçte etkili rol oynamaktadır (Albenzio ve ark., 2001, Poznanski ve ark., 2004). Tavarria ve Malcata (2000), farklı bölgelerde üretilen “Serra da Estrela” (PDO) peynirlerinde laktik asit bakterilerinin dağılımının istatistiksel olarak farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada Corroler ve ark. (1998) “Camembert” (PDO) peynirinden izole edilen *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşunun tipik özelliği bölgesel orijinden çok sürü orijini ile ilişkilendirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Berthier ve ark. (2001), farklı çiftliklerde üretilen “Comte” (PDO) peynirlerinden izole edilen suşlar arasında büyük çeşitlilik bulunduğunu belirlemiştir. Duthoit ve ark. (2003)’da “Salers” (PDO) peynirlerindeki mikrobiyel çeşitliliğin, peynir üreticilerinin farklı üretim tekniklerinden kaynaklandığını belirlemişlerdir.

Son yıllarda herhangi bir starter kültür ilave edilmeden çığ sütlerden geleneksel olarak üretilen peynirlerden izole edilen izolatlar (wild-type) üzerine fenotipik ve genotipik araştırmalar hızla artmaktadır (Cogan, 1995; Baruzzi ve ark., 2000; Suzzi ve ark., 2000; Coppola ve ark., 2001; Fortina ve ark., 2003). Birçok geleneksel peynir çeşidine farklı üretim ve depolama teknikleri uygulanması, farklı hammadde (inek, koyun, keçi, manda ve/veya bunların karışımı) kullanılması ve özellikle de coğrafi orijine özgü mikrofloranın etkisiyle, peynirlerde laktik asit bakterilerinin dağılımının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Geleneksel yöntemler ile inek, keçi veya manda sütleri ile bu sütlerin karışımı kullanılarak üretilen İtalyan tipi peynirlerden izole edilen 124 adet *Enterococcus* suşunun RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda 82 suşun *E. faecalis*, 27 suşun *E. faecium*, 9 suşun *E. durans*, 4 suşun *E. gallinarum* ve 2 suşun da *E. hirae* olduğu belirlenmiştir (Andrighetto ve ark., 2001). Benzer sonuçlar, Kuzeybatı İtalya’da üretilen geleneksel

peynirlerde hakim florayı RAPD-PCR yöntemiyle tanımlayan Morandi ve ark. (2006) tarafından da bulunmuştur (68 *Enterococcus* suşundan 35'i *E. faecalis*, 27'si *E. faecium* 6'sı ise *E. durans*). Bir başka araştırmada Kuzey İtalya'da çiğ inek sütlerinden izole edilen laktik asit bakterilerini 16S rRNA sekans dizi analizi ile sınıflandırmaları sonucunda izolatlardan %94'ünün *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. ve *Streptococcus* spp., olduğu, bu türler içerisinde baskın olan alt türlerin ise *E. faecalis*, *E. durans*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *L. garviaeae*, *Str. thermophilus* ve *Str. macedonicus* olduğu belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada; Ouadghiri ve ark. (2005), Fas'ta geleneksel olarak üretilen Moroccan peynirinde hakim olan laktik asit bakterilerinin tanımlanması amacıyla toplam 164 izolatı, hücre protein-profil analizi ve rep-PCR yöntemi ile sınıflandırmış ve bunun sonucunda izolatların %34'ünün *Lactobacillus*, %27'sinin *Lactococcus*, %27'sinin *Leuconostoc* ve %10'unun *Enterococcus* olduğunu tespit etmişlerdir. Geleneksel olarak çiğ süttten üretilen bazı peynir çeşitlerinde hakim olan laktik asit bakterilerinin dağılımı Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çiğ süttten üretilen peynirlerde olgunlaşma, doğal laktik flora ve doğal süt enzimleri tarafından yürütülen biyokimyasal reaksiyonlar sonucu meydana gelen kompleks bir süreçtir. Peynirde yer alan laktik asit bakterilerinin kompozisyonu olgunlaşma süresince dalgalanmalar göstermektedir. Olgunlaşma mekanizmasında üretim metodu ve coğrafi orijin de belirleyici olmaktadır (Gobbetti ve ark., 2002). Olgunlaşma periyodu boyunca laktik asit bakterilerinin dağılımı üzerine yapılan bir araştırmada geleneksel bir Sırp peyniri olan ve çiğ inek sütünden üretilen yarı sert "Zlata" peynirinde (PDO) olgunlaşmanın başlangıcında *Lactococcus* spp.'lerin baskın olduğu, 30 günlük olgunlaşma periyodunda ise mezofilik *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sayısında artış meydana geldiği belirlenmiştir. 45 ve 60 günlük depolama periyodunda *Enterococcus* spp.'lerin sayısının artmaya başladığı ve bu durumun enterekokların düşük pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük sıcaklığa karşı dirençli olmalarından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Tüketiciler tarafından duyusal olarak değerlendirilen olgun peynirlerin oldukça acı bir tada sahip olduğu ve bu durumun olgunlaşma süreci boyunca *Enterococcus* spp.'lerin ortamda baskın flora olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Velijovic ve ark., 2007).

Çizelge 2.3. Farklı türde sütlerden geleneksel olarak üretilen peynirlerde laktik asit bakterilerinin dağılımı.

Peynir Çeşidi	Özellikleri/Süt kaynağı/Orijin/	Hakim flora	Tanı Yöntemi	Kaynak
Zlatar	Yarı-sert İnek-koyun-keçi sütü Sırbistan	% 53.9 <i>Lactobacillus (L. paracasei subsp. paracasei)</i> % 35.9 <i>Enterococcus (E. faecium, E. faecalis)</i> % 9.3 <i>Lactococcus (Lc. lactis subsp lactis)</i>	16S rDNA	Terzic-Vidojevic ve ark. (2007)
Pecorino	Sert-olgunlaşmış Koyun sütü İtalya	% 41.0 <i>Enterococcus (E. faecium, E. faecalis)</i> % 18.7 <i>Lactococcus (Lc. lactis)</i> % 8.9 <i>Lactobacillus (L. plantarum)</i>	16S r RNA- RAPD	Aquilanti ve ark. (2007)
Fiore Sardo	Sert-olgunlaşmış Koyun sütü (İtalya-Sardunya)	% 42.3 <i>Lactobacillus (L. plantarum)</i> % 30.0 <i>Lactococcus (Lc. lactis subsp. lactis)</i> % 24.1 <i>Enterococcus (E. faecium)</i>	API 50 CHB- API ID 32C	Pisano ve ark. (2006)
Genestoso	Yarı-sert Keçi sütü (İspanya)	% 34.6 <i>Lactobacillus (L. paracasei)</i> % 31.6 <i>Lactococcus (Lc. lactis subsp. lactis)</i> % 18.9 <i>Enterococcus (E. faecalis)</i> % 14.6 <i>Leuconostoc (Leu. pseudomesenteroides)</i>	API CHL 50- 16S rDNA	Gonzalez ve ark. (2007)
Caciocavallo	Yumuşak; Koyun-inek sütü; İtalya-Balkanlar	% 59.9 <i>Lactobacillus (L. paracasei)</i> % 20.0 <i>Lactococcus (Lc. lactis subsp. lactis)</i> % 7.4 <i>Enterococcus (E. faecalis)</i>	SDS-PAGE	Piraino ve ark. (2005)
		% 65.0 <i>Lactobacillus (L. paracasei)</i>	Biyokimyasal testler	Coppola ve ark. (2003)
Raschera	Yarı-yumuşak İnek sütü İtalya	% 75.0 <i>Lactococcus (Lc. lactis subsp. lactis,, Lc. garvieae)</i>	16S rRNA dizi analizi	Dolci ve ark. (2008)
Pecorino Siciliano	Sert Koyun sütü (İtalya-Sicilya)	% 47.2 <i>Enterococcus (E. faecalis)</i> % 32.4 <i>Lactobacillus (L. paracasei)</i> % 12.6 <i>Lactococcus (Lc. lactis subsp. lactis)</i>	PCR - PFGE	Vernile ve ark. (2008)
Domiatı	Yumuşak İnek-Manda sütü Mısır	<i>Leu. mesenteroides</i> <i>Lc. garvieae</i> <i>Lc. lactis spp. lactis</i>	16S r DNA	El-Baradei ve ark. (2007)

Cabrales	Sert-olgunlaşmış İnek-koyun-keçi İspanya	% 34.6 <i>Lactococcus</i> (<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) % 25.5 <i>Leuconostoc</i> (<i>Leu. mesenteroides</i>) % 18.2 <i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i>) % 8.2 <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecium</i>)	16S r DNA	Florez ve ark. (2006)
Pecorino del Poro	Yarı-sert/olgunlaşmış Koyun sütü İtalya	% 35.2 <i>Enterococcus</i> (<i>E. durans</i>) % 25.4 <i>Lactobacillus</i> (<i>L. paracasei</i>) % 19.6 <i>Leuconostoc</i>	API CHL 50-	Caridi (2003)
Moroccan	Yumuşak Keçi sütü Fas	% 34.0 <i>Lactobacillus</i> spp. % 27.0 <i>Lactococcus</i> spp. % 27.0 <i>Leuconostoc</i> spp. % 10.0 <i>Enterococcus</i> spp.	SDS-PAGE ve rep-PCR	Ouadghiri ve ark. (2005)
Fresco	Yumuşak-kremamsı-taze İnek sütü Meksika	<i>Lactococcus</i> (<i>Lc.lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Lc. garvieae</i>) <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecium</i>) <i>Lactobacillus</i> (<i>L. casei</i>)	Enzimatik Kit BBL CRYSTAL	Torres-Llanez ve ark. (2006)
Canestrato	Sert/yarı-sert-olgunlaşmış Koyun sütü İspanya	% 81.1 <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>) % 12.0 <i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i>) % 6.28 <i>Lactococcus</i> (<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>),	RFLP- 16S rRNA	Aquilanti ve ark. (2006)
Beyaz peynir	Yarı-yumuşak İnek-koyun-keçi sütü Türkiye	% 62.33 <i>Enterococcus</i> (<i>E. hirae</i> , <i>E. faecium</i>) % 22.07 <i>Lactobacillus</i> (<i>L. paracasei</i>) % 15.5 <i>Lactococcus</i> (<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i>)	SDS-PAGE	Durlu-Özkaya ve ark. (2001)
Valdeon	Kremamsı Keçi-inek sütü İspanya	% 42.2 <i>Lactococcus</i> (<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) % 40.0 <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecalis</i>) % 10.8 <i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i>) % 8.9 <i>Leuconostoc</i> (<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>)	API CHL 50- API 20 STREP	Lopez-Diaz ve ark., (2000)
Toma piemontese	Yarı-sert/olgunlaşmış İnek sütü İtalya	% 67.0 <i>Lactococcus</i> (<i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. lactis</i>) % 16.0 <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecium</i>)	16S r DNA	Fortina ve ark. (2003)
Ibores	Yarı-sert Koyun-keçi sütü İspanya	% 47.5 <i>Lactococcus</i> (<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i>) % 22.1 <i>Leuconostoc</i> (<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>) % 21.5 <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecium</i>)	API CHL 50- API 20 STREP	Mas ve ark. (2002)

		% 8.7 <i>Lactobacillus (L. casei)</i>		
Penamellera	Yarı-sert İnek-koyun-keçi sütü İspanya	% 74.7 <i>Lactococcus (Lc. lactis spp. lactis)</i> % 11.0 <i>Enterococcus spp.</i>	Biyokimyasal testler	Estepar ve ark. (1999)
El-Klila	Sert-olgunlaşmış İnek-koyun sütü Cezayir	% 89.9 <i>Enterococcus spp. (E. faecalis)</i>	Biyokimyasal testler	Boubekri ve Ohta (1996)
Şavak tulum peyniri	Yarı-sert/olgunlaşmış Koyun sütü Türkiye	% 34.0 <i>Enterococcus (E. faecium)</i> % 30.0 <i>Lactobacillus (L. paracasei)</i>	Biyokimyasal testler	Öksüztepe ve ark. (2005)
Scamorza Altamura	Yarı-sert İnek sütü İtalya	<i>Str. thermophilus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i>	16S r DNA -RAPD	Baruzzi ve ark. (2002)
Cheddar	Yarı-sert/olgunlaşmış İnek sütü İngiltere	% 64.0 <i>Lactobacillus (L. Paracasei)</i> % 32.0 <i>Str. thermophilus</i> % 4.0 <i>Lactococcus</i>	TAP-PCR	Swearingen ve ark. (2001)
Qula	Yarı-sert Yak sütü Tibet	% 78.0 <i>Leuconostoc (Leu. Mesenteroides)</i> % 15.0 <i>Lactobacillus (L. Plantarum)</i> % 7.0 <i>Enterococcus (E. faecium)</i>	16S r RNA- DNA-DNA- hibridizasyon	Duan ve ark. (2008)
Tulum	Koyun Yarı-sert	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus</i>	MIS	Çakmakçı ve ark.,(2008)

Bir başka araştırmada Pisano ve ark. (2006), geleneksel olarak koyun sütlerinden üretilen “Fiore Sardo (PDO)” peynirlerinde laktik asit bakterilerinin dağılımını incelemiştir. 30 gün süre ile olgunlaştırılmış peynir örneklerinde *Lactococcus* spp.’lerin baskın olduğu, bir aydan daha olgun peynirlerde ise laktik floranın farklılık gösterdiğini ve *Lactobacillus* ve *Enterococcus* türü bakterilerin baskın hale geldiğini belirlemiştir. Benzer şekilde; Vernile ve ark. (2008), taze “Peccorino Siciliano” peynir örneklerinde *Lactococcus* ve *Enterococcus* türü bakterileri baskın türler olarak belirlemiştir. Depolama boyunca *Lactococcus* cinsi bakterilerinin oranında belirgin bir azalma olduğunu, özellikle de 90. günde *Lactococcus* spp. oranının %1’in altına indiğini, buna karşın *Lactobacillus* cinsi bakterilerin (1. gün % 8.1- 90. gün % 32.4) oranında belirgin bir artış olduğunu saptamışlardır.

Süt endüstrisinde kullanılan starter kültür çeşitliliğinin sınırlı olduğu bilinmektedir. Özellikle peynir kalitesini artırmak için peynir üreticilerinin farklı (yeni) tip laktik suşların üretilmesine yönelik talepleri gün geçtikçe artmaktadır. Bu durumdan hareket ile geleneksel peynirlerden izole edilen ve tanımlanması yapılan suşların teknolojik özellikleri dikkate alınarak starter kültür olarak kullanılabilirliği üzerine birçok araştırma yapılmaktadır. Bu tip suşların asitlik üretim kapasiteleri, proteolitik aktiviteleri, enzimatik aktiviteleri, antibiyotik dirençliliği ve bakteriyosin üretimi gibi teknolojik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Yapılan bir araştırmada; Morea ve ark. (1999), Mozzarella peynirlerinden izole ettikleri suşlar içerisinde en yüksek asit üretimini *Lc. lactis* subsp. *lactis* ile *Str. thermophilus*’un değişik suşlarının gösterdiğini belirlemiştir. Bir diğer araştırmada Coppola ve ark. (2003), geleneksel olarak çiğ süttten üretilen Caciocavallo peynirlerinden izole ettikleri suşların % 80’inin süt pH’sını 3.5 ile 4.5 arasına kadar düşürdüğünü belirlemiştir. Bir başka çalışmada; Gonzales ve ark. (2007) “Genestoso” peynirlerinden izole ettikleri ve sınıflandırdıkları *Enterococcus* cinsi bakterilerin %62’sinin, *Lactococcus* cinsi bakterilerin %10.4’ünün, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin %2.1’inin, *Leuconostoc* cinsi bakteriler % 5.1’sinin indikatör suşlara karşı antimikrobiyel etki gösterdiğini saptamışlardır. Bir diğer araştırmada; Perez ve ark. (2003), “Tenerife” peynirlerinden izole edilen toplam 130 laktik asit bakterisini (*Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Leuconostoc*) teknolojik olarak karakterize etmeleri

sonucunda *Lactobacillus* cinsi bakterilerin %98.3'ünün sitratı tamamen metabolize ettiğini; *Lactococcus* cinsi bakterilerinin, özellikle de *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in yüksek oranda asit üretme yeteneği gösterdiğini; *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türü suşların zayıf asit üreticileri olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte; *Lactococcus* cinsi bakterilerin yüksek oranda proteolitik aktiviteye sahip olduklarını, *Lactobacillus* cinsi bakterilerde ise aminopeptidaz aktivitesinin yüksek olduğunu saptamışlardır.

2.6. Geleneksel Urfa Peyniri

Urfa peyniri üretiminde genel olarak koyun sütü kullanılmakla birlikte, gerektiği durumlarda koyun-inek sütü ya da koyun-keçi sütü karışımlarından da yararlanılmaktadır. Üretimde, süt sağım sıcaklığında ticari peynir mayası ile pıhtılaştırılmakta ve pıhtı küçük parçalara parçalandıktan sonra yöresel olarak parzın adı verilen üçgen süzme bezlerine aktararak süzülmemektedir. Yeterli serum ayrılması sağlandıktan sonra Ham peynirler kaba tuz aracılığı ile 2-3 gün kuru tuzlama işlemine tabi tutulmakta ve ardından peynir blokları konsantre salamura içerisinde depolanmaktadır. Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5'de geleneksel Urfa peynirinin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine yapılan çeşitli araştırmaların sonuçları verilmiştir.

Çizelge 2.4. Geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinde TAMB sayıları (log kob/g)

	Depolama Süresi	Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) (log kob/g)
Geleneksel Urfa Peyniri (Koyun sütü)¹	1	9.54
	15	9.07
	30	8.88
	60	8.36
	90	8.04
Geleneksel Urfa Peyniri (İnek sütü)²	1	9.78
	15	9.32
	30	8.83
	60	8.11
	90	8.11
Geleneksel Urfa Peyniri³	Bilinmiyor	6.36-7.34

Kaynaklar: ¹Özer ve ark., (2002a), ²Özer ve ark., (2002b), ³(Atasoy ve ark.2003)

Çizelge 2.5. Farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinin kimyasal bileşimlerinde meydana gelen değişimler.

	D.S.	pH	Toplam Asitlik (% L.A.)	Toplam Kurumadde	Kurumadede Tuz	Kurumadede Yağ	Toplam Azot	WSN	Olgunlaşma İndeksi
Geleneksel Urfa Peyniri (Koyun sütü)¹	1	5.35	0.3510	45.60	13.6	41.66	3.14	0.30	9.55
	15	5.11	0.3915	44.70	18.0	41.38	2.79	0.38	13.62
	30	5.00	0.405	43.36	19.0	42.10	2.52	0.41	16.26
	60	5.05	0.45	43.92	20.4	41.84	2.39	0.46	19.24
	90	5.00	0.4972	43.80	21.1	41.39	2.36	0.52	22.03
Geleneksel Urfa Peyniri (İnek sütü)¹	1	5.30	0.3375	43.52	17.8	39.06	2.56	0.26	10.15
	15	5.20	0.36	43.20	19.9	39.35	2.49	0.31	12.44
	30	5.15	0.441	42.25	20.6	40.23	2.27	0.34	14.97
	60	5.00	0.501	42.13	21.7	39.16	2.23	0.40	17.93
	90	5.05	0.531	42.70	23.0	38.64	2.18	0.47	21.55
Pastörize Urfa Peyniri (Koyun sütü)²	1	5.03	1.077	51.55	7.27	49.72	3.13	0.28	8.93
	15	4.95	0.842	49.68	9.75	46.72	3.05	0.34	11.42
	30	5.08	0.950	49.57	10.47	48.08	2.86	0.37	13.18
	60	5.14	0.967	48.01	11.26	47.21	2.55	0.47	18.71
	90	5.14	0.855	46.51	11.81	47.30	2.38	0.53	22.31
Pastörize Urfa Peyniri (inek sütü)³	1	5.41	0.7398	41.52	12.16	37.33	2.67	0.30	11.23
	30	5.15	0.820	40.73	16.86	38.05	2.56	0.32	12.5
	60	4.90	0.8775	39.40	17.18	39.21	2.35	0.36	15.31
	90	4.83	0.9643	38.90	18.58	39.84	2.27	0.39	17.18
Geleneksel Urfa Peyniri (inek sütü)⁴	1	5.10	0.396	43.52	17.80	42.51	2.66	0.26	9.81
	15	5.00	0.45	43.20	21.85	41.67	2.39	0.32	13.76
	30	4.92	0.527	43.25	22.60	42.77	2.27	0.37	16.43
	60	4.87	0.6075	43.13	23.21	42.31	2.23	0.41	18.74
	90	4.94	0.6975	43.70	24.97	41.76	2.20	0.47	21.54
Geleneksel UrfaPeyniri⁵		3.98-6.25	0.2198-1.2798	36.47-64.34	6.94-31.08	35-96-72.40	1.42-4.51	0.13-0.55	2.58-26.31

Kaynaklar: ¹ Özer ve ark. (2002a), ³ Özer ve ark. (2002b), ² Atasoy (2004), ⁴ Özer ve ark. (2000), ⁵ Atasoy ve Akın (2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tam popülasyonu temsil edebilmesi için Şanlıurfa ilinin farklı coğrafi bölgelerini temsilen Viranşehir, Siverek, Birecik ilçeleri ile merkeze bağlı Kıyas beldesinde 5'er adet olmak üzere çiğ koyun sütünden üretilen toplam 20 adet teleme örneği steril kavanozlar içerisine alınıp laboratuara getirilmiştir. Teleme örnekleri Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Pilot Süt İşleme Tesisinde yöresel olarak parzın adı verilen üçgen süzme bezleri içerisinde oda sıcaklığında 18 saat askıda tutularak serum ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra peynir blokları %14 NaCl içeren salamura içerisinde 3 ay süre ile olgunlaştırılmış ve sonra mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Aseptik koşullarda rendelenen 20 g peynir örneği ile 180 mL %2 (w/v)'lik sodyum sitrat çözeltisi Stomacher Lab-Blender (Colworth Stomacher 400C Seward Laboratory, İngiltere) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize peynir örneğinden dilüsyon tüpleri içerisinde seyreltme yapıldıktan sonra uygun besiyerleri üzerine ekim yapılmıştır.

Lactobacillus spp. izolasyonu için MRS (Merck, Darmstadt, Almanya) agar üzerine ekimler yapılarak anerobik koşullar altında 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. *Lactococcus* spp. için M17 agar (Merck, Darmstadt, Almanya) üzerine ekim yapılarak 30 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. *Enterococcus* spp. izolasyonunda Kanamycin Esculin Agar (Merck, Darmstadt, Almanya) üzerine ekim yapılarak ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnek için 9 koloni rastgele

seçilerek çizme (streaking) yolu ile saflaştırılmıştır. İzolatlar – 80°C’de 3:2 oranında gliserol ve MRS ve M17 broth içeren karışım içerisinde saklanmıştır.

3.2.2 Laktik Asit Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu

3.2.2.1. Morfolojik, Fenotipik ve Biyokimyasal Yöntemlerle İdentifikasyon

Gram reaksiyonu: Norris ve ark. (1981) tarafından oluşturulan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Uygun koşullarda 18 saat süre ile geliştirilen bakteri süspansiyonları, Gram boyamaya tabi tutulmuş ve menekşe moru olarak gözlenen koloniler Gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Morfolojik İnceleme: Gram boyaması yapılan suşlar ışık mikroskopunda morfolojik (kok, basil) olarak sınıflandırılmıştır (Sharp, 1979).

Katalaz reaksiyonu: Sıvı veya katı besiyerlerinde geliştirilen bakteri kültürüne H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksit ayrışmasını, dolayısıyla katalaz enziminin varlığını göstermektedir. Petri kutusundaki agarlı kültür yüzeyine 1 ml %3'lük H₂O₂ ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı incelenmiştir. Gaz çıkışı gözlenmeyen koloniler katalaz-negatif olarak değerlendirilmiştir (Whittenbury, 1964).

Glukozdan CO₂ üretme: Glukoz ilave edilmiş M17 broth ve MRS broth içeren tüplerinde CO₂ oluşturabilme durumları incelenmiştir (Müller, 1990). Sıvı besiyerleri içeren Durham tüpleri sterilize edildikten sonra aktif kültürlerden inokülasyon yapılarak tüpler inkübasyona bırakılmıştır (*Lactococcus* spp. için 30 °C/48 saat, *Enterococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp. için 37 °C/48 saat). İnkübasyon sonunda gaz oluşumu gözlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fortina ve ark., 2003).

Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilme: Aktif kültürlerden %2, % 4 ve % 6.5 tuz içeren sıvı besiyerlerine inokülasyon yapılmış ve inkübasyon sonunda bulanık görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fortina ve ark., 2003).

Farklı sıcaklıklarda gelişebilme: Bir gecede geliştirilen kültürlerden 50 µl alıp 5 ml sıvı besiyerine inoküle edilerek inkübasyon (Lactococcus spp. ve enterokok grubu bakteriler için 10 °C ve 45 °C’de 48-72 saat, laktobasil grubu bakteriler için 15 °C ve 45 °C’de 48-72 saat) sonunda oluşan bulanıklık dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bulanıklık olan tüplerde gelişme olduğu kabul edilmiştir (Fortina ve ark., 2003).

3.2.3. Suşların 16S rDNA Sekans Analizi İle Moleküler Olarak Sınıflandırılması

3.2.3.1.Genomik DNA İzolasyonu

Sıvı besiyerlerinden 1'er mL alınarak her bir örnek için 3 ayrı eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra tüpler 8000 rpm’de 24°C/15 dakika süre ile santrifüj (Hettich, Universal 32R, Almanya) edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz uzaklaştırılarak elde edilen pellet üzerine 0.5 mL steril saf su ilave edildikten sonra pelletler birbirine aktarılarak bir araya getirilmiş ve tekrar karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin ardından eppendorf tüpleri 8000 rpm’de 24°C/15 dakika süre ile tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletler üzerine 200 µl TE (Tris-EDTA) tampon ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bu işlemden sonra karışım içerisine 400 µl lisis solüsyonu (Fermentas Life Sciences, Finlandiya) ilave edilerek tüpler 65 °C’de 20 dakika süre ile su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örnekler içerisine 600 µL kloroform ilave edildikten sonra örnekler 4 °C’de 10000 rpm’de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz alınarak farklı eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 800 µL presipitasyon solüsyonu [(9 birim su /1 birim presipitasyon solüsyonu) Fermentas Life Science, Finlandiya] ilave edilerek 4 °C 10000 rpm’de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılarak pelletler üzerine 100 µL NaCl (Fermentas Life Science, Finlandiya) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler üzerine -20 °C’de bekletilmiş 300 µL etanol ilave edilerek -24 °C de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler 4 °C 10000 rpm’de 5 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra sıvı kısım boşaltılarak pelletler ortam sıcaklığında kurutulmuşlardır. Kurutulan örnekler içerisine 10 µL saf

su aktarılarak iyice karıştırıldıktan sonra elde edilen genom DNA PCR reaksiyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.2. PCR

PCR örnekleri soğuk buz tankı içerisinde hazırlanmıştır. 2 µL DNA örneği içerisine 48 µl PCR karışımı ilave edilmiştir.

PCR Karışımı

Su	34.5µl
10× Taq	5 µl
10 mm dNTP	2 µl
Primer I	1 µl
Primer II	1 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
MgCl ₂	4 µl

3.2.3.3. 16S rDNA PCR Parametreleri

İzole edilen suşların genetik tanısında, genel bakteriyel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesin homolojisinden yararlanılmıştır. Çalışmalarda ileri primer olarak 5'-AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG-3' ve geri primer olarak ise 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' kullanılmıştır (Beasley ve Saris, 2004). PCR reaksiyon parametreleri 94 °C'de 1 dk, 54 °C'de 15 sn, 72 °C'de 1 dk ve 30 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonun sonuna, son zincir uzaması aşaması için 72 °C'de 10 dakikalık bir süre eklenmiştir (Blaiotta ve ark., 2002). PCR ürünlerinin DNA dizi analizi REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. (ODTÜ Teknokent, Ankara) firması tarafından yapılmıştır.

3.2.3.4. PCR Örneklerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

6× yükleme (loading) solüsyonundan 3 µL parafilm üzerine aktarılıp üzerine PCR reaksiyonu sonucu elde edilen DNA'dan 10 µL ilave edilerek karıştırılmıştır. Toplam 13 µL karışım % 1'lik agaroz jel [10 g agaroz 1000 ml tris-asetat ve su karışımı (20 mL tris-asetat -980 ml su) içerisinde hazırlanır] jel kuyucuklarına yüklenmiştir. 5 µl, 1kb DNA belirteçten (marker) (Fermentas Life Sciences, Finlandiya) kuyucuğa yükleme yapılmıştır. Örnekler yüklendikten sonra 100 V akımda yürütme işlemini gerçekleştirilmiştir. Daha sonra agaroz jeli flouresan bir boya (Ethidium bromid) içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Boya çözeltisinden çıkarılan örnekler UV jel görüntüleme sisteminde (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, KODAK, A.B.D.) görüntülenmiştir.

Agaroz Jel Hazırlanması:

Tris Asetat (1x1): 20 mL tris asetat 980 ml su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

%1 Agaroz Jel: 1.5 gr agaroz 150 mL Tris-asetat içerisinde mikro dalga fırın yardımı ile eritilmiştir.

3.2.4. İzolatların Teknolojik Karakterizasyonu

3.2.4.1. İzolatların Bakteriyosin Üretebilme Durumları

Bakteriyosin üretim özelliğinin tanısında, van Belkum ve ark. (1989) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Test edilecek olan *Lactococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. suşları M17 sıvı besiyerinde 30 °C'de 24 saat geliştirildikten sonra GM17 agar ortamlarına aktarılmış ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda gelişen koloniler steril edilmiş kürdan aracılığı ile M17 agar ortamına nokta ekim yapılmış ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Suşların antibakteriyel aktivitesi *Micrococcus luteus* indikatör suşu kullanılarak tespit edilmiştir. M17 sıvı besiyerinde 30 °C'de 18 saat geliştirilen indikatör bakteri

% 0.7 oranında agar içeren 5 ml yumuşak M17 agar ortamına inoküle edilerek, nokta ekim yapılan GM17 agar ortamı üzerine ikinci tabaka halinde dökülmüş ve homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra petri plakaları indikatör bakterilerin gelişimi için 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda *Lactococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. suşların indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonları oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir (van Belkum ve ark., 1989).

İndikatör bakteriye karşı oluşan zonların asitlik artışından mı yoksa bakteriyosin etkisinden mi kaynakladığını belirlemek için 30 °C'de geliştirilen kültürler 6000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve kültür üst sıvıları iki kısma ayrılarak bir kısım direkt, diğer kısım ise pH'sı nötrlenerek (pH 7.00) 0.45 µm gözenek (por) çaplı membran filtrelerden (Sartorius AG, Almanya) geçirilip sterilize edilmiştir. Kuyu difüzyon yöntemi ile pH'sı nötrlenmiş kültürler ile direkt kültürlerin zon oluşturabilme durumlarına göre karşılaştırılmıştır.

3.2.4.2. İzolatların Asidifikasyon Kapasitesi

Suşların asit üretim aktivitelerinin belirlenmesinde pH ölçümü ve titrimetrik metotla % laktik asit ölçümlerinden yararlanılmıştır (Sarantinopoulos ve ark., 2001). Bu kapsamda, steril tüpler içerisine konulan 10 mL UHT yağsız süte 18 saatlik aktif kültürlerden 0.1 mL (v/v) ilave edildikten sonra 30 °C (*Lactococcus* spp.) ve 37 °C'de (*Enterococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp.) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 3, 6, 9 ve 24. saatlerinde tüplerden 2'şer mL örnek aseptik koşullarda alınarak aşağıdaki analizlere tabi tutulmuşlardır.

a. pH ölçümü: pH ölçümlerinde birleşik elektrodlu dijital pH metreden (Orion model 250 A, Orion Research Inc., Boston, A.B.D.) yararlanılmıştır.

b. Laktik Asit Üretimi: Bu yöntemde, 2 mL örnek alınarak üzerine 1-2 damla fenol fitalein indikatörü ilave edildikten sonra 0.1 N NaOH ile hafif pembe renge kadar titre edilmiştir. Titrasyonda harcanan 0.1 N NaOH miktarına göre gerekli hesaplamalar yapılarak suşların % laktik asit

değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\% \text{ L.A} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times F_{\text{NaOH}} \times 90 \times 10^{-3} \times 100}{m}$$

V: Harcanan NaOH miktarı (ml)

m: Süt miktarı (ml)

F: 0.1N NaOH çözeltisinin faktörü

N: NaOH Normalitesi

3.2.5. Peynir Üretimi

3.2.5.1. Materyal

Çiğ Süt

Urfa peyniri yapımında Genç Süt İşletmesi'nden (Genç Süt A.Ş., Viranşehir, Şanlıurfa) sağlanan taze çiğ koyun sütü kullanılmıştır.

Kalsiyum Klorür (CaCl₂)

Isıl işlem sonrası bozulan iyon dengesini yeniden kurmak amacıyla SIGMA ALDRICH Co. D (82039 Deisenhofen, Almanya) firmasından sağlanan kalsiyum klorür çözeltisinden yararlanılmıştır. Kalsiyum klorürün % 40'lık çözeltisi hazırlanmış ve süte % 0.02 oranında katılmıştır.

Starter Kültür

Kültür seçiminde çalışma kapsamında Urfa peynirlerinden izole edilen toplam 143 suş içerisinde yapılan fenotipik ve genotipik değerlendirmeler sonucunda en yaygın bulunduğu tespit edilen 3 suş (*Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ve *Lactococcus garvieae*) % 1 oranında ilave edilmiştir. Karışım kültürünün bakteri oranları şu şekildedir:

<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> IMAU10059	%0.60
<i>Lactococcus garvieae</i> IMAU60022	%0.30
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i> IMAU40012	%0.10

Karışım kültürünün bakteri oranları tespit edilirken popülasyon içerisindeki dağılımları dikkate alınmıştır.

Peynir mayası

Urfa peyniri üretiminde Mayasan peynir mayaları (Mayasan A.Ş., İstanbul) tarafından sağlanan 1/16 000 kuvvetindeki ticari şirden mayasından yararlanılmıştır. Ancak üretim öncesi maya kuvveti yeniden belirlenmiş ve bu amaçla şu yöntem kullanılmıştır.

Tuz

Salamura yapımında ticari olarak satılan kaya tuzu kullanılmıştır.

3.2.6. Yöntem

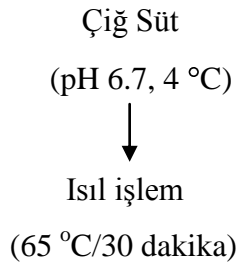
3.2.6.1. Kültürlerin Aktifleştirilmesi

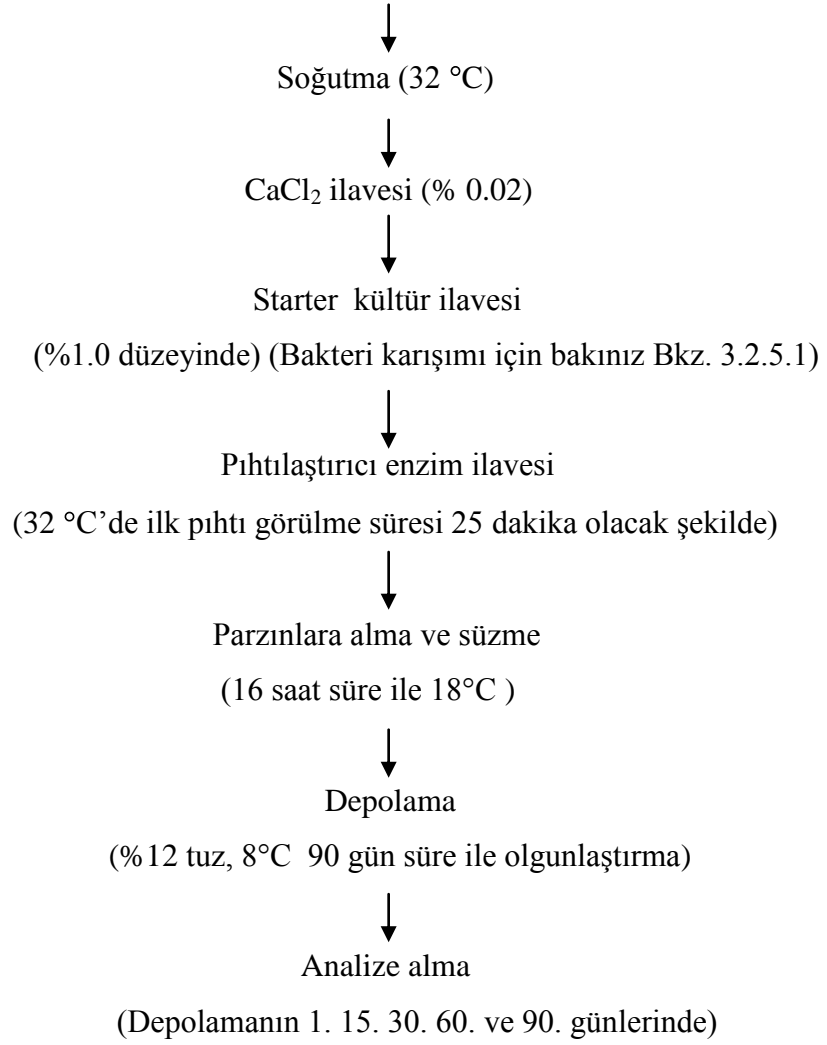
Urfa peyniri üretiminde kullanılacak olan starter kültür için seçilen suşlar ön aktifleştirmeye tabi tutulmuştur. Bu amaçla, 10 mL M17 sıvı besiyerine inoküle edilen suşlar 24 saat inkübe edilerek gelişmeleri sağlanmıştır. Daha sonra steril tüpler içerisinde santrifüj edilen (4° C'de 4000 rpm'de 5 dakika) suşlar çöktürülerek toplanmıştır. Yağsız süt tozu ile hazırlanan %12 (w/v) kurumaddeli rekonstitüye süt 121 °C'de 2 dakika süre ile sterilize edilmiştir. 3 farklı suş steril koşullar altında 50 ml'lik rekonstitüye süte inoküle edilerek 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve ilk pasaj kültür elde edilmiştir. Daha sonra bu pasaj kültürden peynir üretimi için kullanılacak olan ikinci pasaj steril süte %1 oranında inokülasyon yapılarak peynir üretiminde kullanılacak olan starter kültürler elde edilmiştir.

3.2.6.2. Peynir Yapımı

Peynir üretimi Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü AR-GE Süt İşletmesi'nde gerçekleştirilmiştir. Gerekli ön testlere tabi tutulan 100 litre sabah sağımı taze koyun sütü VAT tekniği ile 65 °C'de 30 dakika ısıl işleme tabi tutulduktan sonra 32 °C'ye kadar soğutulmuş ve peynir mayalama teknesine aktarılmıştır. Ardından, 1/16.000 kuvvetindeki ticari şirden mayasından 25 dakika içerisinde ilk pıhtı görülecek miktarda maya kazan başı testler ile hesaplanarak süte katılmıştır. Maya ilavesinin ardından 5 dakika süre ile karıştırılan süt daha sonra kesim olgunluğuna gelene kadar bekletilmiştir. Kesim olgunluğuna gelen pıhtı peynir kesme bıçakları aracılığı ile yaklaşık 1 cm³'lük küpler halinde kesilerek 15 dakika kendi halinde bırakıldıktan sonra yöresel dilde "parzın" olarak adlandırılan üçgen süzme bezlerine aktarılmış ve oda sıcaklığında yaklaşık 16 saat süre ile yüksek bir yere asılarak doğal yolla süzölmeye terk edilmiştir. Süzme işleminin sonunda peynir blokları parzınlardan çıkarılmış ve her bir plastik kaptaki 2 adet peynir bulunacak şekilde % 12'lik salamura çözeltisinden peynir ağırlığının 0.75 katı kadar ilave edilmiş ve 8 °C'de 3 ay süre ile olgunlaşmaya terk edilmiştir (Bkz. Şekil 3.1.). Geleneksel ve laboratuvar koşullarında Urfa peyniri üretim aşamaları Resim 1-15'de gösterilmektedir.

Geleneksel yöntemle üretilen Urfa peyniri %14-17 salamura içerisinde depolanmaktadır. Bir önceki denememizde (suş tespit çalışmasında) geleneksel olarak üretilen Urfa peynirleri %14 salamura içerisinde depolanmıştır. İkinci denememizde düşük salamura (%12 NaCl) konsantrasyonunda depolanmıştır. Üretimde düşük konsantrasyonda NaCl içeren salamura kullanılmasının nedeni, üretimde kullanılan sütün pastörize edilmesi ve ürün güvenliliğinin sağlanmasıdır. Diğer taraftan yüksek oranda NaCl içeren salamuranın laktik asit bakterilerinin gelişimini inhibe edebileceği ve aroma gelişimi, peptidaz aktivitesi gibi nedenlerle ürün kalitesini koruyabilecek en düşük konsantrasyonun kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.





Şekil 3.1. Urfa peyniri üretim aşamaları

Geleneksel Olarak Urfa Peyniri Üretimi



Şekil 3.2: Sağım yapılan İvesi ırkı koyunlar



Şekil 3.3: Sağılan sütün kaptan toplanması



Şekil3.4: Sütün mayalanması



Şekil 3.5: Pıhtı oluşumu için kabın sarılması



Şekil 3.6: Pıhtının kesilmesi



Şekil 3.7: Pıhtının parzınlara doldurulması



Şekil 3.8: Pıhtının şekillendirilmesi



Şekil 3.9: Peynir toplarının süzdürülmesi

Süt İşletmesinde Urfa Peyniri Üretimi



Şekil 3.10: Pastörize edilen sütün tekneye aktarılması



Şekil 3.11: Peynir pıhtısının kesilmesi



Şekil 3.12: Peynir altı suyunun süzülmesi



Şekil 3.13: Teleme



Şekil 3.14. Telemenin parzınlara konulması



Şekil 3.15 Parzınlara bağlanması



Şekil 3.16. Peynirlerin süzülmesi

3.2.7. Peynir Denemesinde Uygulanan Analizler

3.2.7.1. Çiğ Süt Analizleri**3.2.7.1.1. Kurumadde**

Çiğ ve ısıtılmış işlem görmüş inek sütlerinde kurumadde gravimetrik yöntemle % (w/w) olarak gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2002).

3.2.7.1.2. pH

pH ölçümlerinde bileşik elektrotlu dijital pH-metreden (Orion model 250 A, Orion Research Inc., Boston, A.B.D.) yararlanılmıştır.

3.2.7.1.3. Titrasyon asitliği

Sütlerde titrasyon asitliği titrimetrik olarak Soxhlet-Henkel metoduyla belirlenmiş ve % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim, 2002).

3.2.7.1.4. Yağ

Sütlerde yağ içerikleri Gerber yöntemiyle tespit edilmiş ve sonuçlar % (v/v) olarak verilmiştir (Anonim, 2002).

3.2.7.1.5. Toplam azot (TN)

Çiğ ve ısıtılmış işlem görmüş koyun sütlerinde toplam azot için örnek hazırlama Gripon ve ark. (1975)'e göre yapılmıştır. Buna göre 100 ml'lik ölçü balonuna 5 ml süt tartılarak aktarıldıktan sonra, saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. Seyreltilmiş süttten 20 ml kjeldahl tüplerine alınarak, mikro-kjeldahl yöntemiyle sütlerde toplam azot (%) belirlenmiştir.

3.2.7.1.6. Laktoz

Sütlerin laktoz içeriği Funke Gerber Lactostar (Labortech 12015 Berlin, Almanya) cihazı aracılığı ile belirlenmiştir.

3.2.7.1.7. Kül

Süt örneklerinin kül içeriği TS 9115'e göre tayin edilmiştir (Anonim, 1991).

3.2.7.2. Peyniraltı Suyu Analizleri

3.2.7.2.1. Kurumadde

Peyniraltı sularında (P.a.s.) kurumadde gravimetrik yöntemle belirlenmiştir (Anonim, 2002).

3.2.7.2.2. pH

pH ölçümlerinde bileşik elektrotlu dijital pH-metreden (Orion model 250 A, Orion Research Inc., Boston, A.B.D.) yararlanılmıştır.

3.2.7.2.3. Titrasyon asitliği

P.a.s'da titrasyon asitliği titrimetrik olarak Soxhelet-Henkel metoduyla belirlenmiş ve % laktik asit cinsinden ifade edilmiştir (Anonim, 2002).

3.2.7.2.4. Yağ

P.a.s.'unun yağ içerikleri Gerber yöntemiyle (%) tespit edilmiştir (Anonim, 2002).

3.2.7.3. Peynir Analizleri

3.2.7.3.1. Kimyasal analizler

3.2.7.3.1.1. Titrasyon asitliği

Peynir örneklerinin titrasyon asitlikleri (Anonim, 2005)'e göre belirlenmiş ve SH cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.7.3.1.2. pH

pH ölçümlerinde bileşik elektrotlu dijital pH-metreden (Orion 420) yararlanılmıştır.

3.2.7.3.1.3. Kurumadde

Peynirlerde toplam kurumadde gravimetrik yöntemle (%) saptanmıştır (Anonim, 2006).

3.2.7.3.1.4. Yağ

Yağ içeriği, Gerber yöntemine göre (%) saptanmıştır (Anonim, 2006).

3.2.7.3.1.5. Tuz

Tuz içeriği Mohr titrasyon yöntemi ile (%) analiz edilmiştir (Anonim, 2006).

3.2.7.3.1.6. Toplam azot (TN)

Peynirlerde toplam azot Gripon ve ark. (1975)'na göre saptanmıştır. Karıştırıcıdan geçirilerek homojen hale getirilmiş peynir örneklerinden 100 mL'lik behere 10 g tartılmış, aynı zamanda 100 mL'lik ayrı bir behere 40 mL 0.5 M trisodyum sitrat (pH 7.0) konulmuştur. Trisodyum sitrat yavaşça peynir örneği

üzerine dökülerek cam baget yardımıyla ezilmiştir. Bu işlem trisodyum sitrat bitinceye kadar devam etmiştir. 40 °C'ye ayarlanmış karıştırıcılı su banyosunda 5 dakikalık aralıklarla karıştırılarak 30 dakika tutulmuştur. Karıştırıcıya alınan örnek

30 saniye süreler ile 4 kez hızlı devirde karıştırılmıştır. Her bir karıştırma arasında 30 saniye beklenmiştir. Daha sonra karışım 200 mL'lik ölçü balonuna alınmıştır. Ardından karıştırıcı su ile yıkanarak 2 kez çalkalanmış ve ölçü balonuna aktarılmıştır. Köpükler kayboluncaya kadar beklenmiş ve hacim 200 mL'ye tamamlanarak örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekten 2 mL (0.1 g peynir) kjeldahl tüplerine alınarak 3.2.7.1.5. olduğu gibi azot tayini yapılmıştır. Yöntemdeki tek farklılık peynirde TN saptanmasında 4 ml H₂SO₄ kullanılmasıdır.

3.2.7.3.1.7. Suda çözünen azot (WSN)

Toplam azot için hazırlanan 150 ml örnek ölçü silindiri yardımıyla 400 mL'lik bir behere alınmıştır. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 4.40'a ayarlanmış, 200 mL'lik ölçü balonuna aktararak hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözelti Whatman 42 filtre kağıdı ile 2 defa filtre edilerek stok örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok örnekten 5 mL (0.1875 g peynir) alınarak analiz edilmiştir. Toplam azot (TN) tayininden farklı olarak peynirde suda çözünen azot saptanmasında 5 ml H₂SO₄ kullanılmış ve yakma aşamasında berraklaştıktan sonra 5 dakika daha aynı sıcaklıkta tutulmuştur.

3.2.7.3.1.8. Suda çözünen azotların ayrıştırılması

Kuchroo ve Fox (1982)'de belirtilen yöntemle göre suda çözünen azotlu maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Bu amaçla, 20 g peynir örneği 40 ml su ile karıştırılıp Ultra Turrax blender (Ultra Turrax T25 Basic, UCA, Almanya) kullanılarak 2 dakika homojenize edilmiştir. pH, 1 M HCl aracılığı ile 4.6'ya ayarlanmıştır. Karışım 40 °C'deki su banyosunda 1 saat tutulmuş ve ardından 3000 × g'de ve +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir (MSE, Mistral 1000, London, UK). Santrifüj sonrası, üst kısımdaki yağ tabakası bir spatül ile uzaklaştırıldıktan sonra, sıvı kısım Whatman No.113 filtre kağıdından süzümüştür. Kalan filtrat diğer analizler için kullanılmak üzere ayrılmıştır.

3.2.7.3.1.9. Toplam serbest amino asit konsantrasyonu

Analiz, Doi ve ark. (1981)'de belirtilen metodun, Folkertsma ve Fox (1992) tarafından uygulandığı şekliyle yapılmıştır. Cd–Ninhydrin çözeltisi (0.8 g ninhydrin, 80 ml etanol ve 10 ml buzlu asetik asit karışımında çözündürüldükten sonra elde edilen karışıma 1 ml su ve çözündürülmüş CdCl₂ ilave edilmiştir) ile hazırlanan örneğin absorbansı 507 nm'de ölçülmüştür. Bu amaçla, suda çözünen azot analizinde (3.2.7.3.1.8.) elde edilen ekstraktan 10–100 µl (beklenen serbest amino asit miktarına göre) alınmış ve saf su ile 1 ml'ye tamamlanıp üzerine 2 ml Cd-ninhydrin çözeltisi eklenmiştir. Karışım 84 °C'de 5 dakika tutulduktan sonra soğutulmuş ve 507 nm'deki absorbansı UV–spektrofotometrede (Shimadzu, UV–1700, Kyoto, Japonya) okunmuştur.

3.2.7.3.1.10. SPME GC-MS ile uçucu maddelerin analizi

Peynir örnekleri rendelenmiş ve cam tüplere alınarak -20 °C'de dondurulmuştur. Daha sonra buradan 3.0 g örnek (0.001 g duyarlılık ile) 15 ml'lik vial alınarak 40 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Uçucu maddelerin ekstraksiyonunda çözücüsüz teknik kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, 75 µm carboxen-polydimethylsiloxane fiber vial enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir ve 40 °C'de 30 dakika tepe boşluğuna (headspace) tutulmuştur. Her bir işlemde fiber 3 pozisyonda tutulmuştur. Ekstrakte edilecek uçucu bileşenlerin desorbsiyonu GC-MS sisteminde yapılmıştır. Desorbsiyon sırasında fiber 3 pozisyonunda 250 °C'de 2 dakika süre ile tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmış ve akış hızı 1 ml/dk olarak seçilmiştir. Bileşenler DB-Wax (60 m, 0.25 mm, 0.25 µm) kolondan ayrıştırılmıştır. Fırın sıcaklığı 40 °C'de 2 dakika tutulduktan sonra (desorpsiyon periyodu) dakikada 5 °C artışla sıcaklık 70 °C'ye yükseltilerek bu sıcaklıkta 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra sıcaklık dakikada 10 °C artışla 240 °C'ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 30 dakika tutulmuştur. Kütle spektrometresi 33–450 amu arası sabitlenmiş (eşik değeri 1000) ve örnekleme hızı dakikada 1.11 tarama olarak ayarlanmıştır. Peynirlerdeki uçucu aroma bileşiklerinin belirlenmesinde Shimadzu GC–2010 gaz kromatografisi sistemi ve buna bağlı Shimadzu QP–2010 kütle spektrometresi sistemi kullanılmıştır.

3.2.7.4. Elektroforetik Analizler

3.2.7.4.1. Ekstraksiyon ve Fraksiyonasyon

3.2.7.4.1.1. pH 4.6'da ekstraksiyon

20 g rendelenmiş peynir örneği 40 ml saf su ile Colworth Stomacher 400 (Seward Laboratory, Londra, İngiltere) kullanılarak 5 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Homojenatın pH'sı 1M HCl kullanılarak pH 4.6' ya getirilmiş ve oda sıcaklığında (21 °C) 30 dakika bekletildikten sonra pH tekrar kontrol edilerek aynı düzeye getirilmiştir. Elde edilen homojenat 40 °C'deki su banyosunda 1 saat tutulmuştur. Bu süre sonunda pH 4.6'da çözünen ve çözünmeyen fraksiyonlar soğutmalı (+4°C) santrifüjde (Hettich, Universal 32R, Almanya) 3000 x g'de 30 dakika ile santrifüj edilmiştir. Daha sonra, pH 4.6'da çözünen kısım Whatman No:113 filtre kağıdından geçirilmiş ve süzüntü dondurucu kurutucuda kurutulmuştur. Elde edilen toz örnekler peptid ve aminoasit analizleri için kullanılmıştır. pH 4.6'da çözünmeyen fraksiyonlar (pellet) Urea-PAGE (Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) analizi için dondurularak kurutulmuştur.

3.2.7.4.1.2. % 70 Etanol ile alt fraksiyonlara ayırma

20 ml pH 4.6 'da çözünen fraksiyon ile 46.7 ml susuz etanol ile karıştırılmıştır. Böylece, pH 4.6'da çözünen fraksiyon etanolde çözünen (daha küçük molekül ağırlıklı ve hidrofilik peptidler) ve etanolde çözünmeyen (daha büyük molekül ağırlıklı ve hidrofobik peptidler) alt fraksiyonlara ayrılması sağlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında (21 °C) 30 dakika tutulduktan sonra 3000 x g'de 20 °C'de 30 dakika süre ile santrifüj edilmiştir (Hettich, Universal 32R, Almanya). Elde edilen filtrat (etanolde çözünen peptitleri içeren fraksiyonlar) Whatman No:1 filtre kağıdı kullanılarak süzölmüş ve karışımdaki etanol bir rotary evaporatör (Bibby Sterelin Ltd., Stone, İngiltere) kullanılarak vakum altında 30 °C'de uzaklaştırılmıştır. Pellet (etanolde çözülmeyen fraksiyonları içeren fraksiyonlar) suda disperse edildikten sonra peptid analizi için dondurularak kurutulmuştur.

3.2.7.4.2. Üre-poliakrilamid jel elektoroforez (Urea-PAGE) ile kazein fraksiyonlarının belirlenmesi

Peynir örneklerinin pH 4.6'da %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonları üre PAGE (%12.5 C, %4.4 T, pH 9.8) yöntemi ile analiz edilmiştir. Üre PAGE, Andrews (1983)'in önerdiği ve Shalabi ve Fox (1987) tarafından kısmi olarak modifiye edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elektroforez Biorad Mini-protean II elektroforez (Bio-Rad Laboratories Ltd. Watford, İngiltere) aleti kullanılarak yapılmış ve elde edilen jeller Blakesley ve Boezi (1977)'de belirtildiği gibi Coomassie Brilliant Blue G250 ile boyanmıştır. Jelin hazırlanışı ve elektroforezin uygulanması aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır:

a) Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Akrilamid çözeltisi: % 40'lık hazır çözeltisi kullanılmıştır (Merck, Darmstadt, Almanya).

Yoğunlaştırıcı (Stacking) jel tamponu: 4.15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 150 g üre, 2,2 mL konsantre HCl saf suda çözülmüş ve hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltisinin pH'sı HCl ile 8.9'a ayarlanmıştır.

Ayırıcı (Seperating) jel tamponu: 32.15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 192.85 g üre, 2.86 ml konsantre HCl saf suda çözülmüş ve hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı HCl ile 8.9'a ayarlanmıştır.

Elektrot tamponu: 15 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 73 g glycine saf suda çözülmüş ve hacmi 5 L'ye tamamlanmıştır.

Örnek tamponu: 0.75 g tris (hydroxymethyl) aminomethane, 49 g üre 0.4 mL konsantre HCl, 0.7 mL 2-mercaptoethanol, 0.15 g bromophenol blue saf suda çözülmüş ve hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Amonyum persulfat: Saf suda % 10(w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış ve 1'er ml ependorf tüplerine konulmuştur ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C'deki derin dondurucuda tutulmuştur.

Boyama çözeltisi: Coomassie Brilliant Blue G250 % 0.2 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanmış ve eşit hacimde 1M H₂SO₄ ile karıştırıldıktan sonra bir gece bekletilmiştir. Ardından çözelti Whatman No.1 filtre kağıdından süzölmüş ve 9:1 oranında 10 M KOH ile karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltiye % 12 oranında trikloroasetik asit ilave edilmiştir.

b) Jel Çözeltilerini Hazırlanması

Yoğunlaştırıcı (Stacking) Jel Çözeltisi: 5 mL akrilamid çözeltisi, 45 mL yoğunlaştırıcı jel tamponu, 0.1 g N,N,N',N'- metilen bis-akrilamid karıştırılmış ve Whatman No.113 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen filtrata 25 µL N,N,N',N'-tetramethyleethylene diamine (TEMED) ilave edilmiştir.

Ayırıcı (Seperating) jel çözeltisi: 22.5 mL akrilamid çözeltisi, 52.5 mL ayırıcı jel tamponu 0.375 g N,N,N',N'-metilen bis-akrilamid karıştırılmış ve Whatman No.113 filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen filtrata 37.5 µL N,N,N',N'-tetramethyleethylene diamine (TEMED) ilave edilmiştir.

d) Örneğin hazırlanması: Dondurularak kurutulmuş örnekten 10 mg alınarak 1 mL örnek tamponunda çözülmüştür.

e) Elektroforezin Uygulanması: Elektroforeze başlamadan hemen önce başlangıç polimerizasyonunu sağlamak için ayırıcı (seperating) jel çözeltisine 282 µL amonyum persülfat ilave edilmiştir. Ayırıcı jel çözeltisi, her iki jel ünitesine dökölmüş ve jel seviyesi, jel tarakları yerleştirildiğinde tarakların uç kısmından yaklaşık 1 cm altta olacak şekilde ayarlanmıştır. Jelin üzerine saf su ilave edilmiş ve jel tamamen polimerize oluncaya kadar beklenilmiştir (~45 dakika). Polimerizasyon sonrasında kurumayı önlemek için ilave edilen su uzaklaştırılarak 300 µl amonyum persülfat ilave edilmiş yoğunlaştırıcı (stacking) jel çözeltisi jel ünitesine dökölmüş ve taraklar uygun pozisyonda yerleştirilmiştir. Çözeltinin polimerize olması için yeterli süre beklenilmiştir (~45-60 dakika). Polimerizasyondan sonra, taraklar çıkarılmış ve jeller içinde yeterli miktarda elektrot tamponu bulunan jel ünitesi yerleştirilmiştir. Elektroforez sistemi soğuk su ile sirköle edilerek soğutulmuştur. Jellere 30 dakika süre ile 280 V elektrik akımı uygulandıktan sonra peynir örneklerinin pH 4.6'da

çözünmeyen ekstraktları jel kuyucuklarına enjekte edilmiştir. Örnekler, önce yoğunlaştırıcı jel tamponu boyunca 280 V'de, ayırıcı jel tamponu boyunca 300 V'de yürütülmüştür. Örneklerin jelde yürütülmesi, boya izinin jel ünitesinin dip kısmına gelinceye kadar devam etmiştir.

f) Jelin Boyanması: Elde edilen jeller, Blakesley ve Boezi (1977)'nin önerdiği yöntemeye göre hazırlanan jel boyama çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Bu sürede jelde bulunan proteinlerin yoğunluklarına göre boya ile kompleks oluşturmaları sağlanmıştır. Ardından, jeller saf suya daldırılarak bant dışında kalan kısımlardaki boyanın giderilmesi sağlanmıştır.

3.2.7.5. RP-HPLC ile peptit profili analizi

pH 4.6'da çözünen fraksiyonların peptid analizleri LC 20AD Prominence model Shimadzu HPLC sistemi (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Sistemi oluşturan birimler ve özellikleri aşağıda verilmiştir:

- _ Otomatik örnek alıcı (autosampler, model SIL-20A HT)
- _ 4 pompalı çözücü dağıtım sistemi (solvent delivery system, model 20AD)
- _ Bir PC sistemine bağlı dedektör (Diod Array Detector, model SPD-M20A prominence)
- _ İnertsil RP C8 kolon (GL Sciences Inc, Tokyo, Japan) kullanılmıştır. Kolon özellikleri 250 × 4 mm, 5 µm patikul boyutu, 300 Å'dur.

a) Kullanılan Çözeltiler;

(A): % 0.1 (v/v) trifloroasetik asit (TFA, sequencing grade; Sigma St Louis, A.B.D.) deiyonize HPLC kalitesindeki suda (Milli-Q system, Waters Corp., Molsheim, Fransa) hazırlanmıştır.

(B): % 0.1 (v/v) TFA asetonitril (HPLC grade, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) içerisinde hazırlanmıştır ve çözeltinin akış hızı 0.75 ml/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

b) Örneklerin Analizi

Dondurularak kurutulmuş pH 4.6'da çözünen faksiyonlardan 10 mg tartılmış ve 1 ml (A) çözücüsünde çözüldürülmüştür. Daha sonra, 0.45 µm selüloz asetat filtreden (Sartorius GmbH, Göttingen, Almanya) geçirilmiş ve bu filtrattan 40 µl örnek sisteme enjekte edilmiştir. Örnekler başlangıçta 5 dakika süre ile % 100 (A) çözücüsü ile geçirilmiş ve daha sonra 55 dakika % 0–50 (B) çözücüsü ile geçirildikten sonra 6 dakika süre ile % 50 (B) çözücüsünde tutulmuştur. Ardından 4 dakika süre ile % 50–60 (B), ve son olarak 3 dakika % 60 (B) çözücüsünden geçirilmiştir. Kolon 5 dakika süre ile % 95 (B) çözücüsü ile yıkandıktan sonra bir sonraki enjeksiyon için % 100 (A) ile kalibre edilmiştir. Kromatografik ayırım 214 nm'de gerçekleştirilmiştir (Hayaloğlu ve ark., 2004).

2.2.7.6. Duyusal Analizler

Urfa peynirlerine özgü bir duyusal değerlendirme formu bulunmamaktadır. Peynir özellikleri ve duyusal değerlendirme formları dikkate alınarak Urfa peynirlerine özgü bir duyusal değerlendirme formu oluşturulmuştur (Bkz. Çizelge 3.1). Duyusal değerlendirmede süt ve süt ürünleri konusunda uzman 10 kişiden oluşan panel grubu kullanılmıştır.

Her duyusal değerlendirme öncesinde geleneksel olarak üretilmiş olgun Urfa peynirleri (piyasa örnekleri) kontrol örneği olarak kullanılmıştır. Duyusal değerlendirmeler Barcnas ve ark. (1999) tarafından geliştirilen tekniğe göre gerçekleştirilmiştir. Panelistler, örnekleri duyusal olarak değerlendirmenin yanı sıra tüketilebilir/tüketilemez ifadeleri ile de ayrıca değerlendirmişlerdir

2.3.7.7. İstatistiksel Analizler

Peynir denemesi iki tekrarlamalı olarak yapılmış ve istatistiksel analizler, SPSS version 9.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D.). Depolama süresince peynir örnekleri arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizine (one-way ANOVA) başvurulmuştur. ANOVA sonucunda önemli veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre en az $p < 0.05$ önem düzeyinde test edilmiş ve peynir örnekleri gruplandırılmıştır.

Çizelge 3.1. Urfa Peyniri Duyusal Değerlendirme Formu

Örnek Kodu: Panelistin Adı ve Soyadı:	Tarih:	PEYNİR ÖRNEKLERİ			
PEYNİR ÖZELLİKLERİ	PUAN	A1	A2	B1	B2
RENK VE GÖRÜNÜŞ(20)					
-Kendine özgü parlak beyaz, homojen ve prizmatik görünümlü, bozulmamış kalıp	20				
-Mat, soluk beyaz renk	15				
-Esmerimsi renk	10				
-Anormal renk	0				
-Kesit yüzeyinde birkaç delik ve gözenek	15				
-Homojen olmayan görünüm	10				
-Küflü görünüm	5				
-Fazla sayıda delik ve gözenek	10				
-Yarık ve çatlak oluşumu	10				
-Düzgün olmayan prizmatik görünüm, bozulmamış kalıp	5				
-Parçalanmış kalıp					
KİTLE ve YAPI(35)					
-Düzgün pürüzsüz, lekesiz, homojen kesit, fazla sert veya fazla yumuşak olmayan	35				
-Lekeli kesit	25				
-Kuru, sert yapı	25				
-Kaygan yapı	20				
-Kumlu yapı	10				
-Kesitte yarık ve çatlak oluşumu	10				
-Dağılabilen yapı	10				
-Elastiki yapı	5				
-Yumuşak ve ıslak yapı	5				
-Erimiş yapı					
KOKU(10)					
-Kendine özgü koku	10				
-Mayamsı koku	8				
-Ekşimsi koku	6				
-Küfumsü koku	4				
-Hayvansal koku	2				
-Yem veya ot kokusu	2				
-Yabancı koku	0				
TAT(35)					
-Kendine özgü tat	35				
-Maya tadı	25				
-Pişmiş tat	25				
-Ekşi tat	20				
-Tatlımsı tat	20				
-Tuzlu tat	20				
-Yavan tat	20				
-Metalik tat	15				
-Küflü tat	10				
-Acı tat	5				
-Yabancı tat	5				

Örnekleri beğendiğiniz sıraya göre numaralandırınız. 1.... 2.....3...

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Araştırmada Şanlıurfa ilinin 4 farklı bölgesinden (Viranşehir, Siverek, Birecik ilçeleri ve Kıyas beldesi) toplanan 20 adet taze Urfa peynir örneğinin her biri % 14 (w/v) tuz içeren pastörize salamura içerisinde 8 °C’de 3 ay olgunlaştırıldıktan sonra analize alınmıştır. Farklı besiyerlerinde (MRS, M17 ve KAA) geliştirilen 90 günlük peynirlere ait laktik asit bakterileri sayıları Çizelge 4.1.’de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği gibi farklı bölgelerde üretilen peynirlerde laktik asit bakterilerinin dağılımı değişkenlik göstermiş ve bu değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Bu farklılığın Urfa peyniri üretim koşullarındaki bölgesel farklılıklar ile süt hayvanının beslenme rejimi farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan birçok araştırmada farklı bölgelerde geleneksel olarak üretilen peynirlerde laktik asit bakterilerinin dağılımının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Akdeniz havzasında çiğ süttten geleneksel olarak üretilen birçok peynir çeşidinde laktik asit bakterilerinin sayısı 4 ile 9 log kob/g arasında değiştiği belirlenmiştir (Paola ve ark., 2007; Sanchez ve ark., 2005; Piraino ve ark., 2005; Coppola ve ark., 2003; Bouton ve ark., 1998).

Farklı bölgelerden toplanan 20 adet peynir örneğinden her besiyeri (MRS, M17 ve KAA) için 3’er adet olmak üzere toplam 180 adet izolat alınmıştır. Işık mikroskopunda incelenen bakterilerin morfolojileri (kok, basil ve çubuk), dizilişleri (mono-diplo-tetra kok, balya ve zincir), Gram boyama ve katalaz testleri sonucunda MRS agardan izole edilen 60 izolattan 47’sinin, M17 agardan izole edilen 60 izolattan 58 izolat, KAA agardan izole edilen 60 izolattan 38’inin muhtelif laktik asit bakterisi olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Üç ay olgunlaştırılmış 20 adet peynir örneğine ait mikrobiyel sayım sonuçları (log kob/g).

Besiyeri	Viranşehir	Siverek	Birecik	Kıyas
MRS agar	7.05±(0.31) ^b	8.03±(0.16) ^b	5.99±(0.12) ^a	5.946±(0.22) ^a
M17 agar	6.89±(0.30) ^a	9.68±(0.24) ^b	7.31±(0.50) ^a	6.815±(0.34) ^a
KAA agar	5.93±(0.14) ^{ab}	7.04±(0.25) ^b	5.10±(0.13) ^a	4.785±(0.33) ^a

* Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık p<0.05 düzeyinde önemlidir.

Kok ve basil şeklindeki laktik asit bakterilerinin morfolojik özellikleri, Gram reaksiyon ve katalaz test sonuçları Çizelge 4.2 ve 4.3’de verilmiştir. Buna göre izole edilen 143 izolattan 13’ünün basil ve 130’unun da kok formda olduğu belirlenmiştir.

4.2 Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

Kok ve basil şeklindeki izolatların fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.2 ve 4.3’de verilmiştir. Çizelgelerden de görüleceği gibi kok şeklindeki izolatlardan yalnızca bir adedi (26 nolu suş) glikozdan gaz üretirken diğer izolatlarda glikozdan gaz oluşumu gözlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda bu izolatların sütte homofermentatif özellik gösterdikleri belirlenmiştir.

10 °C ve 45 °C ile % 2, % 4 ve % 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişimlerine göre kok şeklindeki suşların fenotipik özellikleri karşılaştırılmıştır. Bu gibi testler *Lactococcus* cinsi bakterilerin, başta *Enterococcus* ve diğer *Streptococcus* cinsi bakterilerin ayrıştırılmasında kullanılmaktadır (Carr ve ark., 2002; Schleifer ve Balz, 1984). 10 °C, 45 °C’de ve % 6.5 NaCl’de gelişebilen suşlar enterekok olarak tanımlanmıştır. 45 °C ve % 6.5 NaCl’de gelişim durumlarına göre 130 kok izolatın 115’i entorokok grubu bakteriler, diğer 15 izolat ise fenotipik özelliklerine göre *Lactococcus* spp. grubu bakteriler, olarak kabul edilmiştir. Morfolojik olarak basil olduğu belirlenen 13 izolatın tamamı 15 °C’de gelişim gösterdiği için mezofilik karakterli suşlar olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Tanımlaması yapılan *Lactococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. izolatlarının bazı morfolojik ve fenotipik özellikleri

Suş No	Gram reaksiyonu	Morfoloji	Katalaz Reaksiyonu	Glikozdan Gaz Üretme	10 °C'de Gelişme	45 °C'de Gelişme	% 2 NaCl'de Gelişme	% 4 NaCl'de Gelişme	% 6.5 NaCl'de Gelişme
1	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
2	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
3	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
4	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
5	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
6	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
7	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
8	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
10	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
12	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
14	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
15	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
16	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
17	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
18	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
19	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
21	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
22	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
23	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
24	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
26	+	Kok	-	+	+	-	+	+	+
27	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
29	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+

30	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
31	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
32	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
34	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
35	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
36	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
37	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
39	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
40	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
42	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
43	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
44	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
45	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
48	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
49	+	Kok	-	-	+	±	+	+	±
50	+	Kok	-	-	+	±	+	+	±
51	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
52	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
53	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
54	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
55	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
56	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
57	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
58	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
59	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
60	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
61	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
62	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+

63	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
64	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
65	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
66	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
67	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
68	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
69	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
70	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
71	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
72	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
73	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
74	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
75	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
76	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
77	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
78	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
79	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
80	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
81	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
82	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
83	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
84	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
85	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
86	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
87	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
88	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
89	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
90	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-

91	+	Kok	-	-	+	+	+	+	É”
92	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
93	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
94	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
95	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
96	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
97	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
98	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
99	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
100	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
101	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
102	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
103	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
104	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
105	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
106	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
107	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
108	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
109	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
110	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
111	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
112	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
113	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
114	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
115	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
116	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
117	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
118	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+

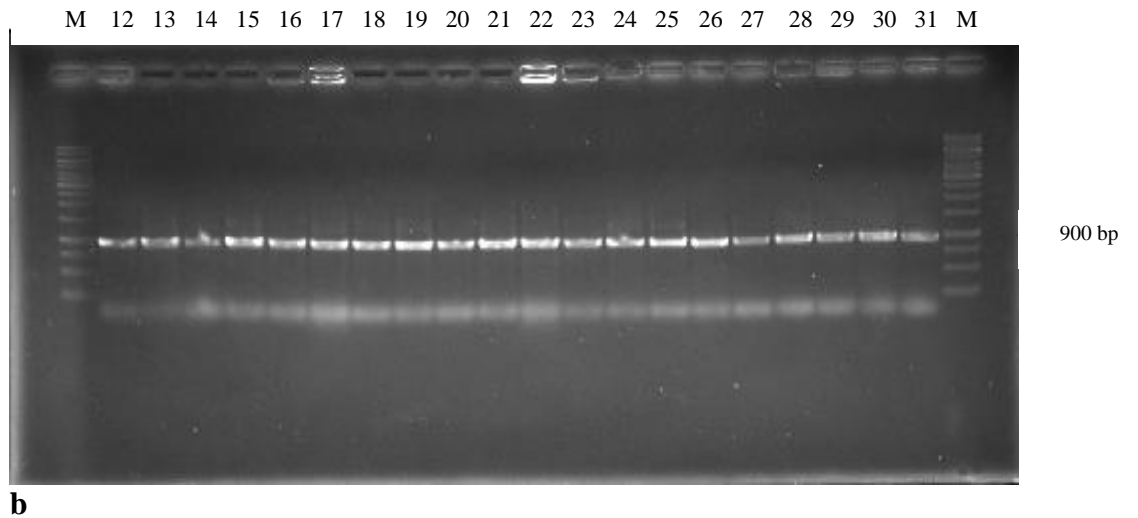
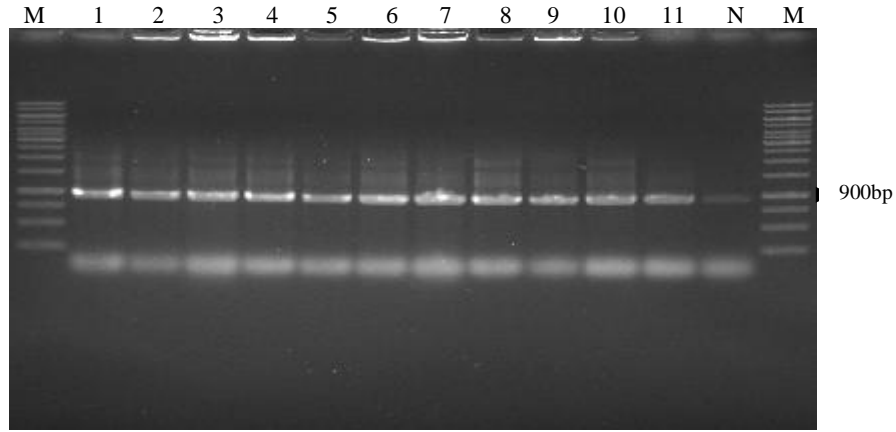
119	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
120	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
121	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
122	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
123	+	Kok	-	-	+	-	+	+	+
124	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
125	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
127	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
128	+	Kok	-	-	+	-	+	+	-
129	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
130	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
131	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
132	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
133	+	Kok	-	-	+	±	+	+	+
134	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
135	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
136	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
137	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
138	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
139	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
140	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
141	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
142	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+
143	+	Kok	-	-	+	+	+	+	+

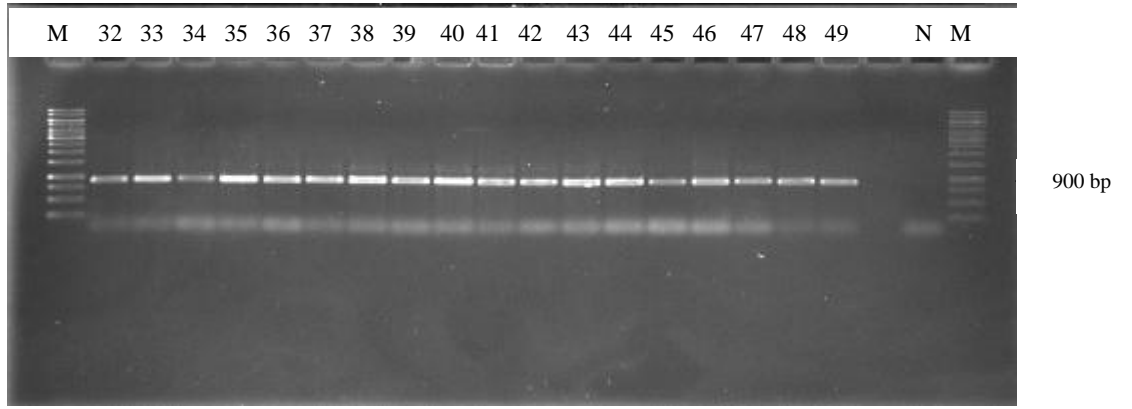
Çizelge 4.3. Tanımlaması yapılan *Lactobacillus* spp. izolatlarının bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Suş No	Gram reaksiyonu	Katalaz reaksiyonu	Glikozdan Gaz Üretme	15 °C'de Gelişme	45 °C'de Gelişme	% 6.5NaCl'de Gelişme
9	+	-	-	+	+	+
11	+	-	-	+	+	+
13	+	-	-	+	+	+
19	+	-	-	+	+	+
25	+	-	-	+	+	+
28	+	-	-	+	+	+
33	+	-	-	+	+	+
38	+	-	-	+	+	+
41	+	-	-	+	+	+
42	+	-	-	+	+	+
46	+	-	-	+	+	+
47	+	-	-	+	+	+
126	+	-	-	+	+	+

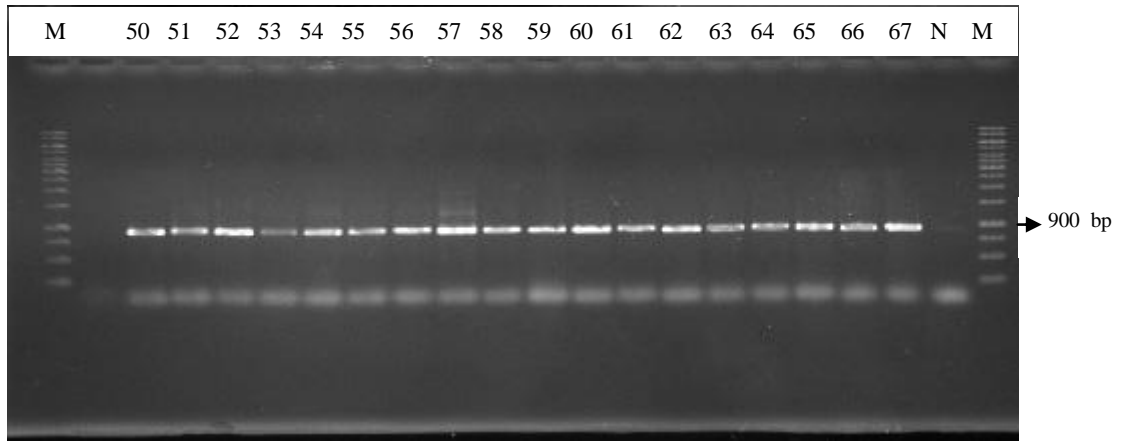
4.3. 16S rDNA Sekans Dizi Analizi İle İzolatların Moleküler Olarak Karakterizasyonu

Farklı besiyerinde geliştirilen 143 izolatın moleküler tiplendirilmesi 16S rDNA sekans dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA kodlayan 900 bazlık DNA fragmanının PCR jel görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir. BLAST programı kullanılarak elde edilen 16S rDNA dizi analizi sekans sonuçları da Çizelge 4.4’te verilmiştir.

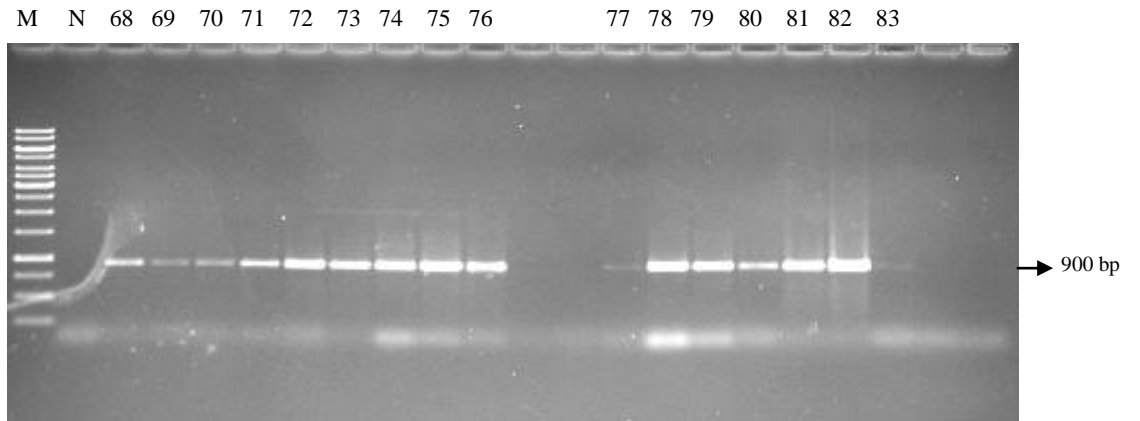




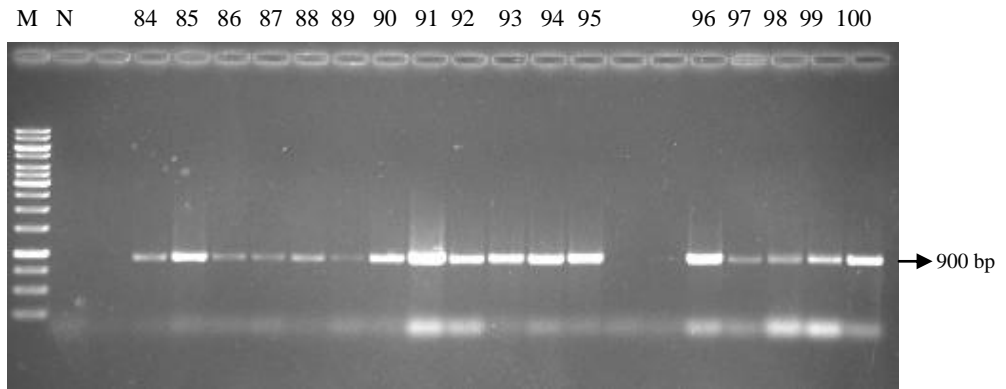
c.



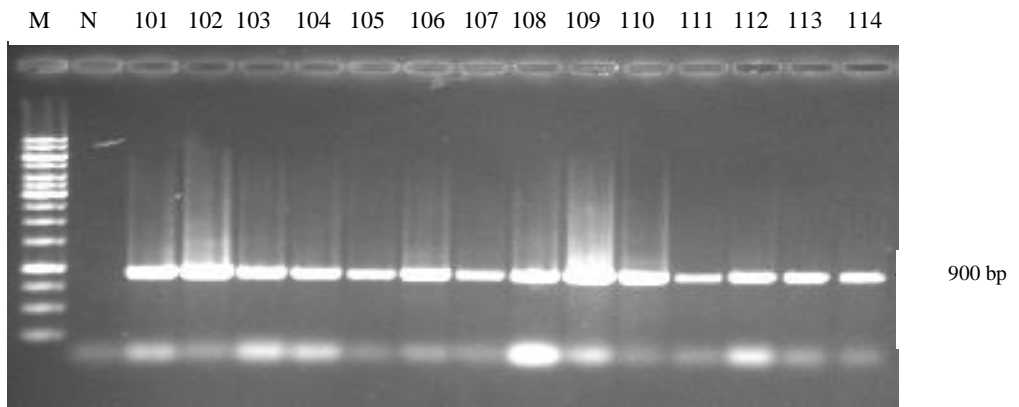
d.



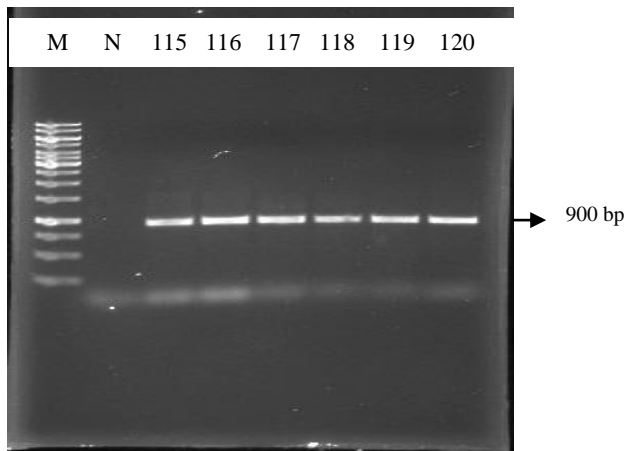
e.



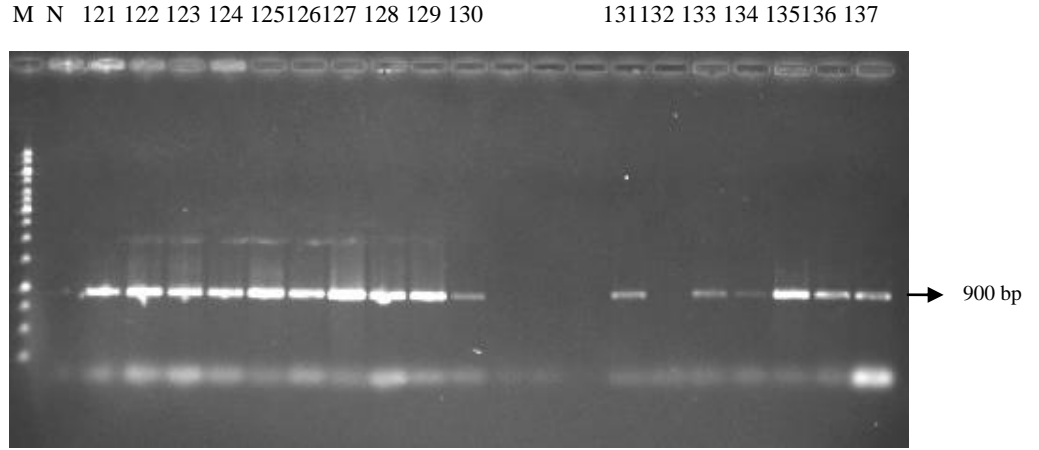
f.



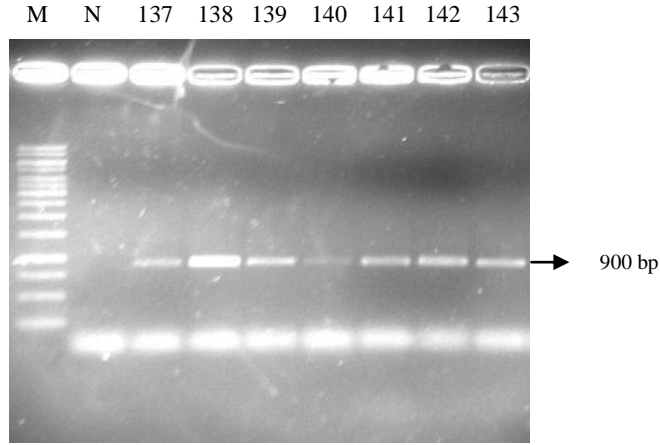
g.



h.



i.



j.

Şekil 4.1. Urfa peynirlerinden izole edilen toplam 143 izolata ait Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bantları. M: Marker, N: Negatif

Suş no: a: 1-11, b: 12-31, c: 32-49, d:50-67, e:68-83, f: 84-100, g:101-114, h: 115-120, i: 121-137, j:138-143.

Çizelge 4.4. 16S rDNA dizi analizi sekans sonuçlarına göre bakteri gruplarının alt türlere göre sınıflandırılması ve yakınlık dereceleri.

Suş No	En yakın komşu (nearest neighbour)	Yüzde Nükleotid Benzerliği (Percentage identity)	Nükleotid Dizi Erişim Numarası (Nucleotide sequence accession number)
1	<i>Enterococcus faecium</i> strain Hwo5	%99	EU717959
2	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60172	%99	FJ917726.1
3	<i>Enterococcus faecium</i> strain Cg05	%99	EU717959.1
4	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F23	%97	FJ378708.2
5	<i>Enterococcus faecium</i> strain L3	%97	GQ267519.1
6	<i>Enterococcus faecium</i> strain ATCC 19434	%97	DQ411813.1
7	<i>Enterococcus faecium</i> strain M3-1	%97	EU794733
8	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60182	%95	FJ917733.1
9	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain IMAU60162	%95	FJ749876
10	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F23	%95	FJ378708.2
11	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain IMAU60201	%97	FJ915646
12	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F23	%97	FJ378708.2
13	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain IMAU60162	%97	FJ749876
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain IMAU60162	%97	FJ749876
15	<i>Enterococcus faecium</i> strain IDCC 2104	%97	EU003448.1
16	<i>Enterococcus faecium</i> strain CSI35MX	%97	FJ538584.1
17	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60192	%98	FJ917742
18	<i>Lactobacillales bacterium</i> DJF_ DJF_O20	%96	EU728748.1
19	<i>Lactobacillales bacterium</i> DJF_ DJF_O20	%95	EU728748.1
20	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMAU10052	%98	FJ915708
21	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F22	%96	FJ378707
22	<i>Enterococcus faecium</i> strain CSI36MX	%97	FJ538584.1
23	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F23	%98	FJ378708.2
24	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F22	%97	FJ378707
25	<i>Lactobacillales bacterium</i> DJF_ DJF_O20	%96	EU728748.1
26	<i>Leuconostoc lactis</i> strain IMAU50090	%98	FJ915632
27	<i>Lactococcus lactis</i> strain NS32	%98	EU194346

28	<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS 6.0606	%98	EU419601.1
29	<i>Enterococcus faecium</i> strain SH 632	%98	EU003448.1
30	<i>Enterococcus faecium</i> strain IDCC 2104	%98	AY683836
31	<i>Enterococcus faecium</i> strain KLDS 6.0642	%99	FJ861092.1
32	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain 1B4	%99	EU337113
33	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain IMAU60201	%92	FJ915646
34	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMAU60134	%98	FJ749851
35	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CICC6022	%95	DQ171715
36	<i>Enterococcus lactis</i> strain CK1026	%98	DQ255948.1
37	<i>Enterococcus faecium</i> strain G129	%97	EF204315.1
38	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain IMAU60162	%97	FJ749876
39	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50146	%92	FJ749540.1
40	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60192	%97	FJ917742
41	<i>Lactobacillus bacterium</i> DJF_ DJF_O20	%95	EU728748.1
42	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60200	%96	FJ915645.1
43	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50157	%96	FJ749551.1
44	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU60022	%96	FJ215671
45	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50167	%96	FJ513847.1
46	<i>Lactobacillus bacterium</i>	%97	EU728748.1
47	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain IMAU60201 %86	%97	FJ915646
48	<i>Streptococcus parauberis</i> strain SAP 99	%99	AF284579
49	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CICC6019	%95	DQ173744.1
50	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain 1B4	%100	EU337113.1
51	<i>Enterococcus durans</i> strain M4-5	%94	EU794738.1
52	<i>Lactococcus lactis</i> strain KLDS4.0602	%99	GQ337894.1
53	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60188	%99	FJ917738.1
54	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60172	%99	FJ917726.1
55	<i>Enterococcus durans</i> strain M4-5	%97	EU794738.1
56	<i>Enterococcus lactis</i> strain SK12	%94	EU337116.1
57	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain 1B4	%99	EU337113.1

58	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50094	%99	FJ915634.1
59	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU60022	%99	FJ215671
60	<i>Enterococcus lactis</i> strain SK12	%98	EU337116.1
61	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMAU60169	%94	FJ749883.1
62	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU10059	%99	FJ915715.1
63	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain IMAU40012	%99	FJ749731
64	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50167	%94	FJ749561.1
65	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50094	%99	FJ915634
66	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50094	%99	FJ915634
67	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU60022	%99	FJ215671.1
68	<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS6.0632	%94	FJ607288.1
69	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU10167	%92	FJ915822.1
70	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60192	%98	FJ917742.1
71	<i>Enterococcus faecium</i> strain R8	%99	EU483112.1
72	<i>Enterococcus faecium</i> strain SH 632	%98	EU878170.1
73	<i>Enterococcus faecalis</i> strain KLDS0.0341	%96	GQ337884.1
74	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU10167	%94	FJ915822.1
75	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60200	%99	FJ915645.1
76	<i>Enterococcus durans</i> strain M4-5	%97	EU794738.1
77	<i>Enterococcus hirae</i> strain SS1227	%93	GQ337029
78	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU10130	%99	FJ915786.1
79	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50167	%94	FJ749561
80	<i>Enterococcus faecalis</i> strain XR7	%96	EU708623.1
81	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU40046	%99	FJ749321.1
82	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU10130	% 99	FJ915786.1
83	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50094	%98	FJ915634.1
84	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50157	%98	FJ749551.1
85	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50157	%98	FJ749551.1
86	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F22	%97	FJ378707.1

87	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50094	%99	FJ915634.1
88	<i>Lactococcus lactis</i> strain CICC6023	%96	DQ212982
89	<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS6.	%94	FJ607288.1
90	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50157	%98	FJ749551.1
91	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU60022	%97	FJ215671
92	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50147	%94	FJ749541.1
93	<i>Lactococcus lactis</i> strain KLDS4.0601	%99	GQ337893.1
94	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Pic6	%98	EU337109.2
95	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50125	%94	FJ749519.1
96	<i>Enterococcus faecium</i> strain SH 632	%98	EU878170.1
97	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain IMAU60040	%97	FJ215671
98	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain 1B4	%97	EU337113.1
99	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain 1A6	%98	EU337110.1
100	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50146	%92	FJ749540.1
101	<i>Enterococcus lactis</i> strain CK1026	%97	DQ255948.1
102	<i>Enterococcus faecium</i> strain IDCC 2103	%99	EU003447.1
103	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU40046	%98	FJ749321.1
104	<i>Lactococcus lactis</i> strain KLDS 4.0319	%97	DQ212977.1
105	<i>Lactococcus lactis</i> strain M10-4-3	%98	EU195809
106	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N26	%93	FJ378681.1
107	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CICC6019	%98	DQ212981.1
108	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F22	%98	FJ378707.1
109	<i>Lactococcus lactis</i> strain KLDS 4.0319	%95	DQ212977.1
110	<i>Lactococcus lactis</i> isolate B20	%91	AY604868
111	<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS6.	%94	FJ607288.1
112	<i>Lactococcus lactis</i> strain KLDS 4.0601	%98	GQ337893.1
113	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60192	%97	FJ917742
114	<i>Enterococcus faecalis</i> strain KLDS0.0341	%96	GQ337884.1
115	<i>Enterococcus hirae</i> strain H1	%93	EU887813.1
116	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50146	%94	FJ749540.1

117	<i>Enterococcus faecalis</i> strain KLDS0.0341	%96	GQ337884.1
118	<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS6.	%94	FJ607288.1
119	<i>Enterococcus faecalis</i> strain KLDS0.0341	%96	GQ337884.1
120	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain IMAU40012	%98	FJ749731.1
121	<i>Lactococcus lactis</i> strain CICC6025	%98	DQ212981.1
122	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU70122	%97	GQ131238.1
123	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50125	%98	FJ749519.1
124	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU50148	%99	FJ749542
125	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Pic6	%98	EU337109
126	<i>Lactobacillales bacterium</i>	%99	EU728748.1
127	<i>Lactococcus lactis</i> isolate B20	%89	AY604868.1
128	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain IMAU60040	%95	FJ215673.1
129	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU50125	%95	FJ749519.1
130	<i>Lactococcus lactis</i> strain CICC6018	%99	DQ171719.1
131	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU10093	%97	FJ915749
132	<i>Lactococcus lactis</i> strain LA35	%95	DQ523490
133	<i>Lactococcus garvieae</i> strain IMAU60022	%95	FJ215673.1
134	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60188	%93	FJ917738.1
135	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU60185	%93	FJ917736.1
136	<i>Lactococcus lactis</i> strain D22	%92	EF204353
137	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strain IMAU60040	%95	FJ215673.1
138	<i>Lactococcus lactis</i> strain D22	%92	EF204353
139	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU70122	%96	GQ131238.1
140	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU70078	%96	GQ131194.1
141	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU10154	%95	FJ915809.1
142	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU10167	%93	FJ915822
143	<i>Lactococcus lactis</i> isolate B20	%89	AY604868.1

İzole edilen suşların moleküler olarak sınıflandırılması sonucunda, MRS besiyerinden izole edilen 47 izolattan yalnızca 10 adedi *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanırken 22 adedi *Enterococcus* spp., 14 adedi *Lactococcus* spp., 1 adedi *Leuconostoc* spp. olarak tanımlanmıştır. M17 besiyerinden izole edilen 58 laktik asit bakterisinden 44 izolat *Lactococcus* spp. olarak tanımlanırken, 10 izolat *Enterococcus* spp., 3 izolat *Lactobacillus* spp. ve 1 izolat streptokok olarak tanımlanmıştır. KAA besiyerinden izole edilen 38 laktik asit izolatın tamamının *Enterococcus* spp. grubu bakterilerden oluştuğu belirlenmiştir.

Lactobacillus cinsi bakterilerin izolasyonu amacıyla kullanılan MRS besiyerinde *Lactobacillus* spp.'den çok *Enterococcus* spp. ve *Lactococcus* spp. izole edilmesine bu besiyerinin farklı türdeki kokların gelişimine de olanak sağlaması ve depolama sırasında *Enterococcus* cinsi bakterilerin ortama hakim mikroflora konumuna gelmesinin neden olduğu düşünülmektedir. Benzer sonuçlar geleneksel olarak üretilen birçok peynir çeşidinde de gözlenmiştir. Velijovic ve ark. (2007) "Zlata" peynirinde olgunlaşma sonunda *Enterococcus* spp. türü bakterilerin ortama hakim olduğunu belirlemişlerdir. Bir diğer araştırmada, Boubekri ve Ohta (1996), olgunlaşmış "El-Klila" peynirlerinde *Enterococcus* cinsi bakterilerin baskın türler olduğunu saptamışlardır. Fortina ve ark. (2003), İtalyan "Toma piemontese" peynirinde hakim mikroflora üzerine yaptıkları çalışmada MRS besiyerinden izole edilen suşların büyük bir çoğunluğunun *Enterococcus* cinsi bakterilerden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Franciosi ve ark. (2008), MRS besiyerinde yüksek miktarda laktik asit bakterisi bulmalarına karşın bunlardan yalnızca birkaç tanesinin *Lactobacillus* spp. türüne ait suşlardan oluştuğunu ve *Enterococcus* cinsi bakterilerin ortamda baskın olduğunu belirlemişlerdir. Dolci ve ark. (2008)'da, MRS besiyerinde *Lactobacillus* spp. yanı sıra *Lactococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. suşlarını da izole etmişlerdir. Caridi (2003), "Pecorino del Pero" peynirinde baskın florayı karakterize ettiği çalışmasında MRS besiyerinden izole edilen 90 suştan yalnızca 41'ini *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. Bir diğer araştırmada ise, Lopez-Diaz ve ark. (2000), MRS besiyerinde izole edilen suşların % 62.7'si *Lactococcus* spp., % 22'sini ise *Lactobacillus* spp. olarak tanımlamışlardır.

Çizelge 4.4'de de görüldüğü gibi 16S rDNA sekans dizi analizi ile tanımlaması yapılan suşların 70'i (% 48.95) *Enterococcus* spp., 58'i (% 40.55) *Lactococcus* spp., 13'ü (% 9.10) *Lactobacillus* spp., 1'i (% 0.69) *Streptococcus* spp. ve 1'i (% 0.69) *Leuconostoc* spp. olarak tanımlanmıştır. 70 *Enterococcus* spp. izolatın 28 adedi *Enterococcus faecium* (% 40), 23 adedi *E. durans* (% 32.85), 13 adedi *E. faecalis* (% 18.57), 4 adedi *E. lactis* (% 5.71) ve 2 adedi (% 2.85) *E. hirae* olarak tanımlanırken, 59 *Lactococcus* spp. izolatın 37 adedi (% 62.71) *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, 18 adedi *Lactococcus garvieae* (% 30.50) ve 4 adedi (% 6.77) *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanan 13 izolatın ise 6'sının (% 46.15) *Lactobacillus* spp., 4'ünün (% 30.76) *Lactobacillus fermentum* ve 3'ünün (% 23.07) *Lactobacillus helveticus* olduğu bulunurken, *Streptococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. olarak tanımlanan suşların ise sırasıyla *Streptococcus parauberis* ve *Leuconostoc lactis* olduğu tespit edilmiştir.

Urfa peyniri herhangi bir starter kültür ilave edilmeden çiğ süttten üretildiği için izole edilen ve tanımlanan suşlar doğal bulaşılabilirler. Bu sonuçlar doğrultusunda, çiğ süttten geleneksel olarak üretilen olgunlaşmış Urfa peynirinde hakim olan florayı *Enterococcus* spp. (1.sırada) ve *Lactococcus* spp. (2.sırada) grubu laktik asit bakterilerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Elde edilen alt tiplene sonuçları Avrupa'da, özellikle de Akdeniz havzasındaki ülkelerde geleneksel olarak çiğ süttten üretilen peynirlerdeki hakim flora dağılımı ile benzerlik göstermektedir. Farklı özellikte ve orijinde üretilen peynir çeşitlerinden; Pecorino peyniri (Aquilanti ve ark., 2007), Raschera peyniri (Dolci ve ark., 2008), Pecorino Siciliano peyniri (Vernile ve ark., 2008), Canestrato peyniri (Aquilanti ve ark., 2006) ile Toma piemontese peynirinde (Fortina ve ark., 2003) 16S rDNA sekans dizi analizi ile yapılan sınıflandırmalar sonucunda da *Enterococcus* ve *Lactococcus* cinsi bakterilerin baskın florayı oluşturdukları görülmüştür.

Geleneksel Urfa peynirinde laktik asit bakterilerinin tanımlandığı bir başka araştırmada Uraz ve ark. (2008) 11 adet geleneksel Urfa peynirinden izole ettikleri

toplam 80 izolatu API CHL 50 test kiti kullanılarak karakterize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda izolatları % 47 *Enterococcus* spp. (%33 *E. faecalis*, %13 *E. faecium*, %1 *E. hirae*), % 14 *Lactococcus* spp. (*Lc. lactis*), % 14 *Lactobacillus* spp. (% 4 *Lb. helveticus*, % 4 *Lb. brevis*, % 6 *Lb. plantarum*), % 7 *Leuconostoc* spp. (% 3 *Leu. lactis*, % 4 *Leu. dextranicum*), % 4 *Streptococcus* spp. (% 3 *Streptococcus uberis*, % 1 *Streptococcus raffinolactis*) olarak sınıflandırmışlardır.

Enterococcus spp. türü bakterilerin olgunlaşmış Urfa peynirindeki laktik asit bakteri florasında yüksek miktarlarda bulunması, bu bakteri türünün birçok suşunun düşük pH ve sıcaklık ile yüksek tuz konsantrasyonuna karşı dirençli olmasından kaynaklanmaktadır (Aquilanti ve ark., 2006). Bilindiği gibi, Urfa peyniri yüksek tuz içeren salamura içerisinde (%14-20 w/v) ve <10 °C’de olgunlaştırılmaktadır. Ayrıca çiğ sütün sağım ve işleme koşullarının olasılıkla hijyenik olmaması da bu tür bakterilerinin gelişimine öncülük ettiği düşünülmektedir. Geleneksel olarak çiğ süttten üretilen peynirlerde hem üretim esnasında hem de olgunlaşma aşamasında *Enterococcus* cinsi bakterilerin sayısal yoğunlukları genellikle artış göstermektedir (Giraffa, 2003; Andrighetto ve ark., 2001). Yapılan araştırmalarda *Enterococcus* cinsi bakterilerin taze peynirlerde yüksek oranlarda bulunmasına çiğ süte direkt fekal kaynaklı bulaşmanın veya indirekt olarak sütçülük ekipmanları ve süt depolama tanklarından kaynaklanan bulaşmaların neden olarak gösterilmektedir (Giraffa, 2003). Yüksek tuz ve düşük pH’ya karşı olan dirençlerinden dolayı *Enterococcus* cinsi bakterilerin olgunlaşmanın ileri evrelerinde de peynir florasında yer almakta ve olgunlaşma süresine göre peynirde 6-8 log₁₀ kob/g düzeylerinde bulunabilmektedir (Clementi ve ark., 1998). *Enterococcus* cinsi bakteriler, Akdeniz kuşağında hem çiğ süttten hem de pastörize süttten geleneksel olarak üretilen peynirlerde yaygın olarak bulunmaktadır (Andrighetto ve ark., 2001; Giraffa, 2003; Suzzi ve ark., 2000). *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* peynir florasında en sık rastlanan *Enterococcus* spp. türleridir ve peynirlerin yapı, tat ve aroma gelişimde önemli roller oynamaktadırlar (Rodriguez ve ark., 1995; Cogan ve ark., 1997; Giraffa, 2003). Bu özelliklerinden dolayı bazı Avrupa peynirlerinde (Feta, Mozzarella ve Cebreiro)

starter kültür kombinasyonunda kullanılmaktadır (Sarantinopoulos ve ark., 2002; Villani ve Coppola, 1994; Mendez ve ark., 2001).

Urfa peynir örneklerinden izole edilen *Lactococcus* spp. türü bakteriler içinde *Lc. lactis* subsp. *lactis* (% 62.71) türü baskın tür olarak belirlenirken bunu *Lc. garvieae* (% 30.50) ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (% 6.77) suşları izlemiştir. Güney Avrupa ülkelerinde geleneksel olarak çiğ koyun sütünden üretilen birçok peynirin florasında *Lactococcus* spp. türü bakteriler baskın olarak bulunmaktadır (Torres-Llanez ve ark., 2006; Estepar ve ark., 1999; Rodriguez ve ark., 1995).

İzole edilen *Lactococcus* spp. suşların % 30.50'sinin *Lc. garvieae* türü bakterilerden oluşması dikkat çekmektedir. *Lc. garvieae* süt ürünlerinde de bulunmakla birlikte deniz ürünlerinde yaygın bir bakteri türüdür ve balıklarda önemli bir hastalık etmeni olarak bilinmektedir (Eldar ve ark., 1999). Yapılan bir çok araştırmada bu türün geleneksel peynirlerde *Lc. lactis* ile birlikte doğal flora içerisinde yer aldığı belirlenirken peynirde de aroma gelişimi başta olmak üzere bazı spesifik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Klijin ve ark., 1995; Morea ve ark., 1999; Villani ve ark., 2001; Blaiotta ve ark., 2002; Fortina ve ark., 2003). İtalya ve Yunanistan'da üretilen farklı peynirlerin mikrobiyel florasını belirlenmesine yönelik çalışmalarda, düşük miktarda da olsa *Lc. garvieae*'nin hakim bakteri popülasyonu içerisinde yer aldığı görülmüştür. Bundan dolayı, bu tür bakteriler fermente süt ürünlerinde laktik asit bakteri florası içerisinde değerlendirilmekte ve fermente ürün üzerinde önemli etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Fortina ve ark., 2003, 2007). *Lc. garvieae*, fenotipik özellikleri ve ekolojik konumlarına göre süt ürünlerinden ve deniz ürünlerinden izole edilen türler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Süt ürünlerinden izole edilen suşlar laktozu parçalayabilme özelliği gösterirken, balıklardan izole edilen suşlar bu yeteneğe sahip değildir (Fortina ve ark., 2003). El-Baredei ve ark. (2007), geleneksel bir Mısır peyniri olan Domiati peynirinden izole ettikleri bazı suşların deniz (marine) kökenli olarak bilinen bakterilerden oluştuğunu ve bu bakterilerin Domiati peynirinin olgunlaşma safhasında önemli etkileri olduğunu belirlemişlerdir. Bir diğer araştırmada Zeppa ve ark. (2004), geleneksel olarak İtalyan Alplerinde üretilen "Toma piemontese" peynirlerinden izole edilen

laktik asit bakterilerinin % 37.93'ünü *Lc. garvieae*'nin oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Urfa peynirinde tanımlanan *Lactobacillus* cinsi bakteriler (*Lactobacillus* spp., *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*) NSLAB (starter olmayan laktik asit bakterileri) grubu içerisinde değerlendirilmektedir. NSLAB doğal çiğ süt mikroflorasında yer almaktadır ve özellikle uzun süreli olgunlaştırılan peynirlerde aroma gelişimde önemli role sahip oldukları bilinmektedir (Beresford ve ark., 2001). Fox ve ark. (1998), 3 aydan daha uzun süre olgunlaştırılan peynirlerde NSLAB sayısının en üst seviyeye ulaştığını belirlemişlerdir. Zlatar peyniri gibi bazı geleneksel peynirlerde olgunlaşmanın başlangıcında düşük seviyelerde bulunan *Lactobacillus* spp. grubu bakterilerin sayısında olgunlaşma sonuna doğru belirgin artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Velijovic ve ark., 2007).

Urfa peynirinde tanımlanan izolatlar arasında bir adet *Streptococcus parauberis* (48 nolu suş) ve 2 adet *E. hirae* (77 ve 115 nolu suş) suşu izole edilmiştir. Bu suşların peynir florası içerisinde yer almasına hijyenik olmayan sağım ve ortam koşullarının neden olduğu düşünülmektedir. Tanımlanması yapılan suşlar arasında 1 adet de *Leuconostoc lactis* (26 nolu suş) suşu izole edilmiştir.

4.3.1. Tanımlaması Yapılan Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri

10 °C ve 45 °C ile % 2, % 4 ve % 6.5 NaCl konsantrasyonlarındaki gelişimlerine göre kok şeklindeki suşların fenotipik özellikleri karşılaştırılmıştır. *Enterococcus* cinsi bakterilerin tamamının 10 °C, 45 °C ve % 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterdiği belirlenmiştir. *Lactococcus* spp. grubu bakteri içerisinde değerlendirilen 58 suşun 44'ünün (% 75.86) % 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterdiği, 14'ünün (% 24.13) ise gelişemediği saptanmıştır. 58 *Lactococcus* spp. suşundan 12'sinin 45 °C'de gelişme gösteremediği, 13 suşun zayıf, 33 suşun ise tamamen gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanında 10 *Lactococcus* spp. suşu % 6.5 NaCl konsantrasyonunda

gelişim gösterirken, 45 °C'de gelişim gösteremediği belirlenmiştir. % 6.5 tuz konsantrasyonunda ve 45 °C'de gelişim gösteren suşlar *Lactococcus* cinsi bakterilere göre atipik özellik göstermiştir

Urfa peynirinde *Enterococcus* spp. türüne ait suşların yüksek miktarlarda bulunmasının nedeni peynir örneklerinin yüksek tuz konsantrasyonu (%14 NaCl salamura) ve düşük sıcaklık (<10 °C) koşullarında olgunlaştırılmasına bağlı olarak bu türe ait suşların % 6.5 NaCl konsantrasyonu ve 10 °C ile 45 °C'de gelişim gösterebilmesinden kaynaklanmaktadır. Urfa peynirinden izole edilen *Lactococcus* cinsi bakterilerin büyük çoğunluğunun % 6.5 NaCl, 10 °C ve 45 °C'de gelişim gösterebilmesi bu bakteri suşlarının ülkemizde geleneksel olarak yüksek tuz konsantrasyonunda olgunlaştırılan peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılmalarını olanaklı kılması muhtemeldir.

Bir çok araştırmada da çiğ süttten ve geleneksel peynirlerden izole edilen *Lactococcus* spp. suşlarının yüksek tuz konsantrasyonu (% 6.5) ve yüksek sıcaklıkta (45 °C) gelişerek *Lactococcus* cinsi bakteriler için atipik özellikler gösterdikleri belirlenmiştir. Velijovic ve ark. (2007), Zlata peynirinden izole edilen ve 45 °C ile % 6.5 NaCl koşullarında gelişebilen laktik kökenli kokların sayısının olgunlaşma süresince artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada, Fortina ve ark. (2003), “Toma piemontese” peynirinden izole ettikleri *Lactococcus* spp. türü bakterilerinin büyük çoğunluğunun % 6.5 NaCl konsantrasyonunda ve 10 °C'de gelişim göstererek *Lactococcus* cinsi bakteriler için atipik özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Randazzo ve ark. (2006), “Pecorino Siciliano” peynirinin farklı olgunlaşma periyotlarından ve çiğ süt örneklerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin tamamının % 6.5 NaCl ve 45 °C gelişim gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bir diğer araştırmada ise Fortina ve ark., (2007) Kuzey İtalya'da geleneksel olarak üretilen peynirlerden izole ettikleri *Lc. garvieae*'nin 10 °C, 45 °C ve % 6.5 NaCl ortamında gelişimlerini incelediklerinde izolatların sırasıyla % 58, % 88 ve % 56'sının gelişim gösterebildiklerini belirlemişlerdir. Benzer şekilde; El-Baradei ve ark. (2007), Domiati peynirlerinden izole ettikleri *Lactococcus* spp. türü bakterilerin tamamına yakınına tuza dirençli suşlar olarak karakterize etmişlerdir.

4.4. Tanımlaması Yapılan İzolatların Teknolojik Özellikleri

4.4.1. Asit Üretimi

Laktik asit bakterileri homofermentatif ya da heterofermentatif olarak karbonhidratı metaboliz ederek laktik asit üretmeleri sonucu pH'da azalmaya neden olurlar. Asitlikte meydana gelen artış, peynirin tat, aroma ve tekstür özelliklerinde önemli değişimlere neden olmaktadır. Bundan dolayı laktik asit bakterilerinin asit üretme özellikleri süt endüstrisinde önem teşkil etmektedir.

Tanımlanması yapılan 143 izolata ait pH değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. 30 °C'de 6 saat inkübasyon sonunda 7 *Lactococcus* spp. suşu (suş no: 43, 87, 92, 95, 123, 129, 133) ve 37 °C'de 6 saat inkübasyon sonunda 1 *Lactobacillus* spp. suşu (suş no: 46) pH'yı 5.3' ün altına düşürebilmişlerdir. 30 °C'de 6 saatlik inkübasyon sonucu yağsız UHT sütün pH'sını 5.3' ün altına düşüren laktokların 5'i *Lc. garvieae*, 2'si *Lc. lactis* spp. *lactis* olarak tespit edilmiştir. *Enterococcus* spp. grubu bakterilerin 37 °C'de 6 saatlik inkübasyon sonunda asitlik gelişimleri incelendiğinde UHT sütün pH'sının 5.4 ile 6.0 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Herreros ve ark. (2003), yaptıkları araştırmada 6 saat inkübasyon sonunda \geq 2.5 mg/ml üzerinde laktik asit üretebilen *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarının peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceklerini belirtmiştir. İnkübasyon süresince laktik asit üretim miktarlarında meydana gelen değişim Çizelge 4.6'da verilmiştir. Laktik asit üretim değerleri incelendiğinde, 6 saatlik inkübasyon sonunda 70 *Enterococcus* spp. suşu içerisinde 8 suş (suş no: 3, 4, 5, 8, 16, 22, 36, 119) dışındaki tüm suşlar, 59 *Lactococcus* spp. suşu içerisinde 5 suş (suş no: 35, 110, 112, 132, 135) dışındaki tüm suşlar ve *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanan 13 suş içerisinde 4 suş (suş no: 9, 11, 13, 126) dışındaki tüm suşlar 2.5 mg/ml üzerinde laktik asit üretmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, özellikle izole edilen 54 *Lactococcus* spp. suşun laktik asit üretim kapasiteleri dikkate alındığında peynir üretiminde starter kültür olarak kullanabilme olasılığının bulunduğu belirlenmiştir.

Geleneksel peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin teknolojik özellikleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Coppola ve ark. (2003), Caciocavallo peynirlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin asit üretebilme yeteneklerini araştırdıklarında izolatların % 80'inin MRS besiyeri ve süt pH'sını 3.5-4.5 düzeyine kadar düşürdüğü belirlenmiştir. Bir başka çalışmada, Morea ve ark. (1999), geleneksel olarak üretilen Mozzarella peynirlerinden izole edilen ve 16S rDNA sekans dizi analizi ile sınıflandırılması yapılan suşları teknolojik özelliklerine göre karakterize ettiklerinde, en yüksek asit üretme yeteneğinin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının gösterdiğini saptamışlardır. Bir diğer çalışmada; Perez ve ark. (2003), Tenerife peynirlerinden izole edilen toplam 130 laktik asit bakterisinden *Lactococcus* cinsi bakteriler, özellikle de *Lc. lactis* spp. *lactis*'in en yüksek asidifikasyon özelliğini gösterdiği; *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* türü suşların ise zayıf asit üreticileri olduklarını saptamışlardır.

Çizelge 4.5. İzolatların yağsız UHT sütte 3, 6, 9 ve 24 saatlik inkübasyon süresince oluşan pH değerleri.

Suş No	0 saat	3 saat	6 saat	9 saat	24 saat
1	6,56	6,42	5,68	5,20	4,64
2	6,56	6,43	5,95	5,42	4,74
3	6,56	6,47	5,95	5,35	6,65
4	6,56	6,45	5,95	5,39	4,59
5	6,56	6,44	6,01	5,42	4,74
6	6,56	6,44	5,65	5,19	4,41
7	6,56	6,41	5,73	5,18	4,52
8	6,56	6,45	5,97	5,47	4,78
9	6,56	6,47	5,99	5,52	4,61
10	6,56	6,42	5,65	5,20	4,47
11	6,56	6,46	6,12	5,72	4,92
12	6,56	6,47	5,81	5,33	4,51
13	6,56	6,51	6,01	5,46	4,85
14	6,56	6,42	5,61	5,16	4,40
15	6,56	6,46	5,66	5,39	4,53
16	6,56	6,42	5,85	5,23	4,46
17	6,56	6,42	5,69	5,30	4,53
18	6,56	6,43	5,73	5,30	4,51
19	6,56	6,41	5,72	5,31	4,53
20	6,56	6,45	5,67	5,20	4,46
21	6,56	6,44	5,62	5,24	4,61
22	6,56	6,51	6,10	5,48	4,53
23	6,56	6,38	5,61	5,22	4,46
24	6,56	6,41	5,67	5,28	4,48
25	6,56	6,36	5,62	5,23	4,44
26	6,56	6,37	5,53	5,11	4,38
27	6,56	6,40	5,63	5,25	4,46
28	6,56	6,38	5,61	5,20	4,44
29	6,56	6,40	5,66	5,29	4,60
30	6,56	6,39	5,64	5,23	4,54
31	6,56	6,38	5,64	5,19	4,49
32	6,56	6,37	5,57	5,20	4,49
33	6,56	6,35	5,60	5,19	4,49
34	6,56	6,36	5,55	5,18	4,48
35	6,56	6,42	5,92	5,59	4,96
36	6,56	6,29	5,90	5,76	5,46
37	6,56	6,24	5,54	5,20	4,63
38	6,56	6,30	5,60	5,23	4,46
39	6,56	6,33	5,57	5,16	4,36
40	6,56	6,25	5,54	5,17	4,42

41	6,56	6,23	5,50	5,12	4,40
42	6,56	6,16	5,57	5,39	4,87
43	6,56	6,34	4,65	4,19	3,94
44	6,56	6,28	5,50	5,03	4,43
45	6,56	6,14	5,61	5,22	4,45
46	6,56	6,25	5,30	5,07	4,47
47	6,56	6,35	5,76	5,39	4,69
49	6,56	6,36	5,41	5,09	4,34
50	6,56	6,29	5,48	4,08	4,43
51	6,56	6,26	5,45	5,12	4,47
52	6,56	6,29	5,54	5,10	4,43
53	6,56	6,30	5,57	5,23	4,47
54	6,56	6,29	5,56	5,20	4,48
55	6,56	6,30	5,51	5,15	4,42
56	6,56	6,28	5,49	5,21	4,41
57	6,56	6,31	5,51	5,13	4,41
58	6,56	6,37	5,66	5,27	4,51
59	6,56	6,30	5,65	5,36	4,69
60	6,56	6,28	5,66	5,35	4,67
61	6,56	6,29	5,59	5,21	4,48
62	6,56	6,29	5,57	5,12	4,42
63	6,56	6,29	5,55	5,17	4,45
64	6,56	6,27	5,56	5,02	4,42
65	6,56	6,25	5,56	5,15	4,47
66	6,56	6,29	5,54	5,01	4,41
67	6,56	6,34	5,61	5,07	4,36
68	6,56	6,34	5,62	5,24	4,64
69	6,56	6,31	5,50	5,10	4,40
70	6,56	6,31	5,66	5,34	4,63
71	6,56	6,33	5,45	5,20	4,43
72	6,56	6,30	5,37	5,01	4,41
73	6,56	6,34	5,37	5,13	4,40
74	6,56	6,30	5,35	5,12	4,37
75	6,56	6,29	5,38	5,08	4,42
76	6,56	6,27	5,36	4,97	4,36
77	6,56	6,32	5,43	5,01	4,39
78	6,56	6,24	5,56	5,00	4,41
79	6,56	6,30	5,54	5,15	4,41
80	6,56	6,30	5,38	5,03	4,43
81	6,56	6,33	5,56	5,30	4,58
82	6,56	6,30	5,52	5,23	4,68
83	6,56	6,34	5,46	5,05	4,50
84	6,56	6,37	5,43	5,12	4,44
85	6,56	6,38	5,63	5,16	4,54

86	6,56	6,37	5,50	5,20	4,54
87	6,56	6,20	4,60	4,35	4,19
88	6,56	6,35	5,58	5,25	4,55
89	6,56	6,35	5,39	5,02	4,30
90	6,56	6,36	5,41	5,08	4,37
91	6,56	6,35	5,40	5,08	4,26
92	6,56	6,35	5,28	4,87	4,36
93	6,56	6,35	5,64	5,26	4,55
94	6,56	6,35	5,32	4,78	4,24
95	6,56	6,34	5,22	4,53	4,15
96	6,56	6,39	5,63	5,26	4,55
97	6,56	6,38	5,46	5,11	4,39
98	6,56	6,34	5,50	5,07	4,42
99	6,56	6,39	5,50	5,10	4,42
100	6,56	6,42	5,60	5,15	4,42
101	6,56	6,43	5,54	5,09	4,48
102	6,56	6,36	5,51	5,18	4,55
103	6,56	6,42	5,72	5,29	4,55
104	6,56	6,42	5,64	5,36	4,66
105	6,56	6,47	5,59	5,14	4,37
106	6,56	6,40	5,71	5,46	4,83
107	6,56	6,43	5,46	4,96	4,36
108	6,56	6,46	5,51	5,20	4,50
109	6,56	6,53	5,85	5,24	4,49
110	6,56	6,48	6,07	5,57	4,59
111	6,56	6,38	5,70	5,14	4,42
112	6,56	6,48	6,02	5,70	4,76
113	6,56	6,46	5,70	5,20	4,33
114	6,56	6,48	5,79	5,36	4,46
115	6,56	6,43	5,69	5,31	4,45
116	6,56	6,44	5,61	5,28	4,40
117	6,56	6,48	5,78	5,63	5,00
118	6,56	6,46	5,61	5,22	4,45
119	6,56	6,42	6,05	5,50	4,26
120	6,56	6,47	5,65	5,26	4,39
121	6,56	6,46	5,80	5,35	4,43
122	6,56	6,41	5,63	5,23	4,36
123	6,56	6,38	5,28	4,56	4,10
124	6,56	6,44	5,76	5,35	4,49
125	6,56	6,48	5,64	5,17	4,30
126	6,56	6,33	6,19	5,59	4,45
127	6,56	6,47	5,59	5,22	4,43
128	6,56	6,44	5,77	5,42	4,58
129	6,56	6,25	4,82	4,36	4,03

130	6,56	6,34	5,49	5,07	4,19
131	6,56	6,36	5,63	5,13	4,36
132	6,56	6,42	5,87	5,43	4,64
133	6,56	6,22	4,87	4,37	3,95
134	6,56	6,38	5,58	5,37	4,54
135	6,56	6,48	5,71	5,17	4,28
136	6,56	6,36	5,50	5,16	4,29
137	6,56	6,38	5,70	5,45	4,59
138	6,56	6,54	6,14	5,57	4,53
139	6,56	6,36	5,62	5,26	4,46
140	6,56	6,54	5,82	5,23	4,31
141	6,56	6,38	5,58	5,22	4,34
142	6,56	6,38	5,56	5,16	4,33
143	6,56	6,49	5,71	5,28	4,37

*Koyu renk ile işaretlenmiş suşlar 6 saat inkübasyon sonunda pH'yı 5.30'un altına düşürmüştür.

Çizelge 4.6. İzolatların yağsız UHT sütte 3, 6, 9 ve 24 saatlik inkübasyon süresince oluşan laktik asit değerleri (% l.a).

Suş No	0 saat % L.A.	3 saat % L.A.	6 saat % L.A.	9 saat % L.A.	24 saat % L.A.
1	0,135	0,171	0,283	0,463	0,634
2	0,135	0,171	0,264	0,456	0,613
3	0,135	0,175	0,234	0,387	0,639
4	0,135	0,157	0,234	0,400	0,535
5	0,135	0,180	0,211	0,391	0,630
6	0,135	0,180	0,279	0,481	0,670
7	0,135	0,171	0,261	0,432	0,711
8	0,135	0,171	0,229	0,364	0,513
9	0,135	0,162	0,220	0,319	0,454
10	0,135	0,157	0,265	0,450	0,612
11	0,135	0,126	0,207	0,319	0,508
12	0,135	0,153	0,261	0,405	0,639
13	0,135	0,139	0,229	0,360	0,517
14	0,135	0,157	0,288	0,441	0,634
15	0,135	0,157	0,279	0,346	0,589
16	0,135	0,166	0,229	0,427	0,621
17	0,135	0,166	0,279	0,400	0,544
18	0,135	0,148	0,279	0,378	0,553
19	0,135	0,166	0,283	0,351	0,585
20	0,135	0,153	0,283	0,418	0,616
21	0,135	0,157	0,274	0,387	0,567
22	0,135	0,153	0,229	0,346	0,630
23	0,135	0,171	0,288	0,418	0,675
24	0,135	0,157	0,274	0,405	0,625
25	0,135	0,175	0,279	0,405	0,630
26	0,135	0,166	0,279	0,472	0,657
27	0,135	0,166	0,283	0,405	0,589
28	0,135	0,171	0,288	0,418	0,621
29	0,135	0,153	0,279	0,382	0,594
30	0,135	0,157	0,288	0,405	0,625
31	0,135	0,157	0,279	0,414	0,616
32	0,135	0,171	0,283	0,409	0,616
33	0,135	0,162	0,292	0,418	0,594
34	0,135	0,171	0,297	0,427	0,612
35	0,135	0,157	0,220	0,301	0,522
36	0,135	0,180	0,238	0,274	0,423
37	0,135	0,180	0,351	0,499	0,517
38	0,135	0,184	0,346	0,472	0,715
39	0,135	0,180	0,328	0,477	0,765
40	0,135	0,189	0,360	0,477	0,702

41	0,135	0,202	0,342	0,481	0,711
42	0,135	0,211	0,319	0,400	0,607
43	0,135	0,166	0,463	0,787	0,904
44	0,135	0,189	0,333	0,495	0,661
45	0,135	0,184	0,315	0,450	0,751
46	0,135	0,180	0,373	0,486	0,648
47	0,135	0,159	0,274	0,404	0,602
49	0,135	0,189	0,328	0,472	0,744
50	0,135	0,180	0,351	0,463	0,747
51	0,135	0,166	0,355	0,517	0,697
52	0,135	0,184	0,345	0,482	0,692
53	0,135	0,165	0,226	0,329	0,474
54	0,135	0,198	0,310	0,468	0,765
55	0,135	0,184	0,328	0,477	0,729
56	0,135	0,189	0,328	0,463	0,747
57	0,135	0,171	0,315	0,436	0,747
58	0,135	0,189	0,319	0,441	0,760
59	0,135	0,189	0,292	0,400	0,675
60	0,135	0,198	0,301	0,391	0,693
61	0,135	0,198	0,306	0,436	0,733
62	0,135	0,189	0,369	0,481	0,769
63	0,135	0,198	0,337	0,459	0,769
64	0,135	0,184	0,319	0,531	0,945
65	0,135	0,175	0,328	0,468	0,742
66	0,135	0,162	0,315	0,549	0,877
67	0,135	0,175	0,310	0,513	0,882
68	0,135	0,166	0,328	0,418	0,711
69	0,135	0,180	0,319	0,490	0,747
70	0,135	0,189	0,310	0,405	0,679
71	0,135	0,189	0,337	0,486	0,738
72	0,135	0,198	0,364	0,504	0,747
73	0,135	0,211	0,369	0,481	0,715
74	0,135	0,189	0,364	0,531	0,720
75	0,135	0,198	0,373	0,522	0,724
76	0,135	0,180	0,382	0,549	0,720
77	0,135	0,193	0,355	0,540	0,693
78	0,135	0,189	0,310	0,526	0,850
79	0,135	0,184	0,328	0,477	0,796
80	0,135	0,184	0,369	0,450	0,693
81	0,135	0,175	0,333	0,436	0,652
82	0,135	0,175	0,342	0,477	0,589
83	0,135	0,166	0,346	0,540	0,760
84	0,135	0,189	0,355	0,486	0,715
85	0,135	0,184	0,292	0,441	0,625

86	0,135	0,171	0,315	0,400	0,630
87	0,135	0,202	0,630	0,733	0,778
88	0,135	0,175	0,310	0,441	0,607
89	0,135	0,189	0,391	0,481	0,720
90	0,135	0,180	0,373	0,513	0,738
91	0,135	0,189	0,369	0,504	0,792
92	0,135	0,189	0,405	0,513	0,783
93	0,135	0,171	0,306	0,427	0,603
94	0,135	0,180	0,382	0,544	0,733
95	0,135	0,193	0,387	0,702	0,841
96	0,135	0,180	0,306	0,427	0,589
97	0,135	0,193	0,364	0,522	0,706
98	0,135	0,184	0,346	0,486	0,661
99	0,135	0,184	0,342	0,499	0,675
100	0,135	0,193	0,319	0,468	0,648
101	0,135	0,180	0,346	0,504	2,043
102	0,135	0,180	0,360	0,463	2,034
103	0,135	0,175	0,333	0,445	0,652
104	0,135	0,180	0,306	0,432	0,612
105	0,135	0,171	0,337	0,450	0,702
106	0,135	0,180	0,319	0,400	0,580
107	0,135	0,184	0,364	0,396	0,706
108	0,135	0,090	0,324	0,373	0,702
109	0,135	0,162	0,265	0,396	0,688
110	0,135	0,171	0,225	0,315	0,693
111	0,135	0,184	0,265	0,360	0,805
112	0,135	0,174	0,180	0,306	0,639
113	0,135	0,175	0,265	0,405	0,720
114	0,135	0,171	0,256	0,355	0,747
115	0,135	0,184	0,265	0,378	0,702
116	0,135	0,162	0,270	0,301	0,702
117	0,135	0,175	0,292	0,315	0,490
118	0,135	0,175	0,301	0,396	0,679
119	0,135	0,162	0,238	0,319	0,855
120	0,135	0,162	0,252	0,382	0,787
121	0,135	0,171	0,252	0,337	0,639
122	0,135	0,162	0,265	0,396	0,729
123	0,135	0,162	0,355	0,517	0,868
124	0,135	0,175	0,261	0,216	0,477
125	0,135	0,175	0,292	0,364	0,805
126	0,135	0,157	0,244	0,348	0,760
127	0,135	0,173	0,250	0,395	0,644
128	0,135	0,148	0,261	0,306	0,670
129	0,135	0,175	0,418	0,472	0,990

130	0,135	0,175	0,310	0,391	0,814
131	0,135	0,189	0,288	0,319	0,900
132	0,135	0,175	0,238	0,351	0,612
133	0,135	0,193	0,423	0,598	0,994
134	0,135	0,171	0,306	0,351	0,675
135	0,135	0,162	0,274	0,373	0,760
136	0,135	0,189	0,301	0,391	0,720
137	0,135	0,180	0,261	0,337	0,675
138	0,135	0,166	0,216	0,306	0,711
139	0,135	0,184	0,292	0,364	0,679
140	0,135	0,166	0,243	0,396	0,738
141	0,135	0,198	0,274	0,391	0,769
142	0,135	0,189	0,315	0,387	0,801
143	0,135	0,175	0,261	0,364	0,738

*Koyu renk ile gösterilen suşlar 6 saat inkübasyon sonunda % 0.25 altında laktik asit üretmişlerdir.

4.4.2. Bakteriyosin Üretim Özelliğinin Belirlenmesi

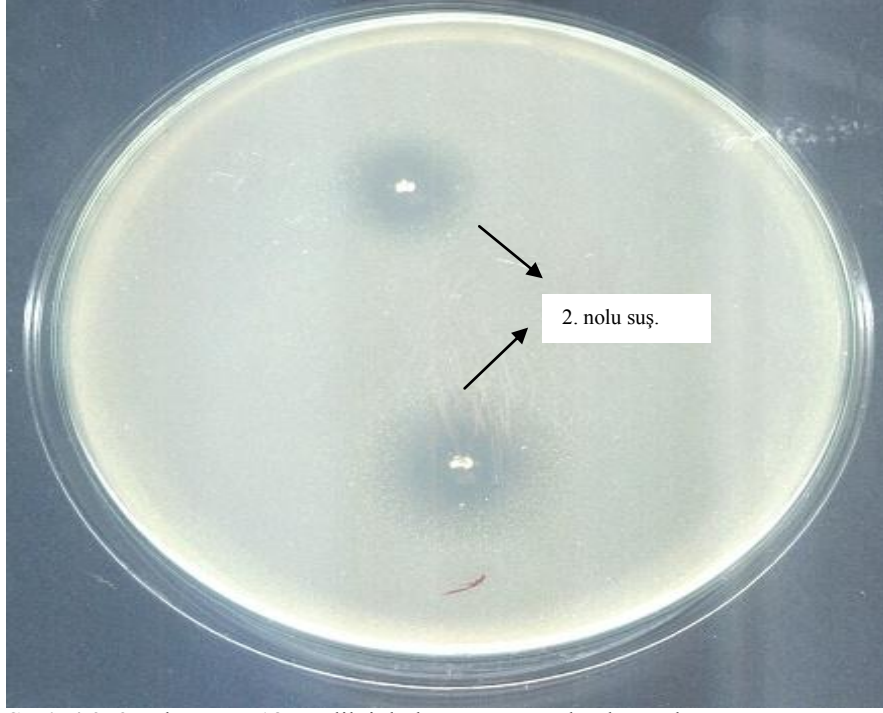
Bakteriyosinler, protein doğasında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Tagg ve ark., 1976). Bu tür bakteriler hedef bakteriyi inaktive ya da inhibe etmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı inhibisyon etkisi gösterirler (Jack ve ark., 1995). Fermente ya da taze gıdalarda bulunan çok sayıda laktik asit bakterisi farklı türlerde bakteriyosinler üretebilmektedir (Cleveland ve ark., 2001). Örneğin; *Lactococcus lactis* “nisin- laktisin 481- laktokoksin G”; *Leuconostoc mesenteroides* “mesenterisin Y105”; *Lactobacillus helveticus* “helvetisin J”; *Enterococcus faecium* “Enterosin P, Enterosin B, Enterosin A” gibi farklı türlerde bakteriyosinler üretebilmektedirler.

Araştırmamızda deneme peynirlerinden izole edilen ve tanımlaması yapılan suşların yalnızca bakteriyosin üretebilme durumları incelenmiştir. Bu amaçla M17 ve MRS agar üzerine inoküle edilen bakterilerin indikatör suş *Micrococcus luteus*’a karşı oluşturdukları zonlar bakteriyosin aktivitesi olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen ve tanımlanması yapılan suşlardan toplam 14 suşun (suş no: 2-3-4-5-7-8-12-

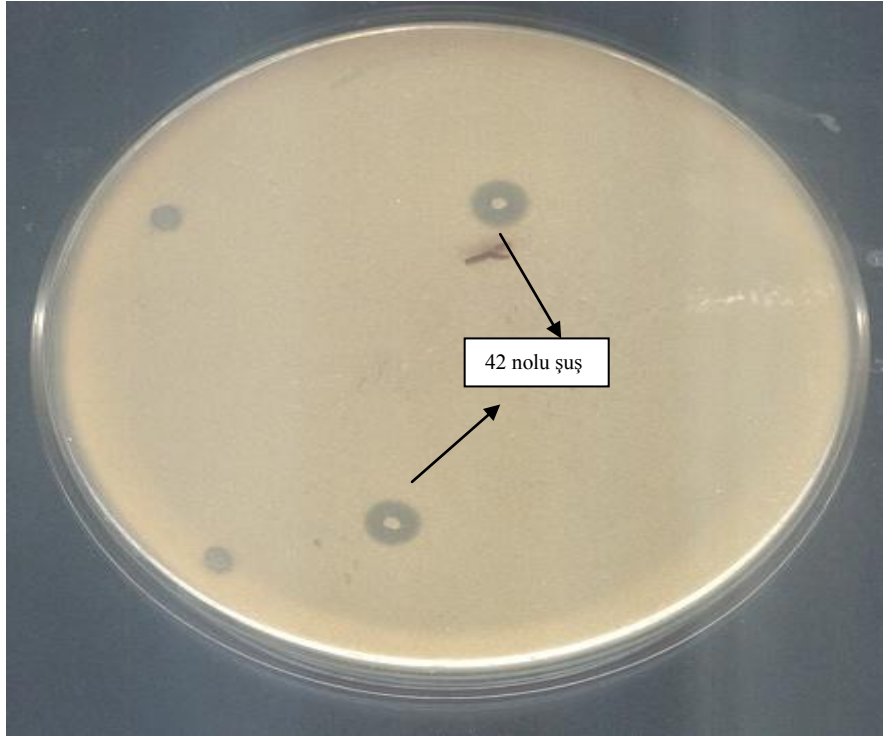
14-19-24-25-28-39-42) *M. luteus*'a karşı büyük zonlar oluşturdukları tespit edilmiştir.

Sıvı besiyerinde bakterilerin gelişimi sırasında oluşan asit de indikatör suş *M. luteus*'a karşı zon oluşturabilmektedir. Bu nedenle *M. luteus*'a karşı oluşan zonların asitlikten mi yoksa bakteriyosin üretiminden mi kaynaklandığını tespit etmek amacıyla kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun sonucunda 10 suşun (suş no: 3-4-5-7-8-9-14-19-25-39) oluşturduğu zonların asitlikten kaynaklandığı, 4 suşun (suş no: 9-24-28-42) oluşturduğu zonların ise bakteriyosin üretiminden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'de nokta ekim yöntemi ile oluşan zonlar gösterilmiştir. Şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de bakteriyosin üreten suşların oluşturduğu zonlar, Şekil 4.9 ve 4.10'da ise suşların asitlik nedeni ile *M. luteus*'a karşı oluşturdukları zonlar gösterilmiştir.

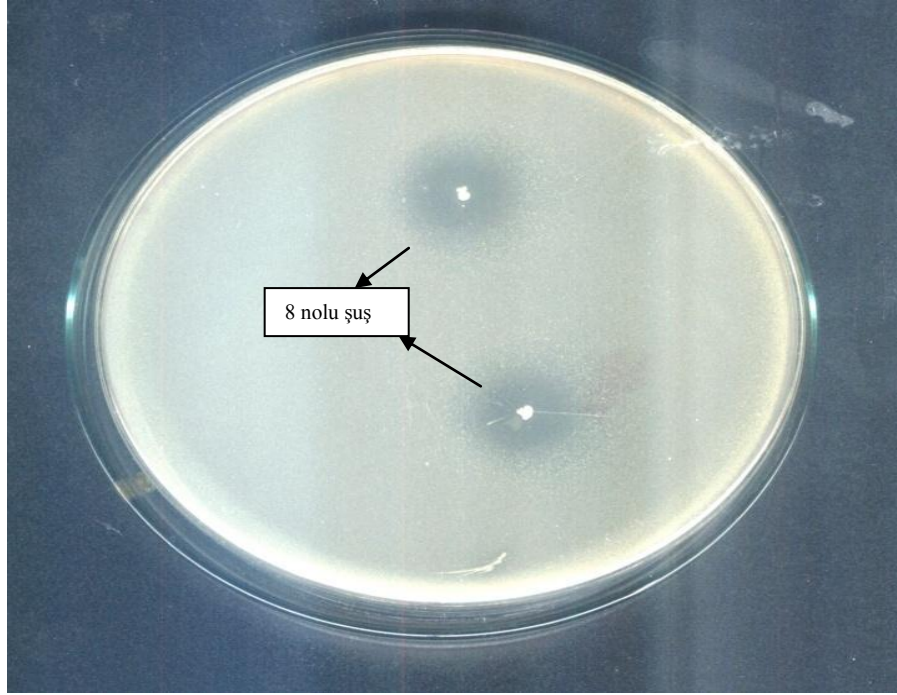
Bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanan suşlardan 3'ünün *Enterococcus durans*, 1'inin ise *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiştir. Bu suşların starter kültür olarak kullanılabilmesi için öncelikle tüm patojenite testlerinin yapılması ve potansiyel risklerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Gonzales ve ark. (2007), geleneksel bir İspanyol peyniri olan Genestoso peynirinden izole ettikleri ve tanımladıkları 395 izolattan 24'ünün indikatör suşlara karşı bakteriyosin aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu suşlardan 13'ünü *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 5'ini *E. faecium*, 2'ser tanesini *Leu. mesenteroides* ve *Lb. paracasei*, 1'er tanesini de *Leu. pseudomesenteroides* ve *Lb. plantarum* olarak tanımlamışlardır. Bir başka araştırmada; Casla ve ark. (1996), İspanya'da geleneksel peynirlerden ve çiğ keçi sütlerinden izole ettikleri 203 laktik asit bakterisinin antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlar ve yalnızca 2 *Lactococcus lactis*, 1 *Enterococcus faecalis* ve 1 *Lactobacillus curvatus* suşunun bakteriyosin benzeri maddeler ürettiğini belirlemişlerdir.



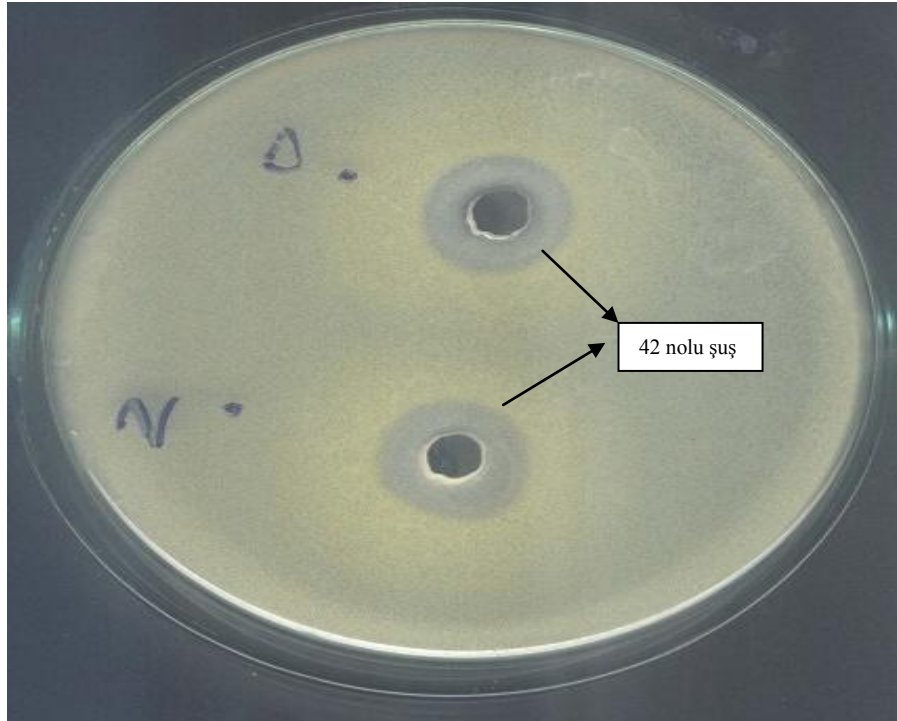
Şekil 4.2. 2 nolu suşun 18 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu zon



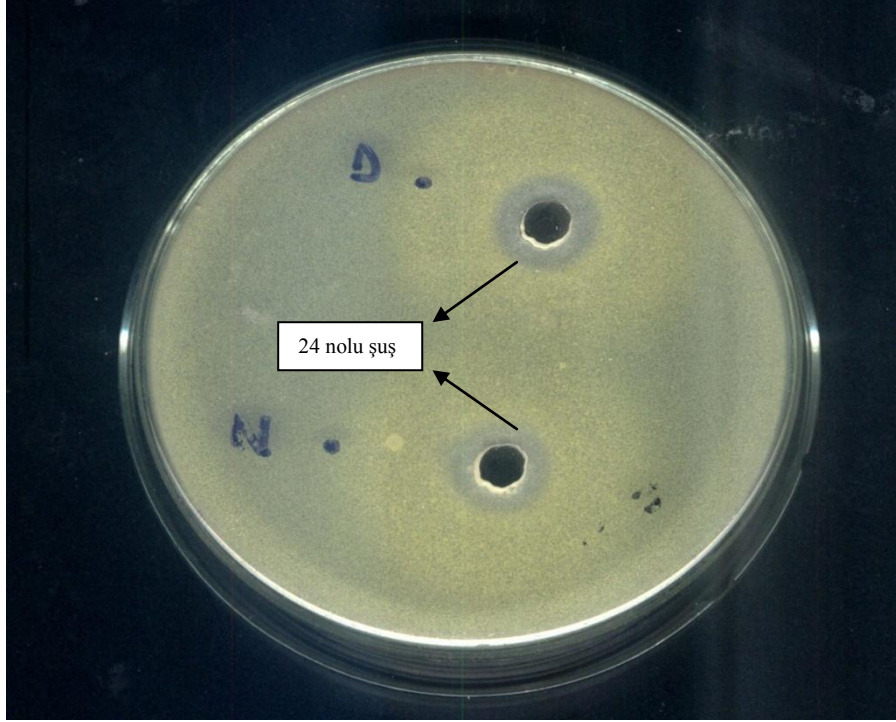
Şekil 4.3. 42. nolu suşun 18 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu zon



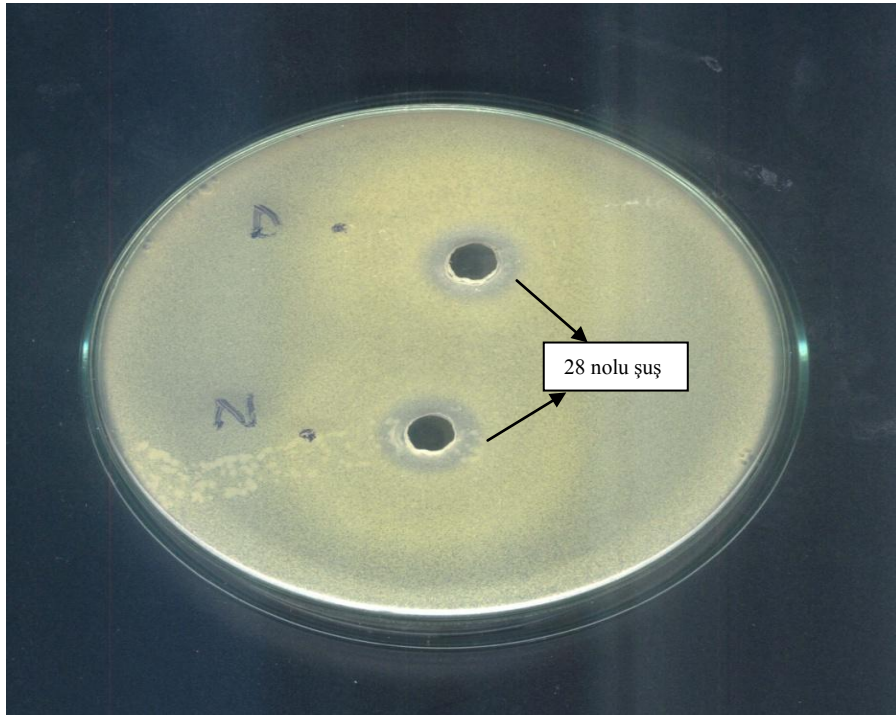
Şekil 4.4. 8 nolu şuşun 18 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu zon



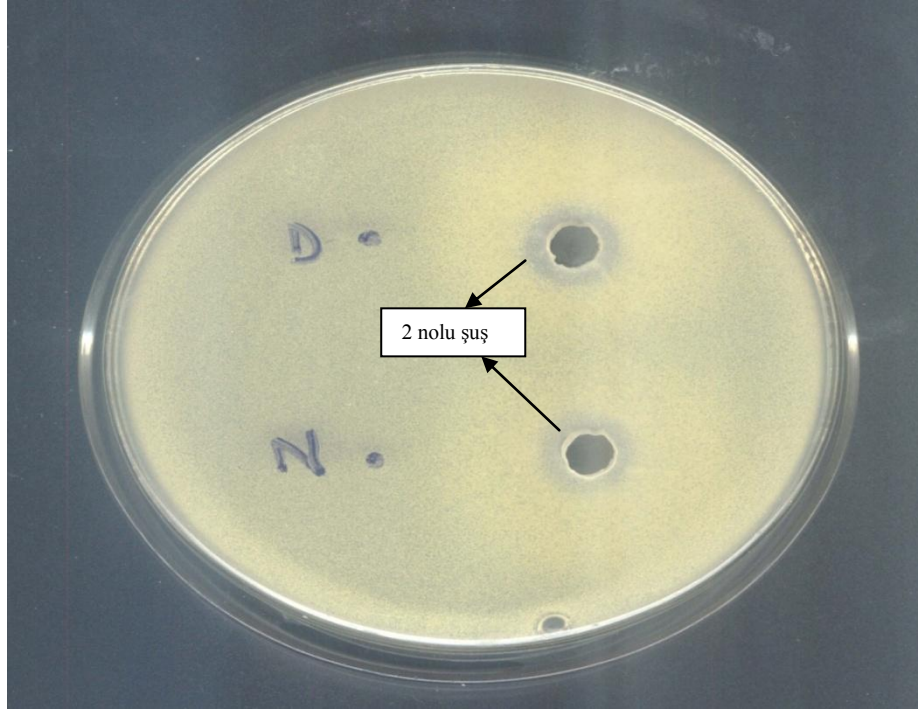
Şekil 4.5. 42 nolu şuş, D; direkt N; pH nötrlenmiş



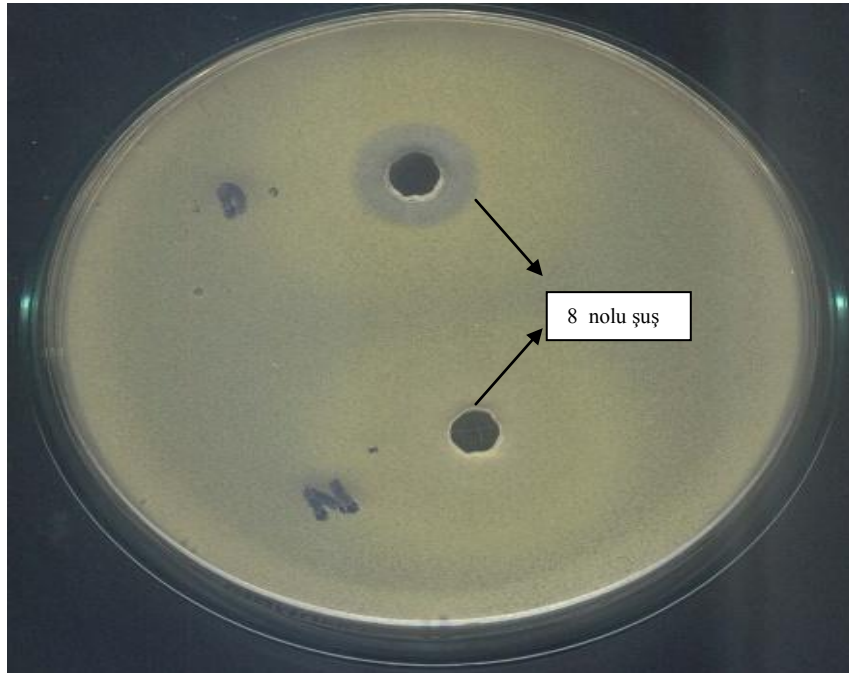
Şekil 4.6. 24 nolu şuş, D; direkt N; pH nötrlenmiş



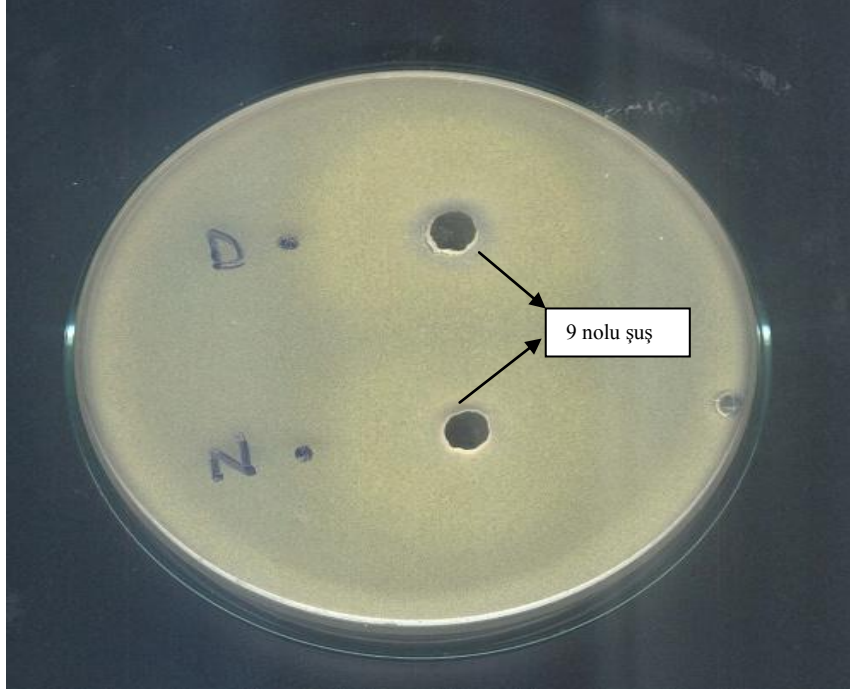
Şekil 4.7. 28 nolu şuş, D; direk N; pH nötrlenmiş



Şekil 4.8. 2 nolu şuş, D; direkt N; pH nötrlenmiş



Şekil 4.9. 8 nolu şuş, D; direkt N; pH nötrlenmiş



Şekil 4.10. 9 nolu şuş, D; direkt N; pH nötrlenmiş.

4.5. Deneme Peynirine Ait Araştırma Bulguları ve Tartışma

4.5.1. Urfa Peynirine İşlenen Koyun Sütünün ve Peynir Altı Suyunun (PAS) Kimyasal Kompozisyonu

Urfa peyniri yapımında kullanılan çiğ koyun sütlerinin kimyasal kompozisyonuna ilişkin değerler standart saptmaları ile birlikte Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7'den de görülebileceği gibi, denemede kullanılan çiğ koyun sütlerinin kimyasal kompozisyonu taze koyun sütlerinin genel kimyasal kompozisyonuna yakın bulunmuştur. Süt örneklerinin toplam kurumadde içeriği ortalama % 18.73, yağ içeriği % 7.12 olarak tespit edilmiştir. Bu iki değer de Türk Gıda Kodeksi Çiğ ve Isıl İşlem Görmüş Sütler Tebliği (Anonim, 2009) ile uyum içerisinde bulunmuştur. Benzer şekilde, çiğ süt örneklerinin protein ve kül değerleri de normal koyun sütüyle yakınlık gösterirken (sırasıyla % 5.3 ve % 0.55), pH değerlerinin normal koyun sütü değerlerine yakın olduğu saptanmıştır (pH 6.54).

Çizelge 4.7.Urfa peynirine işlenen çiğ koyun sütlerinin kimyasal kompozisyonu (n=2)

Kurumadde (%)	Protein (%)	Yağ (%)	Laktoz (%)	Kül (%)	pH	Titrasyon Asitliği (% L.A.)
18.73±0.18	5.55±0.16	7.18±0.19	5.45±0.21	0.55±0.03	6.54±0.02	0.252±0.07

Koyun peyniri üretimi sonucu elde edilen peynir altı sularına ait bazı kimyasal analiz değerleri standart hataları ile birlikte Çizelge 4.8' de verilmiştir.

Çizelge 4.8' den de görüleceği gibi peynir altı suyunun toplam kurumadde içeriği % 6.72 yağ içeriği de % 0.24 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, çiğ koyun sütünden üretilen Urfa peynirinden elde edilen peynir altı suyu bileşenleriyle yakınlık göstermektedir (Özer ve ark., 2002a).

Çizelge 4.8. Urfa peynirinden elde edilen PAS'ın bazı özellikleri (n=2)

Kurumadde (%)	Yağ (%)	pH	Titrasyon Asitliği (% L.A.)
6.72±0.06	0.24±0.03	6.33±0.02	0.156±0.09

4.5.2. Deneme Peynirinin Kimyasal Kompozisyonu

4.5.2.1. Kurumadde

Deneme peynirinde ve farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde depolama boyunca meydana gelen kurumadde değişimi Çizelge 4.9'da verilmiştir. Buna göre olgunlaşmanın birinci gününde kurumadde değeri % 46.96 iken olgunlaşmanın sonunda % 45.31 olduğu bulunmuştur. TS 13129 Urfa peyniri standardına göre kurumadde düzeyinin en az % 45 olması öngörülmektedir (Anonim, 2005). Depolama boyunca kurumaddede meydana gelen azalmanın depolama boyunca peptit bağlarının parçalanmasıyla yeni peptit bağlarının açığa çıkması ve düşük sıcaklıkta depolama ile bu bağların suyu absorbe etmeleri sonucu peynir kitlesinin nem içeriğinin artması ile açıklanabilir. Özer ve ark. (2002a), çığ koyun sütünden ürettikleri Urfa peynirinde toplam kurumadde değerinin depolama süresince azaldığını ve olgunlaşma sonunda % 43.80 olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka araştırmada Atasoy, (2004) inek, koyun ve keçi sütlerinden ürettiği geleneksel Urfa peynirlerinde depolama sonunda toplam kurumadde içeriğinin sırasıyla % 43.14, % 46.51 ve % 48.42 olduğunu belirlemiştir. Araştırmamızda elde edilen kurumadde değerinin diğer araştırmacılarla kısmen farklılık göstermesi peynir üretiminde kullanılan sütün bileşiminin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

4.5.2.2. Kurumaddede Yağ

Peynirlerde yağ içeriği ile kurumadde düzeyi arasında direkt bir ilişki bulunduğu en sağlıklı değerlendirme kurumadde içerisinde yağ oranının saptanması ile yapılmaktadır. Deneme peynirinde ve farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde depolama boyunca meydana gelen kurumadde de yağ değerleri değişimi Çizelge 4.9' da sunulmuştur. Çizelgeden de görüldüğü gibi depolama süresi sonunda deneme peynir örneğinin kurumaddede yağ

içeriğinde azalma gözlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu azalmanın depolama boyunca kurumadde düzeyinde meydana gelen azalmayla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Çağlar ve ark. (1996) piyasa örnekleri üzerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada geleneksel Urfa peynirlerinin ortalama kurumadde yağ içeriklerini % 47.46 olarak belirlemişlerdir. Özer ve ark. (2002a) ise koyun sütünden üretilen Urfa peynirlerinde kurumadde yağ değerlerinin depolama boyunca azaldığını ve olgunlaşmanın sonunda % 41.39 olduğunu saptamışlardır. Peynir örnekleri arasındaki farklılık üretimde kullanılan koyun sütü bileşiminin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.2.3. Kurumadede Tuz Değerleri

Deneme peynirinde ve farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde depolama boyunca kurumadede tuz değerlerinde meydana gelen değişim Çizelge 4.9' da sunulmuştur. Buna göre, deneme örneğinin kurumadde tuz içeriği olgunlaşma süresi boyunca artış göstermiştir ($p<0.05$). Olgunlaşma periyodunun başlangıcında kurumadde tuz değeri % 7.59 olarak bulunurken depolama sonunda ise % 10.65 olduğu belirlenmiştir. Tuz geçişinin olgunlaşmanın ilk günlerinde çok hızlı gerçekleştiği, sonrasında ise yavaşladığı belirlenmiştir. T.S. 13129'da salamura Urfa peynirin kurumadde tuz içeriğinin en yüksek % 15 olması öngörülmektedir (Anonim, 2005). Araştırmamızdaki peynir örneğinin tuz değeri 90 günlük depolama sonunda standartlarda öngörülen değeri aşmamıştır. Özer ve ark. (2002a) koyun sütünden üretilen Urfa peynirinde depolama sırasında kurumadede tuz değerinin sürekli arttığını ve olgun peynirlerde % 21.10 olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka araştırmada Atasoy (2004), inek, koyun ve keçi sütlerinden ürettiği geleneksel Urfa peynirlerinde depolama sonunda toplam kurumadede tuz içeriğini sırasıyla % 11.39, % 11.16 ve % 10.10 olarak bulunmuştur. Araştırmamızda elde ettiğimiz kurumadede tuz değerlerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumun peynir denememizde % 12'lik salamura kullanımından ve kurumaddenin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.2.4. pH

Deneme peynirinde ve farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde depolama boyunca pH değerlerinde meydana gelen değişim Çizelge 4.9' da sunulmuştur. Depolama süresi boyunca peynir örneğinde pH değerleri dalgalı bir değişim eğilimi göstermiştir ve depolama sürecinin pH üzerindeki etkisi $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Özer ve ark. (2002a) çiğ süttten üretilen 90 günlük Urfa peynirinin pH değerini 5.00 olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada, çiğ koyun sütünden üretilen Urfa peynirinde depolama boyunca pH değerinin 5.03 ile 5.14 arasında değiştiğini belirtmiştir (Atasoy, 2004). Araştırmamızda ise peynir örneğindeki pH değerlerinin 5.16 ile 5.30 arasında değiştiği saptanmıştır. Diğer araştırmacıların peynir örneklerinin pH değerlerinin daha düşük seyretmesi çiğ sütün kompleks mikroflorasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.2.5. Toplam Asitlik

Deneme peynirinde ve farklı araştırmacılar tarafından geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde depolama boyunca toplam asitlikte meydana gelen değişim Çizelge 4.9'da verilmiştir. Örneklerin toplam asitlik değerleri olgunlaşma süresince artan ve azalan bir eğilim göstermiştir. Toplam asitliğin depolamanın 30. gününe kadar arttığı daha sonra düşüş eğilimine girdiği belirlenmiştir. Olgunlaşmanın ileri aşamalarında serbest amino asit deaminasyonuna bağlı olarak açığa çıkan amonyanın varlığı ve mayaların laktik asidi katabolize etmeleri nedeniyle titrasyon asitliğinde azalma gözlenmektedir (Polychroniadou, 1994; Grappin ve Beuvier, 1997). Depolamanın 1. gününde toplam asitlik değeri % 0.38 iken depolamanın 90. gününde % 0.44'e kadar yükseldiği saptanmıştır. Özer ve ark. (2002a) çiğ koyun sütünden üretilen Urfa peynirlerinde toplam asitliğin depolamanın başlangıcında % 0.35 iken depolamanın 90. gününde % 0.49'a kadar yükseldiğini belirlemişlerdir. Bir başka araştırmada; Atasoy (2004), farklı tür sütlerden farklı starter kültür

Çizelge 4.9. Depolama süresince deneme peynirinin kimyasal bileşimlerinde meydana gelen değişimler.

	D.S.	pH	Toplam Asitlik (% L.A.)	Toplam Kurumadde	Kurumadede Tuz	Kurumadede yağ	Toplam Azot	WSN	Olgunlaşma İndeksi
Deneme Peyniri (Koyun sütü)	1	5.16±0.4 ^a	0.3874±0.122 ^a	46.96 ±0.42 ^a	7.59 ±0.21 ^a	47.65±0.10 ^{ab}	3.26±0.31 ^a	0.25±0.02 ^a	7.66±0.13 ^a
	15	5.29±0.3 ^{ab}	0.3948±0.180 ^a	46.69 ± 0.75 ^a	8.66 ±0.72 ^b	47.49±0.41 ^a	3.07±0.20 ^b	0.29±0.015 ^{ab}	9.44±0.14 ^b
	30	5.24±0.3 ^b	0.4774±0.790 ^c	45.81 ±0.12 ^{ab}	10.55±0.23 ^c	47.49±0.15 ^a	2.94±0.20 ^c	0.32±0.008 ^{bc}	10.88±0.23 ^c
	60	5.32±0.2 ^b	0.4648±0.760 ^{bc}	45.41±0.12 ^b	10.92±0.11 ^c	47.30±0.54 ^a	2.61±0.40 ^d	0.38±0.016 ^c	14.55±0.18 ^d
	90	5.30±0.2 ^b	0.44480.590 ^b	45.31±0.16 ^b	10.65±0.13 ^c	47.00±0.13 ^a	2.54±0.30 ^d	0.45±0.02 ^d	17.71±0.52 ^e

* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0.05 düzeyinde farklıdır.

kombinasyonları ile üretilmiş pastörize Urfa peynirlerde toplam asitlik değerlerinin inek, koyun ve keçi peynirlerinde depolama süresince büyük dalgalanmalar gösterdiğini bildirmiştir.

4.5.2.6. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayısı

Depolama süresince deneme peynirinde ve geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinde toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayılarında meydana gelen değişim Çizelge 4.10'da verilmiştir. Buna göre; peynir örneğinde depolama süresince TAMB sayılarında düzenli bir azalma kaydedilmiştir. Depolama sürecinin başlangıcında peynir örneğinin TAMB sayısı 8.62 log kob/g olarak saptanırken depolamanın 90. gününde 8.00 log kob/ g'a kadar düştüğü belirlenmiştir. Depolama boyunca TAMB sayılarında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Denememizde elde edilen TAMB sayım sonuçları önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile yakınlık göstermektedir. Şahan ve ark. (1998) taze Urfa peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında TAMB sayısının ortalama 7.88 log kob/g olduğunu belirlemişlerdir. Özer ve ark. (2000) çiğ ve pastörize süttten üretilen Urfa peynirlerinin TAMB sayılarının 90 günlük depolama süresi sonunda sırasıyla 8.11 log kob/g ve 5.36 log kob/g olduğunu saptamışlardır. Bir başka araştırmada koyun ve inek sütlerinden üretilen pastörize Urfa peynirlerinde TAMB sayılarının depolama süresi sonunda sırasıyla 8.04 log kob/g ve 8.11 log kob/g düzeyinde olduğunu bildirilmiştir (Özer ve ark., 2002b).

Çizelge 4.10. Depolama süresince deneme peynirindeki Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri(TAMB) sayıları (log kob/g)

	Depolama Süresi	Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) (log kob/g)
Deneme Peyniri	1	8.62±0.179 ^c
	15	8.47±0.234 ^{bc}
	30	8.27±0.115 ^{abc}
	60	8.14±0.221 ^{ab}
	90	8.00±0.324 ^a

* Farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden $p<0.05$ düzeyinde farklıdır.

4.5.2.7. Proteoliz

Proteoliz; peynir olgunlaşması sırasında meydana gelen en karmaşık biyokimyasal olaydır ve son ürünün tat-aroma ve yapısal özelliklerinin oluşmasında birincil öneme sahiptir (Shiufe ve ark., 2010). Kazeinlerin birincil hidrolizasyonu, kalıntı pıhtılaştırıcı enzimler ve düşük düzeyde olmakla birlikte plazminler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Hidrolizasyon sonunda, büyük ve orta molekül ağırlığına sahip peptidler, pıhtıda tutulan pıhtılaştırıcı enzimler ile starter ve starter olmayan laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen enzimler aracılığı ile küçük molekül ağırlıklı peptidler ve aminoasitlere kadar parçalanmaktadır (Sousa ve ark., 2001). Peynirde proteolizin belirlenmesinde toplam azot ve azot fraksiyonlarında meydana gelen değişimlerin değişik analitik yöntemler ile izlenmesinden yararlanılmaktadır.

4.5.2.7.1. Toplam azot (TN) değişimi

Peynirlerde toplam azot, hem protein içeriklerinin hem de proteoliz düzeyinin belirlenmesinde yararlanılan önemli bir parametredir (Fox, 1989). Deneme peynirinin toplam azot içeriğinde 90 günlük depolama sürecinde sürekli bir azalma meydana gelmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.9). Olgunlaşmanın başlangıcında (1. gün) toplam azot içeriği % 3.26 iken, bu değer 90 gün sonunda % 2.54'e düşmüştür. Depolama sürecinde peynir florasının metabolik aktivitelerine bağlı olarak toplam azot içeriği azalmakta, buna karşın düşük molekül ağırlıklı azot fraksiyonlarının konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir (Fox, 1989). Bu süreçte, bazı azot fraksiyonları salamuraya geçmekte ve salamura ortamında çözünen azot fraksiyonlarının konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir (Hayaloğlu ve ark.,

2002; Karakuş ve Alperden, 1992). Salamurada olgunlaştırılan peynirlerde (Feta, Domiati, Beyaz peynir vb.) depolama süresince proteoliz devam etmekte ve suda çözünen azot fraksiyonları peynirin serum fazı ile ozmotik denge halinde olan salamuraya geçmektedir. Urfa peyniri geleneksel olarak yüksek tuz içeren salamura konsantrasyonunda olgunlaştırıldığından toplam azot degradasyonu beyaz peynire oranla daha yavaş seyretmektedir. Bilindiği gibi, yüksek tuz içeren salamura peynirlerde doğal laktik flora ve/veya starter bakterilerin ozmotik dengesini bozmakta (Fox, 1987), hem de bu mikroorganizmalar tarafından sentezlenen proteolitik enzimler üzerinde kısmi inhibisyon etkisi yaratmaktadır (Banks, 1992; Katsiari ve ark., 2000). Nitekim; Özer ve ark. (2002b) çiğ sütten ürettikleri Urfa peynirlerini % 10, % 12.5, % 15 ve % 17.5 oranlarında tuz içeren salamuralarda olgunlaştırılan çiğ Urfa peynirlerinde, tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak toplam azot içeriğindeki değişimin yavaşladığını saptamışlardır. Özer ve ark. (2002a), çiğ koyun sütünden üretilen Urfa peynirlerinde depolama süresi boyunca toplam azot değerlerinin azaldığını ve olgunlaşmanın sonunda % 2.36'ya düştüğünü, inek sütünden üretilen Urfa peynirlerinde ise proteolizin biraz daha hızlı ilerlediğini belirlemiştir. Benzer sonuçlar; mezofilik *Lactococcus spp.* kültürleri kullanarak koyun sütünden Urfa peyniri üreten Atasoy (2004) ile Şanlıurfa piyasasında satılan geleneksel Urfa peynirlerinin kimyasal kompozisyonunu araştıran Atasoy ve Akın (2004) tarafından da bulunmuştur. Deneme peynirlerinin toplam azot değerlerinde meydana gelen azalma oranının çiğ koyun ya da inek sütünden üretilen peynirlere oranla daha sınırlı kalmasının, çiğ sütün zengin mikrobiyel florasının oluşturduğu metabolik aktivitenin, deneme peynirlerinin üretiminde kullanılan laktik bakteri suşlarının proteolitik aktivitesinden daha yüksek olmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

4.5.2.7.2. Suda çözünen azot (WSN) değişimi

Toplam azot değerlerindeki değişime paralel olarak, deneme peynirlerinin suda çözünen azot (WSN) değerlerinde 90 günlük olgunlaşma süreci boyunca sürekli bir artış gözlenmiştir. Depolama sürecinin başlangıcında WSN değeri % 0.25 iken bu değer 90 gün sonunda % 0.45'e ulaşmıştır. Depolama süresinin WSN değerleri

üzerindeki etkisi $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Depolama süresi boyunca WSN değerinde meydana gelen değişimin nedeni depolama sırasında proteinlerin bir bölümünün hidrolize olarak suda eriyen bileşikler haline dönüşmesidir (Fox, 1989). Özer ve ark. (2002a) ve Özer ve ark. (2000) çiğ koyun ve inek sütünden yapılan ve haşlama uygulanmayan Urfa peynirlerinde WSN değerlerinin olgunlaşma süresince arttığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, koyun sütünden üretilen Urfa peynirlerinde WSN değerlerinin depolamanın tüm evrelerinde daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Piyasada satılan Urfa peynirlerinin proteoliz düzeylerinin araştırıldığı bir başka araştırmada WSN değerlerinin % 0.55 ile % 1.80 gibi geniş bir aralıkta değiştiği saptanmıştır (Çağlar ve ark., 1996). Atasoy (1999) ise, 44 ticari peynir örneğinin ortalama WSN değerinin % 0.254 olduğunu belirlemiştir. Deneme peynirinin 90. günündeki WSN (% 0.45) değerinin diğer araştırmalardan daha düşük olarak bulunmasına pastörizasyon işlemi sonucu çiğ süt florasının inhibe olması ve kullanılan starter kültür türünün düşük proteolitik aktivite göstermesi neden olarak gösterilebilir. Özellikle çiğ süt florasında baskın olarak bulunan ve bu çalışma kapsamında da en baskın tür olarak belirlediğimiz *Enterococcus* spp. türü bakterilerin proteoliz üzerine önemli etkileri olduğu düşünülmektedir.

4.5.2.7.3. Olgunlaşma katsayısı değişimi (WSN/Toplam N x 100)

Olgunlaşma katsayısı, peynir teknolojisinde olgunlaşmanın izlenmesinde en yaygın olarak kullanılan parametrelerden bir tanesidir. Suda çözünen azotun toplam azota oranı olarak ifade edilen olgunlaşma katsayısından peynirlerin olgunluk derecelerine göre sınıflandırılmasında yararlanılmaktadır. Deneme peynirine ait olgunlaşma katsayısı değerleri diğer araştırmacıların bulguları ile birlikte karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.9.'da verilmektedir. Buna göre; depolama süresi boyunca olgunlaşma katsayısı artış göstermiş ve olgunlaşmanın başlangıcında % 7.66 olan olgunlaşma katsayısı değeri, 90 gün sonunda % 17.71'e yükselmiştir. Bu değerler; çiğ ya da ısıtılmış işlem görmüş sütlerden üretilen Urfa peynirleri için literatürde yer alan değerlerden biraz daha düşük bulunmuştur. Özer ve ark. (2000) hem Urfa peyniri üretiminde kullanılan süte ısıtılmış işlem uygulamasının, hem de salamurada depolama öncesi geleneksel olarak uygulanan haşlama işleminin olgunlaşma

katsayısını etkilediğini belirlemiştir. Buna göre; süte uygulanan ısı işlem ile olgunlaşma katsayısı artarken (olgunlaşma daha hızlı gelişirken) haşlama işlemi ile olgunlaşma katsayısı artışı son derece sınırlı gerçekleşmektedir. Koyun sütünden üretilen Urfa peynirlerinde olgunlaşma katsayısı değerleri inek sütünden üretilen peynirlere oranla daha yüksek bulunmuştur (Özer ve ark., 2002a). Piyasada satılan Urfa peynirleri üzerine yürütülen iki ayrı çalışmada da olgunlaşma katsayılarının % 2.26-% 9.65 (n=14) (Çağlar ve ark., 1996) ve % 9.37-% 9.76 (n=30) (Yetişmeyen ve Yıldız, 2001) arasında değiştiği saptanmıştır. Atasoy (1999) ise 44 adet piyasa örneğinin ortalama olgunlaşma katsayısı değerini % 9.55 olarak belirlemiştir.

4.5.2.7.4. Deneme peynirinin elektroforetik özellikleri

Peynir proteinleri proteolitik enzimlerin aktiviteleri sonucunda büyük ya da küçük molekül ağırlığına sahip peptitler, amino asitler ve organik moleküllere parçalanmaktadır. Bu şekilde oluşan parçalanma ürünlerinin tipi ve konsantrasyonu peynir olgunlaşmasının düzeyi hakkında bilgi vermektedir (Fox, 1989). Parçalanma ürünlerinin izlenmesinde bir çok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler içerisinde kazein fraksiyonlarının konumlandığı bantları en belirgin şekilde gösteren ve fraksiyonlar arası ayrımı sağlayan tekniklerden biride üre jel elektroforez tekniğidir.

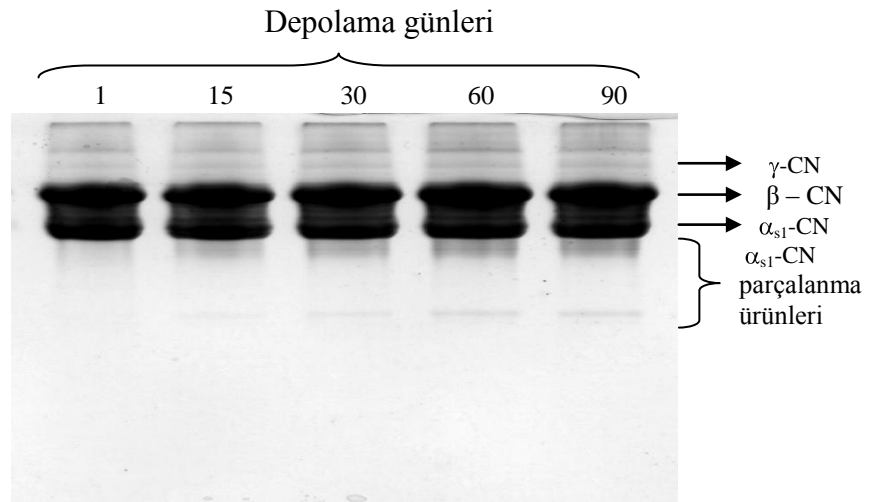
Deneme peynirinde depolama süresince proteolitik parçalanma düzeylerini gösteren elektroforetogramları Şekil 4.11’de sunulmuştur. Deneme peynirinin pH 4.6’da çözünmeyen fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde 60 ve 90 günlük peynir örneğinde α_{s1} kazeini (α_{s1} -CN) temsil eden bantların yoğunluğunda sınırlı bir azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir. Buna karşın α_{s1} -CN parçalanma ürünlerini temsil eden ($M_w < 10.000$ Dalton) bir bant dizisi ile karşılaşmıştır. α_{s1} -CN’de belirlenen hidrolizasyonun β -CN’deki hidrolizasyondan bir miktar daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer durum; koyun sütünden üretilen farklı tip peynirler için de geçerlidir (Katsiari, 2000; Pavia ve ark., 2000). Bu durum, pıhtıda tutulan kalıntı rennet aktivitesinin plazmin aktivitesinden daha yüksek olduğunun işareti olarak düşünülmüştür (Grappin ve ark., 1985; McSweeney ve Sousa, 2000). Özellikle yüksek salamura tuz konsantrasyonunun plazmin aktivitesi

üzerindeki olumsuz etkisinin β -CN yıkımını yavaşlattığı düşünülmektedir (Fallico ve ark., 2004). Özer ve ark. (2002b)'nin geleneksel olarak üretilen ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip salamurada (% 17.5w/v) olgunlaştırılan Urfa peynirlerine ait elektroforetogramlar deneme peyniri ile benzerlik göstermektedir. Atasoy, (2004), yüksek tuz varlığı nedeniyle geleneksel Urfa peynirlerinde α_{s1} -CN'nin β -CN'den daha fazla hidrolizasyona uğradığını belirlemiştir. Bir başka çalışmada ise geleneksel olarak üretilen ve piyasada satışa sunulan Urfa peynirlerindeki elektroforez profilinin kısmen deneme peyniri ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.12) (Hayaloğlu, 2009).

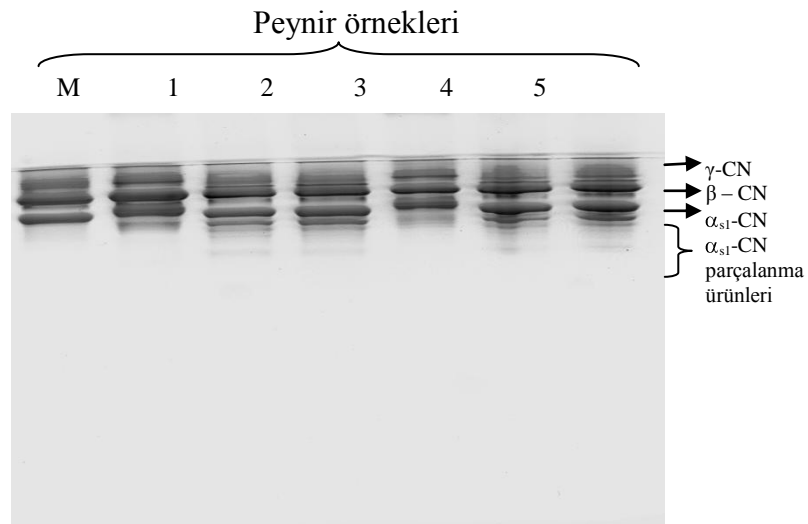
Proteolizin derinliğinin daha net anlaşılabilmesi için suda çözünen azot fraksiyonlarının (ağırlıklı olarak hidrofilik aminoasitleri içermektedir) ve %70 etanolde çözünmeyen fraksiyonlarının elektroforetik olarak analiz edilmesi gerekmektedir. Depolama süresince deneme peynirinde suda çözünen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları Şekil 4.13'de verilmiştir. Depolama süresince düşük molekül ağırlıklı peptidler ve aminoasitlerin konsantrasyonunda azalma kaydedilmiştir. Özellikle β -I-CN, α_{s1} -CN (f102-f199) ve α_{s1} -I-CN (f24-f199)'i temsil eden bantlarda azalma dikkat çekmiştir. Buna karşın; γ_1 -CN, γ_2 -CN ve γ_3 -CN'i temsil eden bantların yoğunluklarında belirgin bir değişim göze çarpmamıştır. Bu durum, peynirde plazmin aktivitesinin çok sınırlı olduğunu göstermektedir. Depolama süresince suda çözünen azot fraksiyonların elektroforez profillerinde meydana gelen değişim, suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC peptid analiz sonuçları ile de benzerlik göstermektedir (Bkz. Bölüm 4.5.2.7.5.).

%70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonları çok düşük moleküler ağırlığa sahip hidrofobik amino asitleri içermektedir. Depolama süresince peynir örneğinin %70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları Şekil 4.14'de verilmiştir. Olgunlaşma süresince kazein fraksiyonlarının bant yoğunluğunda azalma olduğu ancak, ileri proteolizin bir belirteci olan düşük molekül ağırlıklı peptidleri temsil eden bir bant dizisinin belirgin şekilde oluşmadığı saptanmıştır.

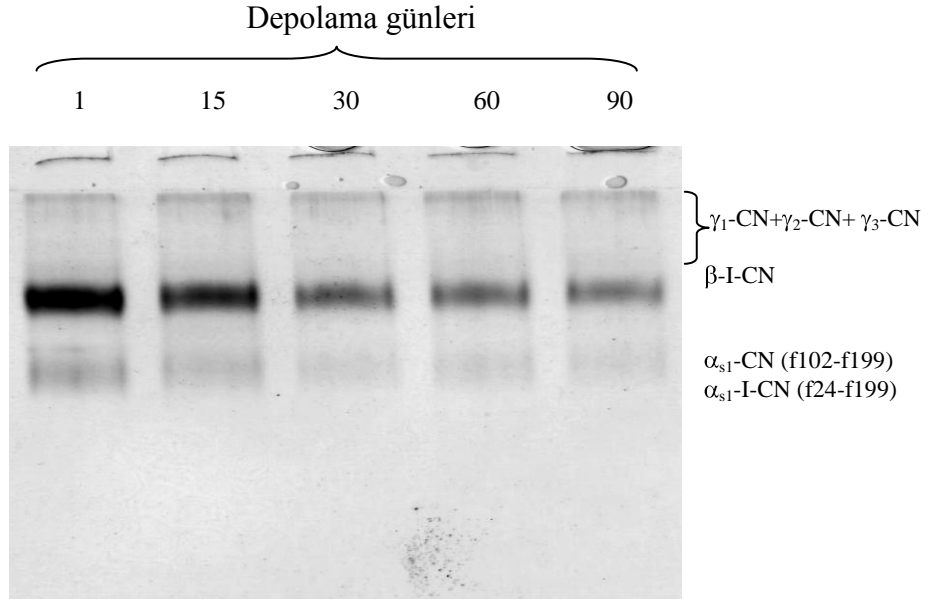
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda deneme peynirimizin proteoliz düzeyinin geleneksel olarak üretilen Urfa peyniri ile benzerlik gösterdiği; ancak klasik salamura beyaz peynirlere oranla daha düşük bir olgunlaşma profilinin oluştuğu anlaşılmıştır. Çiğ süttten üretilen Urfa peynirinin yüksek tuz konsantrasyonuna sahip salamura içerisinde depolanması proteoliz düzeyinin yavaşlamasına neden olmaktadır (Özer ve ark., 2002b). Buradan çıkan sonuçlar doğrultusunda yüksek proteoliz geleneksel Urfa peynirlerinde beklenen bir sonuç değildir.



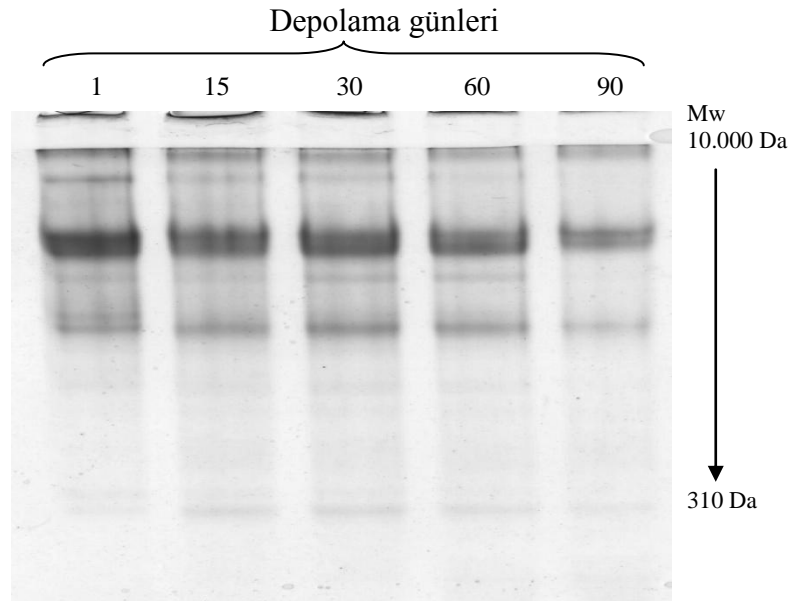
Şekil 4.11. Depolama süresince pH 4.6 çözünmeyen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları



Şekil 4.12. Piyasada satışa sunulmuş geleneksel olgun Urfa peynirlerine ait elektroforetogram (Olgunlaşma düzeyi bilinmemektedir) (Hayaloğlu, 2009)



Şekil 4.13. Depolama süresince deneme peynirinin suda çözünen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları



Şekil 4.14. Depolama süresince deneme peynirinin % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları

4.5.2.7.5. Deneme peynirinin peptid profili

4.5.2.7.5.1. Suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profili

Ters-faz yüksek performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC), olgunlaşma esnasında proteolitik değişimlerin özellikle de hidrofobik ve hidrofilik peptid ayrışmasının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir (Agboola ve ark., 2004). Peynirin olgunlaşma fazında, farklı starter kültür kullanımı, farklı üretim teknikleri, sıcaklık ve enzim uygulamaları RP-HPLC peptid profillerinde önemli farklılıklara neden olmaktadır (Hayaloğlu ve ark., 2005). Bu farklılıktan yararlanılarak RP-HPLC peptid profili peynir olgunlaşma derecesinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Moatsou ve ark., 2001; Hayaloğlu ve ark., 2004,2005).

Peynir ekstraktlarının RP-HPLC kromatogramlarının farklı molekül ağırlığındaki peptidlerin dizilimini gösterdiği ve peynirlerin peptid konsantrasyonları arasındaki farklılığı belirgin bir şekilde ortaya koyduğu bildirilmektedir (McSweeney ve Fox, 1997). Peynirde olgunlaşma sürecinde açığa çıkan peptidleri RP-HPLC tekniği ile ayırmanın mekanizması, çözülmüş moleküllerin ters adsorpsiyon/desorpsiyonuna dayanmakta olup, sabit fazın hidrofobisite derecesine göre değiştiğinden, daha az hidrofobik olan moleküller ilk önce pik vermekte, bunları hidrofobisite özellikleri artan moleküller izlemektedir (Pripp ve ark., 1999; Pavia ve ark., 2000; Hayoğlu ve ark., 2004; Hesari ve ark., 2006).

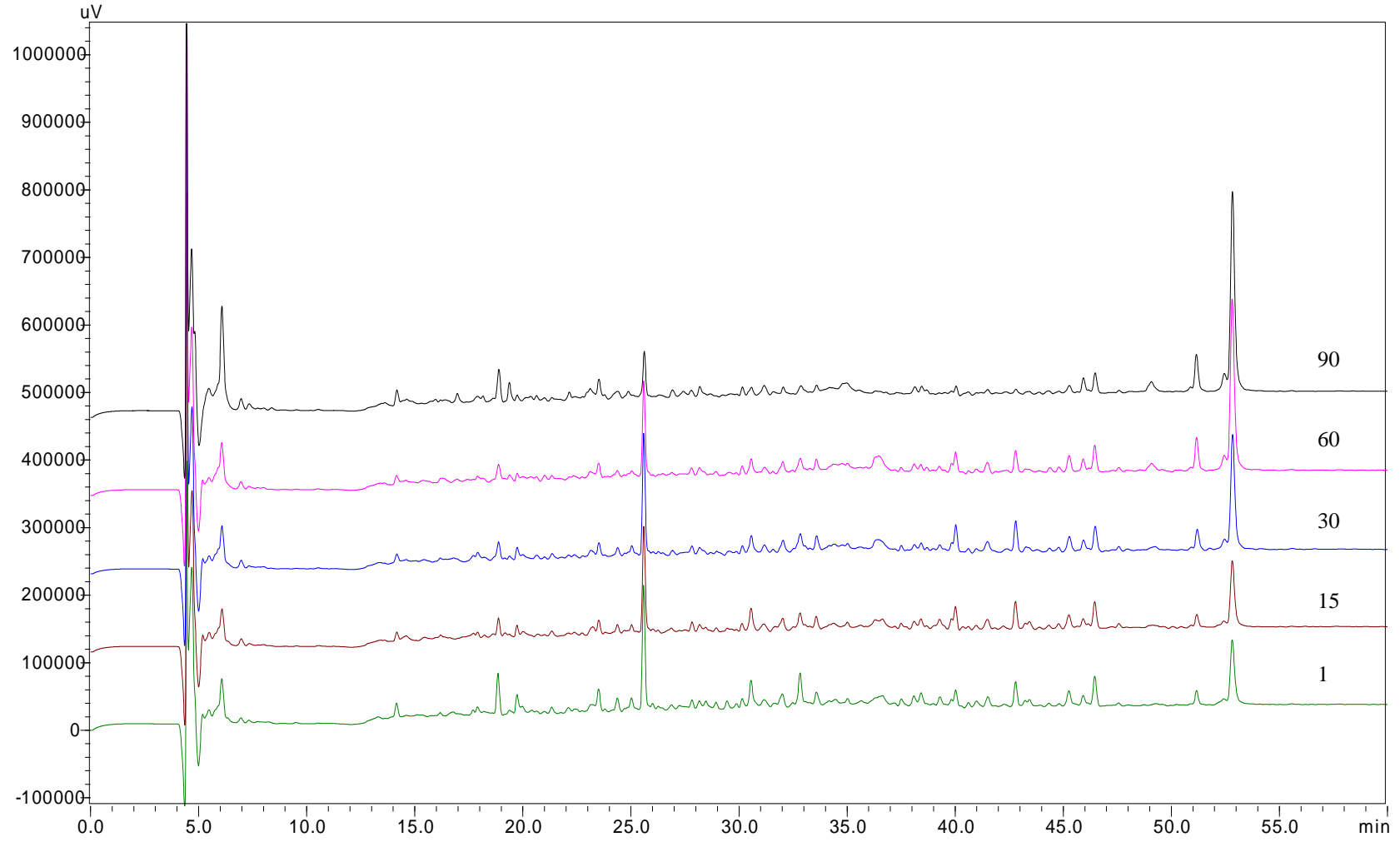
Deneme peynirinin depolama süresince suda çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profilleri Şekil 4.15’de verilmiştir. Depolama süresince farklı alıkonma zamanlarında beliren pikler farklı molekül ağırlıklı peptitlerin varlığını göstermektedir. Daha erken alıkonma zamanında oluşan pikler hidrofilik özellik gösterirken, daha geç alıkonma zamanında oluşan pikler ise hidrofobik özellik gösteren peptitler olarak değerlendirilmiştir. Depolama süresince peynir örneğinde aynı alıkonma zamanlarında minör ve majör pikler belirirken, olgunlaşma süresince piklerin konsantrasyonlarında artma ve azalmalar gözlenmiştir. 6. dakikada gelen pik konsantrasyonunun depolama süresince artış gösterdiği ve 90 günlük peynir

örneğinde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. 26. dakikada belirlenen pik konsantrasyonunda depolama süresince düzenli bir azalma belirlenmiştir. Buna karşın alıkonma zamanının 48. 51. ve 53. dakikalarında belirlenen piklerde depolama süresince pik konsantrasyonunda düzenli bir artış meydana gelmiştir. Erken alıkonma zamanlarında gözlenen pikler amino asitleri ve küçük peptitleri (moleküler ağırlığı <1.5kDa) göstermektedir (Lemieux ve Simard, 1992). Depolama süresince farklı alıkonma zamanlarında gözlenen piklerin konsantrasyonunda meydana gelen değişim peynirlerde meydana gelen proteolizin ilerlediğini göstermektedir. Deneme peynirinin suda çözünen azot fraksiyonlarının, RP-HPLC alıkonma zamanlarını ve pik konsantrasyonlarını değerlendirdiğimizde hem hidrofilik hem de hidrofobik özellik gösteren peptidlerin oranının depolama süresince arttığı saptanmıştır. De Llano ve ark. (1996), Afuega'l Pitu peynirlerinde suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profillerini incelediklerinde hidrofilik ve hidrofobik peptidlerin olgunlaşma boyunca artış gösterdiğini bununla birlikte bu artışın olgunlaşmanın sonuna doğru hidrofilik peptidlerin hidrofobiklerden daha çok artış gösterdiğini belirlemişlerdir.

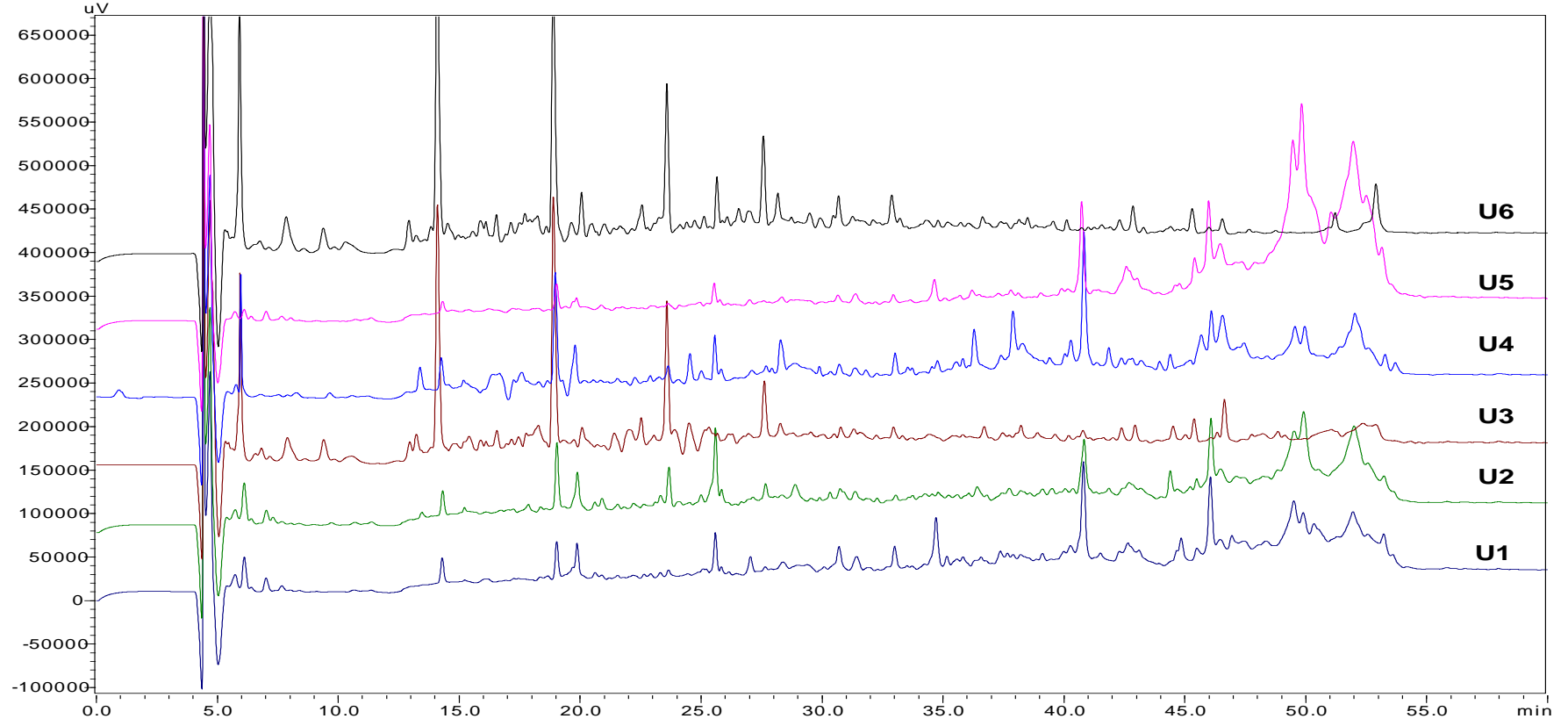
Hayaloğlu, (2009), geleneksel olarak piyasada satılan Urfa peynirlerinin suda çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC piklerini incelediğinde peynir örnekleri (U1-U6) arasında belirgin farklılıklar olduğunu belirlemiştir (Şekil 4.17). U1, U2, U4 ve U5 örneklerinde erken alıkonma zamanlarında (hidrofilik) belirlenen piklerin konsantrasyonu ileri alıkonma zamanlarında (hidrofobik) belirlenen piklerin konsantrasyonundan daha düşük olduğunu belirlemiştir. Buna karşın U3 ve U6 örneklerinde erken alıkonma zamanlarında beliren pik konsantrasyonu ileri alıkonma zamanlarında daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Piyasa örnekleri ile deneme peynirimizi karşılaştırdığımızda pik konsantrasyonları arasında benzerlik (U5, U2 örneği) ve farklılık (U6) gösteren örnekler olduğu belirlenmiştir. Geleneksel olarak üretilen piyasa örneklerinde gözlenen pik konsantrasyonları deneme peynirimizden daha yüksek bulunmuştur. Urfa peynirlerinin peptit profillerinde ve proteoliz düzeyinde standart bir dağılımın olmadığı, bu durumun farklı türde ve kalitede hammadde kullanımını ile farklı işleme, depolama koşulları ve olgunlaşma sürelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte özellikle çiğ süttün

kompleks mikroflorasının sütün aminopeptidaz aktivitesinde artışa neden olduğu da düşünülmektedir. Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir (Garde ve ark., 2002).

Fallico ve ark. (2006), uzun süreli olgunlaştırılan (10 ay) Enesse peynirlerinde RP-HPLC analizi sonucu olgunlaşma periyodunun sonuna doğru hidrofobik özellikteki peptit miktarının azaldığını erken alıkonma zamanlarında belirlenen piklerin (hidrofilik) konsantrasyonunun arttığını belirlemiştir. Yine aynı araştırmacılar, çiğ ve pastörize sütlerden üretilen Enesse peynirlerinin RP-HPLC profilleri karşılaştırıldığında çiğ süttten üretilen peynirlerde erken alıkonma zamanlarında gözlenen piklerin konsantrasyonunun pastörize süttten kültür katılarak üretilen peynirlerden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka araştırmada Albenzio ve ark. (2001), pastörize ve çiğ süttten üretilen Canestrato Pugliese peynirlerinin RP-HPLC profillerinde büyük farklılıkların bulunduğunu belirlemiştir. Buna karşın Gomez ve ark. (1997) ve Trujillo ve ark. (2002) hem pastörize hem de çiğ süttten üretilen Hispanico ve yarı-sert keçi peynirlerin suda- çözünen azot fraksiyonlarında hem hidrofilik hem de hidrofobik peptit konsantrasyonlarının aynı olduğunu belirlemişlerdir. Bir diğer araştırmada Lau ve ark. (1991) ve McSweeney ve ark. (1993) pastörize ve çiğ süttten üretilen Cheddar peynirlerinde pastörize süttten üretilen peynirlerin hidrofobik peptit konsantrasyonunun hidrofilik peptitlerden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu farklılığın çiğ sütün kompleks mikroflorası ve starter olamayan laktik asit bakterilerinin aminopeptidaz aktivitesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.15. Deneme peynirinin depolama süresince suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler

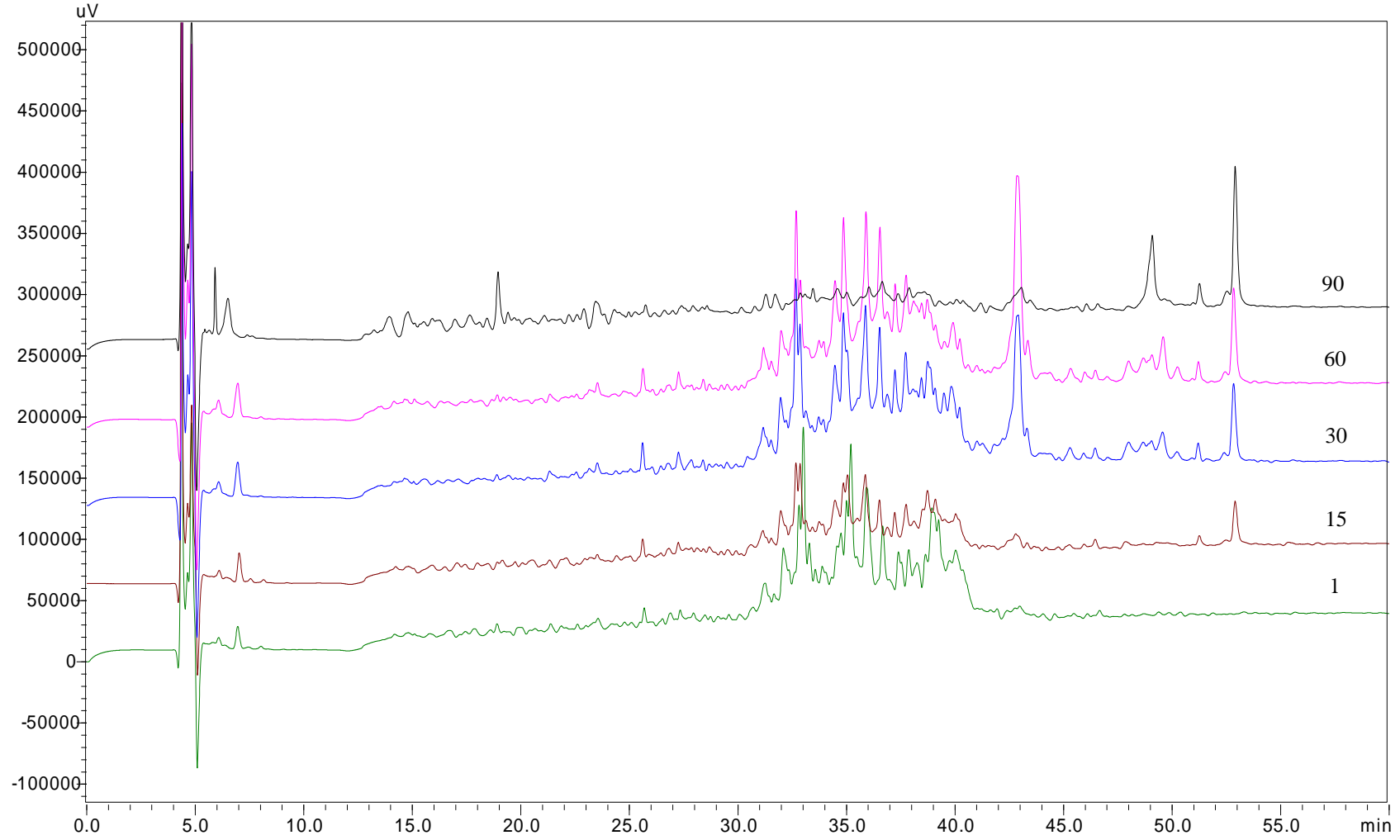


Şekil 4.16. Piyasada satılan geleneksel Urfa peynirlerinin suda çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler (Hayaloğlu,2009)

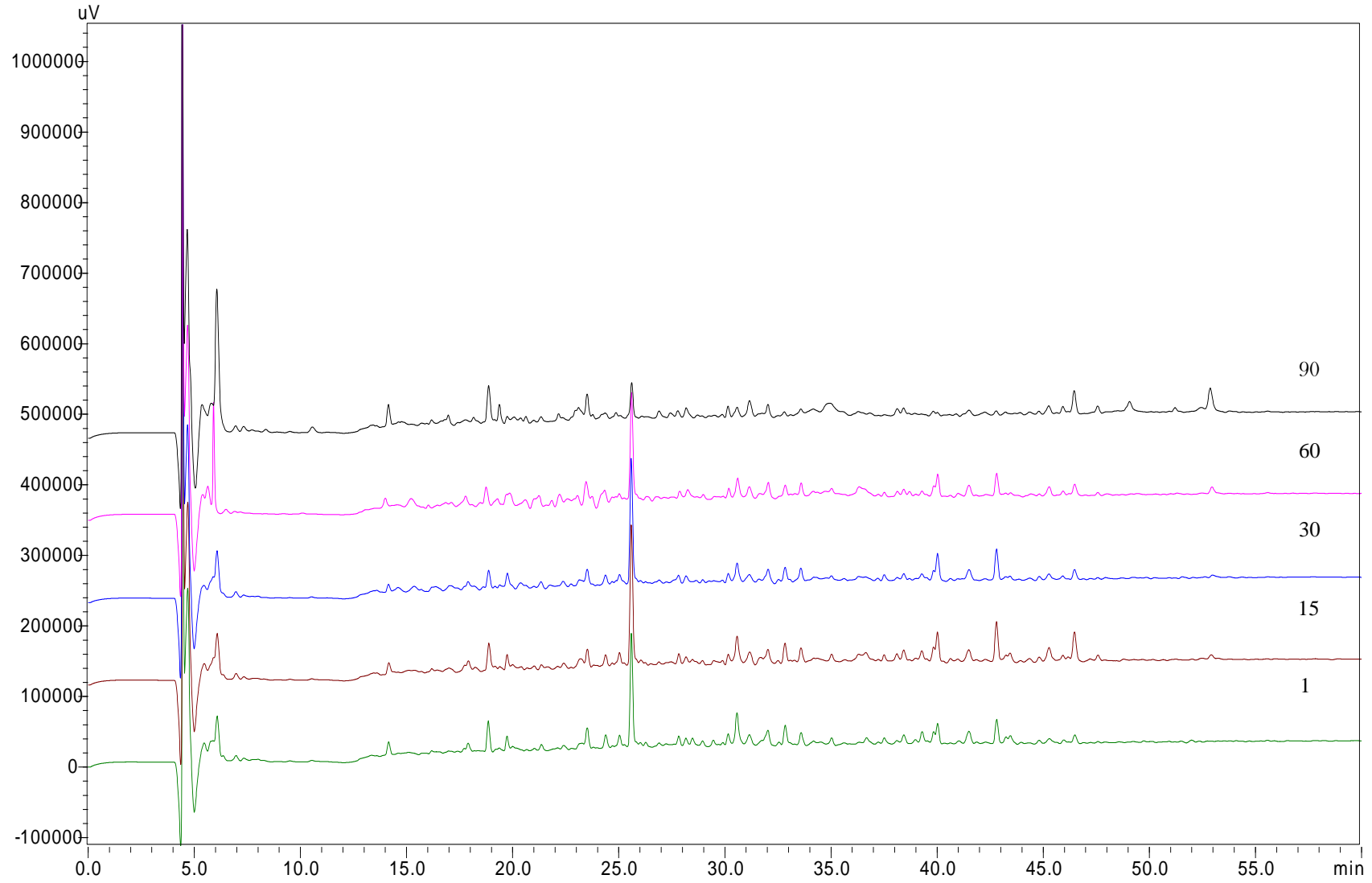
4.5.2.7.5.2. % 70 etanolde çözünen ve çözünmeyen fraksiyonların RP-HPLC peptit profilleri

Deneme peynirinin depolama süresince %70 etanolde çözünmeyen ve çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profilleri sırasıyla Şekil 4.17 ve 4.18'de verilmiştir. Depolama süresince etanolde çözünmeyen fraksiyonlarının RP-HPLC profilleri incelendiğinde hidrofilik kısım olarak değerlendirilen erken alıkonma zamanında oluşan piklerden özellikle 6. ve 18. dakikada gözlenen piklerin konsantrasyonlarında belirgin bir artış olduğu ve 90 günlük peynir örneğinde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Buna karşın 30-40 dakika alıkonma zamanlarında depolama süresince 60 güne kadar hidrofobik karakterli peptidlerin konsantrasyonunda artış meydana geldiği olduğu, belirlenen peptit seviyelerinin miktarlarının depolama süresince değişkenlik gösterdiği özellikle, 90 günlük peynir örneğinde bu aralıkta gözlenen piklerin konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda proteolizin 90 günlük peynir örneğinde artmaya başladığı belirlenmiştir. Benzer durum üre-PAGE jel elektroforez bantlarında da görülmüştür (Bkz. Şekil 4.13-4.14) Buna karşın 40. dakikadan sonra 1 ve 15 günde çok düşük konsantrasyonda olduğu belirlenen piklerin konsantrasyonunun 30, 60 ve 90 günlük peynir örneğinde artmaya başladığı özellikle de 48. ve 53. dakikalarda belirlenen pik konsantrasyonunun 90 günlük peynir örneğinde en üst seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının RP-HPLC profillerinde hidrofobik peptit konsantrasyonunda meydana gelen artışın hidrofilik özellikteki peptitlerden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar toplam serbest amino asit içeriği ile de paralellik göstermektedir (Bkz. Bölüm 4.5.2.8.).

Şekil 4.18'de % 70 etanolde çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC profilleri incelendiğinde erken alıkonma zamanında (hidrofilik kısım) gözlenen piklerin konsantrasyonunun ileri alıkonma zamanlarında gözlenen piklerden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 6. ve 14. dakikalarda gözlenen



Şekil 4.17. Deneme peynirinin depolama süresince % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler



Şekil 4.18. Deneme peynirinin depolama süresince % 70 etanolde çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC (214 nm) profillerinde meydana gelen değişimler

piklerin konsantrasyonunda depolama süresince belirgin bir artış gözlenmiştir. Daha önceden de belirtildiği gibi etanolde çözünen fraksiyonları amino asitler ve düşük molekül ağırlığa sahip peptitler oluşturmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda depolama süresince toplam amino asit ve kazein parçalanma ürünlerinin artış gösterdiği saptanmıştır.

Champion ve Stanley (1982), uzun süreli olgunlaştırılan peynirlerde hidrofobik peptidlerin acı tat oluşumuna neden olduğu ve olgunlaşma boyunca bu peptidlerin miktarının arttığını belirlemişlerdir. Denememizde duyusal değerlendirmeler (Bkz. Bölüm 4.5.2.10) sonucunda 60 ve 90 gün olgunlaştırılmış peynir örneğinde panelistler tarafından herhangi bir acı tat tespit edilememiştir. Bu durumun her ne kadar depolama süresince hidrofobik peptit konsantrasyonunda (pik yüksekliği) artış meydana gelmiş olsa da bu artışın sınırlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar deneme peynirine ait toplam serbest amino asit içeriği ile de paralellik göstermektedir (Bkz. Bölüm 4.5.2.8.).

4.5.2.8. Peynirlerin Toplam Serbest Aminoasit Konsantrasyonu Değişimi

Starter bakteri orjinli peptidazlar, kimozinin kazein üzerindeki etkisi sonucu açığa çıkan büyük molekül ağırlıklı peptidleri kullanarak peynirde serbest amino asitlerin oluşumunu sağlamaktadır (Lane ve Fox, 1996). Peynirde toplam serbest amino asit miktarı suda ve pH-4.6'da çözünen azot içeriğine göre değişkenlik göstermektedir. Depolama süresince peynir örneğinin toplam serbest amino asit (TSAA) miktarında meydana gelen değişim Çizelge 4.11'de verilmiştir. Toplam serbest amino asit miktarları, spektrofotometrik olarak 507 nm'de saptanmış ve mg Leu/g cinsinden ifade edilmiştir.

Peynir örneğinde olgunlaşma süresince TSAA içeriğinde artış meydana gelmiştir. İlk 15 günde meydana gelen değişim önemli bulunmazken ($p>0.05$), depolamanın 15. gününden sonra TSAA miktarındaki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Depolamanın birinci gününde TSAA miktarı 0.38 mg Leu/g iken, depolamanın 90. gününde bu miktar 0.66 mg Leu/g düzeyine kadar

çıkıştır. Hayaloğlu (2009), ticari olarak satılan geleneksel Urfa peynirlerinde TSAA miktarının 0.153 mg Leu/g peynir ile 2.465 mg Leu/g gibi çok geniş bir aralıkta değişim gösterdiğini belirlemiştir. Olgunlaşma süresince Idiazábal (Barcina ve ark., 1995), Manchego (Poveda ve ark., 2004), Feta (Kandarakis ve ark., 2001), İran beyaz peyniri (Hesari ve ark., 2006) ve Ras (Awad, 2006) peyniri gibi salamura olgunlaştırılan peynir çeşitlerinde de toplam serbest amino asit miktarlarının arttığı bildirilmektedir.

Amino asit fraksiyonlarının kompozisyonu ve konsantrasyonunun peynir aromasının gelişiminde önemli etkileri oldukları düşünülmektedir (Molina ve ark., 1999). Örnek olarak metiyonin konsantrasyonundaki artış peynirde olgunlaşma derecesi ile ilişkilendirilmektedir. Bazı araştırmacılar peynir mayasından (rennet) kaynaklanan proteolizin, yüksek molekül ağırlığına sahip kazeinleri hidrolize ederken herhangi bir serbest amino asit oluşumuna neden olmadığını belirtmişlerdir (O'Keeffe ve ark., 1978). Pritchard ve Coolbear (1993), yüksek molekül ağırlığına sahip peptitlerde ilk ayrışmanın kimozen enziminin oluşturduğu proteolitik aktiviteden kaynaklandığını, starter proteinazın oluşturduğu proteolitik aktivitenin ise daha düşük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin ve amino asitlerin oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan peynir üretiminde starter kültür olarak laktik asit bakterisi ilave edilmesi olgunlaşma sonunda fazla miktarda kısa zincirli peptit ve serbest amino asit oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 1990). Vicente ve ark. (2001) olgunlaşma süresince açığa çıkan toplam serbest amino asit içeriğine peynire ilave edilen starter kültür tipinin önemli etkisinin bulunduğunu, bu etkinin peynir üretimi için kullanılan rennet çeşidi ile de değişkenlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Çizelge 4.11. Depolama süresince deneme peynirinin toplam serbest amino asit (mg /100 g) içeriğinde meydana gelen değişim*.

	Depolama Süresi (gün)				
	1	15	30	60	90
507 nm'de absorbands değeri	0.113 ±0.01 ^a	0.121 ±0.01 ^a	0.151 ±0.01 ^b	0.208 ±0.01 ^c	0.221 ±0.04 ^d
mg Leu / g peynir	0.38 ±0.01 ^a	0.40 ±0.01 ^a	0.44 ±0.01 ^b	0.62 ±0.01 ^c	0.66 ±0.04 ^d

* Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0.05 düzeyinde farklıdır.

4.5.2.9. Uçucu Aroma Bileşikleri

Birçok peynir çeşidi, benzer uçucu aroma bileşenlerini farklı konsantrasyonlarda içermektedir. Uçucu aroma bileşenlerinin konsantrasyonu ve oranı her bir peynir çeşidi için spesifik aromanın oluşmasına etkide bulunmaktadır. Bazı peynir çeşitlerinin aroma profilinde belirli tür bileşenler çok daha baskın olabilmektedir. Buna karşın; birçok aromatik bileşenin peynirde yüksek konsantrasyonlarda bulunması tat/aroma kusurlarının oluşmasına yol açabilmektedir. Peynirlerde yer alan uçucu aroma bileşenlerinin konsantrasyonu çiğ süt bileşimine, çiğ sütün pastörize ve mikrofiltre edilmesine, üretimde kullanılan starter kültür türüne ve depolama sıcaklığına göre değişim göstermektedir (Buchin ve ark.,1999;. Fern'andez-Garcia ve ark., 2002; Bouton ve Grappin, 1995; Oumer ve ark., 2000; Gardiner ve ark., 1999).

Deneme peynirinin uçucu aromatik bileşen profilinde olgunlaşma süresince meydana gelen değişimler SPME GC-MS tekniği ile belirlenmiştir. Buna göre; deneme Urfa peynirinde 15 ketonik, 14 alkolik, 13 aldehit, 12 metil ester, 3 terpen, 2 asit ve 7 çeşitli bileşikler olmak üzere toplam 66 farklı uçucu aroma bileşiği tespit edilmiştir. Hayaloğlu ve ark. (2007), tulum peynirinde 11 asit, 16 ester, 12 metil keton,7 aldehit, 22 alkol, 7 sülfür, 6 terpen, 16 diğer bileşen olmak üzere toplam 100 farklı uçucu aroma bileşiği tespit etmişlerdir. Yine bir başka araştırmada Hayaloğlu ve ark. (2007), Malatya peynirinde 11 asit, 13 ester, 15 keton, 6 aldehit, 26 alkol, 2 lakton, 5 sülfür bileşeni, 5 terpen ve 19 diğer bileşen olmak üzere toplam 112 farklı uçucu aroma bileşiği tespit etmişlerdir.

4.5.2.9.1. Esterler

Esterler, peynirlerde yaygın olarak bulunan uçucu aroma bileşenleridir. Esterifikasyon reaksiyonu laktoz fermantasyonu ve amino asit katabolizması sonucu kısa-orta zincirli yağ asitleri ile birincil ve ikincil alkoller arasında meydana gelmektedir (Di Cagno ve ark., 2003). Peynirde bulunan bir çok ester çeşidi peynire tatlımsı, meyvemsi bir aroma kazandırmaktadır. Özellikle, etil esterlerin peynirde meyvemsi aromanın oluşmasında önemli rolü bulunmaktadır. Bu tip esterlerin bir bölümünün duyuşal olarak algılanması oldukça zordur. Bununla birlikte; bu bileşenler amino asitler tarafından oluşmuş acı tat ile yağ asitleri tarafından oluşmuş keskin tadı (ransit tadı) minimize ederek peynir aromasına olumlu katkıda bulunmaktadır (Gallois ve Langlois, 1990).

Deneme peynirinde depolama süresince belirlenen farklı ester bileşenlerinin konsantrasyonları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Metil asetat, etil asetat, metil butanat, etil butanat, metil propanat, etil dokanat ve etil oktanat depolamanın tüm evrelerinde belirlenen ester bileşikleridir. Etil asetat, konsantrasyonu en yüksek olan ester bileşeni olarak belirlenmiş ve depolama süresince bu bileşenin konsantrasyonunda düzenli bir artış olmuştur. Butil asetat, heksil asetat ve etil heksanat olgunlaşmanın başlangıcında tespit edilemezken depolamanın ileri evrelerinde ortaya çıkmış ve depolama süresince konsantrasyonlarında düzeli bir artış gözlenmiştir. Buna karşın; etil karbonat bir günlük peynir örneklerinde tespit edilirken, depolamanın 30. gününden sonra tamamen kaybolmuştur. 90 günlük peynir örneğindeki toplam uçucu ester bileşenlerinin miktarı 23.04 mg/kg olarak bulunmuştur. Hayaloğlu (2009), piyasada satışa sunulan Urfa peynirlerinde toplam uçucu ester miktarını 35.37 ug/100g olarak bulmuştur.

Çizelge 4.12. Urfa peynir örneklerinde saptanan ester bileşikleri ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu bileşikler	RI ^b	Peynirler					
			1	15	30	60	90	
6,418	Methyl acetate	864	X ^a	0,27	0,32	0,44	0,34	0,45
		(828)	SD ^a	0,01	0,04	0,08	0,02	0,01
7,392	Ethyl acetate	900	X	1,59	5,52	12,95	10,04	13,41
		(884)	SD	0,23	1,13	3,31	1,02	0,70
11,982	Butyl acetate	1072	X	ND	0,02	0,25	0,20	0,50
		(1071)	SD		0,03	0,14	0,06	0,05
18,221	Hexyl acetate	1276	X	ND	0,05	0,43	0,43	1,48
		(1274)	SD		0,07	0,34	0,08	0,15
9,621	Methyl butanoate	984	X	0,38	0,41	0,56	0,29	0,22
		(985)	SD	0,09	0,02	0,07	0,04	0,06
10,980	Ethyl butanoate	1032	X	0,03	0,08	0,55	0,51	0,49
		(1040)	SD	0,04	0,11	0,40	0,18	0,19
8,917	Ethyl propanoate	958	X	0,07	ND	0,14	0,07	0,33
		(960)	SD	0,02		0,07	0,10	0,03
7,727	Methyl propanoate	909	X	0,48	0,89	0,60	0,47	0,44
		(904)	SD	0,67	0,20	0,84	0,67	0,62
16,970	Ethyl hexanoate	1235	X	ND	ND	0,13	0,91	3,65
		(1241)	SD			0,18	0,69	0,18
28,626	Ethyl decanoate	1645	X	0,12	0,13	0,18	0,14	0,34
		(1648)	SD	0,03	0,02	0,05	0,03	0,07
23,099	Ethyl octanoate	1440	X	0,34	0,48	0,78	0,77	1,73
		(1435)	SD	0,03	0,09	0,36	0,00	0,07
13,707	Ethyl carbonate	1132	X	0,03	0,04	ND	ND	ND
		(1093)	SD	0,04	0,05			
Toplam Ester				3.31	7.94	17.01	14.17	23.04

^aRT.: Retention time (Alıkınma zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir);

X, ortalama; SD, standart sapma; ND, saptanamadı.

4.5.2.9.2. Alkoller

Peynirde alkoller; laktoz metabolizması, metil ketonların indirgenmesi, amino asit metabolizması ve linoleik veya linolenik asidin parçalanması gibi farklı metabolik yollarla oluşabilmektedir (Molimard ve Spinnler, 1996; Collins ve ark., 2003). Birçok peynir çeşidinde alkoller kantitatif olarak ana sınıfı oluşturmakta ancak konsantrasyonları depolama süresince farklılık gösterebilmektedir (Carnobell ve ark., 2002).

Deneme peynirinde depolama süresince oluşan uçucu alkol bileşenlerinin dağılımı Çizelge 4.13’de verilmiştir. 2-propanol, 1-oktanol, 2-nonanol, 2-penten-1-ol ve 3-büten-2-ol depolamanın başlangıcında belirlenemezken, bu bileşenlerin olgunlaşmanın ileri aşamalarında açığa çıktığı saptanmıştır. Bununla birlikte; etanol, 3-metil-1-bütanol ve 2-metil-1-propanol 90 günlük peynir örneğinde en yoğun tespit edilen alkoller olmuştur.

Çizelge 4.13. Urfa peynir örneklerinde saptanan alkoller ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu bileşikler	RI ^b		Peynirler				
				1	15	30	60	90
8,300	2-propanol	932	X	ND	ND	0,07	0,38	0,18
		(935)	SD			0,11	0,15	0,25
8,386	Ethanol	940	X	1,49	5,97	0,07	10,35	10,07
		(925)	SD	0,75	1,30	0,11	2,63	1,70
26,110	1-Octanol	1549	X	ND	ND	0,16	0,16	0,55
		(1564)	SD			0,04	0,00	0,10
17,490	1-Pentanol	1252	X	1,31	1,91	2,73	2,57	3,20
		(1255)	SD	0,32	0,48	0,75	0,09	0,31
20,615	1-Hexanol	1355	X	0,75	0,94	1,22	0,91	1,23
		(1356)	SD	0,16	0,13	0,38	0,08	0,06
25,345	2-Nonanol	1521	X	ND	0,06	0,12	1,00	0,41
		(1528)	SD		0,08	0,01	1,19	0,11
19,616	2-Penten 1-ol	1322	X	ND	ND	ND	0,06	0,37
		(1324)	SD				0,01	0,11
10,285	3-Buten 2-ol	1008	X	ND	ND	0,09	0,07	0,05
		(1022)	SD			0,02	0,02	0,07
14,636	1-Penten 3-ol	1160	X	0,09	0,24	0,75	0,72	1,34
		(1161)	SD	0,01	0,01	0,19	0,00	0,09
16,175	3-Methyl 1-butanol	1209	X	98,09	104,95	105,32	88,27	143,82
		(1209)	SD	20,80	14,86	28,88	5,99	3,87
12,565	2-Methyl 1-propanol	1091	X	13,20	14,86	0,25	12,46	25,17
		(1092)	SD	2,21	1,64	0,35	0,72	1,77
24,559	2-Ethyl 1-hexanol	1492	X	0,20	0,31	0,54	0,51	1,39
		(1484)	SD	0,05	0,10	0,17	0,04	1,23
13,575	1-Butanol, 3 methyl acetate	1125	X	0,47	0,31	0,30	0,16	0,15
		(1126)	SD	0,12	0,01	0,15	0,05	0,21
	Toplam Alkol			115.6	129.55	111.62	117.62	187.93

^aRT.: Retention time (Alıkonma zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir);

X, ortalama; SD, standart sapma; ND, saptanamadı.

Dallanmış zincir yapısındaki birincil alkoller içerisinde yer alan 3-metil-1-bütanol, Strecker degradasyonu ile meydana gelen aminoasit-aldehit indirgenme reaksiyonu sonucunda oluşabilmektedir (Larsen, 1998; Bintsis ve Robinson, 2004). 3-metil-1-bütanol'ün Feta peynirlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ve bu bileşiğin bazı yumuşak ve yarı-sert peynirlerin hoş giden aromasının oluşumunda etkili olduğu bildirilmektedir (Kondyli ve ark., 2002).

4.5.2.9. 3. Aldehitler

Dallanmış ve lineer aldehitler çoğunlukla amino asitlerin transaminasyonu sonucu oluşan iminlerin (monobazik asit amonyak) dekarboksilasyonu ile meydana gelmektedir. Bununla birlikte; aldehitler amino asitlerin Strecker degradasyonu yoluyla, lineer aldehitler ise doymamış yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile oluşabilmektedir (Collins ve ark., 2003). Asetaldehit, bütanal, 3-metil-bütanal, pentanal, 4-pentanal, hekzanal, heptanal, oktanal, dekanal ve benzaldehit çeşitli peynirlerde tespit edilen önemli aroma bileşikleri arasındadır. Bazı aldehitlerin duyuşsal algılanma eşiklerinin düşük olması peynir aroması bakımından önemlerini arttırmaktadır (Izco ve Torre, 2000).

Deneme peynirinde depolama süresince belirlenen aldehitler Çizelge 4.14'de verilmiştir. Propanal, bütanal, 2-metil-2-bütanal, 2-4 heptadienal, 2-hekzanal, 4-heptanal, 2-4 hekzadienal ve 2-heptenal peynir örneğinde depolamanın başlangıcında (1. gün) belirlenemezken, bu bileşiklerin olgunlaşmanın ilerleyen aşamalarında açığa çıktığı ve konsantrasyonlarının artış gösterdiği belirlenmiştir. Heptanal, hekzanal ve 3-metil bütanal tüm olgunlaşma periyodu boyunca peynirde en fazla bulunan aldehitler olarak tespit edilirken, depolama süresince konsantrasyonlarında artış meydana gelmiştir. Kondyli ve ark. (2002), Feta peyniri üzerinde yaptıkları bir çalışmada pentanal ve hekzanalın tespit edilen önemli aromatik bileşiklerden olduğunu belirlemişlerdir

Çizelge 4.14. Urfa peynir örneklerinde saptanan aldehitler ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu Bileşikler		RI ^b	Peynirler				
				1	15	30	60	90
5,968	Propanal	850	X	ND	ND	ND	0,89	1,93
		(798)	SD				0,06	0,05
7,221	Butanal	896	X	ND	0,07	0,31	0,46	0,98
		(904)	SD		0,10	0,01	0,01	0,12
13,822	2-Methyl 2-butenal	1133	X	ND	0,18	0,21	0,19	1,27
		(1104)	SD		0,20	0,08	0,26	0,22
25,940	Benzaldehide	1544	X	0,62	1,14	0,88	0,67	1,93
		(1529)	SD	0,34	0,11	0,14	0,06	0,21
24,957	2,4 Heptadienal	1507	X	ND	0,04	0,44	0,41	1,03
		(1470)	SD		0,06	0,11	0,02	0,02
16,665	2-hexanal	1225	X	ND	ND	0,25	0,27	0,84
		(1248)	SD			0,03	0,02	0,05
17,314	4-heptanal	1246	X	ND	ND	0,13	0,22	0,58
		(1252)	SD			0,03	0,00	0,00
15,560	Heptanal	1186	X	0,24	0,46	1,54	1,33	4,60
		(1188)	SD	0,03	0,11	1,08	0,23	0,60
22,326	2,4 Hexadienal	1414	X	ND	ND	ND	0,02	0,20
		(1398)	SD				0,03	0,03
12,366	Hexanal	1084	X	0,38	0,98	4,54	7,17	14,42
		(1080)	SD	0,03	0,03	1,16	0,77	0,11
19,972	2-Heptenal	1334	X	ND	ND	0,27	0,36	1,12
		(1327)	SD			0,07	0,00	0,13
8,040	3-Methyl butanal	926	X	3,99	6,95	3,44	3,39	20,60
		(932)	SD	0,51	1,26	0,83	0,11	0,03
5,187	Acetaldehyde	769	X	ND	ND	ND	ND	0,47
		(714)	SD					0,08
	Toplam Aldehit			5.23	9.82	12.01	15.38	49.97

^aRT.: Retention time (Alıkonma zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir); X, ortalama; SD, standart sapma; ND, saptanamadı.

4.5.2.9.4. Ketonlar

Metil ketonlar 5 karbondan büyük düz zincir şeklinde bileşiklerdir. Depolama süresince metil keton konsantrasyonunda meydana gelen artış bir çok peynir çeşidi için karakteristik bir durumdur ve lipolizin bir sonucu olarak değerlendirilmektedir (Carbonell ve ark., 2002).

Deneme peynirinde depolama süresince belirlenen keton bileşikleri Çizelge 4.15'de verilmiştir. 3,5- oktadien 2-1, 6-metil-5-hepten-2-1-metil ketonlara depolamanın ilk dönemlerinde rastlanmazken, olgunlaşmanın ilerleyen aşamalarında bu bileşiklerin konsantrasyonunda artış meydana geldiği saptanmıştır.

Çizelge 4.15. Urfa peynir örneklerinde saptanan metil ketonlar ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu bileşikler	RI ^b		Peynirler				
				1	15	30	60	90
6,235	Acetone	858	X	1,98	1,84	0,91	0,66	1,09
		(863)	SD	0,60	0,05	0,31	0,02	0,07
7,560	2-Butanone	909	X	0,41	3,83	5,40	3,72	3,13
		(900)	SD	0,58	0,45	1,30	0,45	0,91
9,417	2-Pentanone	974	X	2,74	3,56	4,85	5,26	10,40
		(975)	SD	0,24	0,19	0,86	0,16	0,23
29,374	Acetophenone	1675	X	0,15	0,20	0,50	0,35	0,73
		(1652)	SD	0,03	0,00	0,38	0,02	0,15
18,746	3-hydroxy 2-butanone	1293	X	23,59	26,64	39,36	38,22	179,35
		(1287)	SD	10,52	5,22	5,37	3,63	1,43
14,344	2,3-Heptanedione	1150	X	0,98	0,39	1,89	1,70	2,92
		(1138)	SD	0,22	0,03	0,14	0,07	0,05
11,536	2,3-Pentanedione	1054	X	0,34	1,26	4,15	4,11	6,25
		(1061)	SD	0,11	0,27	0,91	0,84	0,31
9,339	3-methyl 2-butanone	1260	X	3,23	3,93	4,59	4,97	24,48
		(1256)	SD	0,23	0,62	0,31	0,08	1,24
25,619	3,5- Octadien 2 one	1531	X	ND	ND	0,22	0,21	0,39
		(1576)	SD			0,04	0,03	0,00
15,431	2-Heptanone	1186	X	0,58	0,16	0,14	0,23	1,12
		(1184)	SD	0,82	0,06	0,20	0,02	0,12
20,244	6-Methyl 5-hepten 2-one	1343	X	ND	ND	0,10	0,07	0,23
		(1341)	SD			0,14	0,02	0,03
18,665	2-Octanone	1290	X	ND	ND	0,10	ND	ND
		(1280)	SD			0,03		
21,819	2-Nonanone	1396	X	3,87	5,66	7,95	9,00	22,11
		(1415)	SD	0,82	1,69	1,82	0,33	5,16
27,677	2-Undecanone	1608	X	0,05	0,10	0,14	0,15	0,29
		(1598)	SD	0,07	0,01	0,06	0,02	0,04
19,690	2-Methyl 3-octanone	1324	X	0,04	0,16	0,48	0,17	0,50
		(1326)	SD	0,05	0,09	0,18	0,01	0,06
	Toplam keton			37,96	47,73	70,78	68,82	252,99

^aRT.: Retention time (Alıkonna zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir); SD, standart sapma, ND, saptanamadı.

Bununla beraber; 2-oktanone depolamanın yalnızca 30. gününde belirlenmiştir. 3-hidroksi 2-bütanone, 3-metil-2-bütanone, 2-nonanone, 2-pentanone ve 2,3-pentanedione depolama boyunca konsantrasyonu en fazla olan metil ketonlar olarak tespit edilmiş, bunların konsantrasyonunda depolama süresince bir artış gözlenmiştir. Aseton ve 2-bütanone konsantrasyonlarında ise depolama süresince artış ve azalmalar olduğu saptanmıştır.

4.5.2.9.5. Terpenler

Terpenler özellikle Alp bölgesinde geleneksel olarak üretilen peynirlerde sık bulunan önemli uçucu bileşiklerdir (Bugaud ve ark., 2001). Bu bileşenlerin kaynağı farklı türdeki otlar ve bitkilerdir (Mariaca ve ark., 1997). Bu bileşenler hayvanların otlamasıyla süte ve dolayısıyla peynire geçtiği bildirilmektedir (Viallon ve ark.,2000). Bununla birlikte Berger (1999), bazı terpen bileşenlerinin peynirdeki mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu açığa çıktığını belirtmiştir.

Deneme peynirinde belirlenen terpen bileşiklerini Çizelge 4.16’da verilmiştir. α -Pinene, limonen ve β -cymene deneme peynir örneğinde belirlenen terpen bileşenleridir. Bu terpen bileşikleri içerisinde β -cymene, konsantrasyonu en yüksek terpen bileşeni olarak tespit edilmiştir. Viallon ve ark. (2000) Saint-Nectaire tipi peynirlerde 15 farklı terpen bileşeni tespit etmişlerdir. Sardunya’da dağlık bölgelerde üretilen Fiore Sardo peynirlerinde yüksek konsantrasyonlarda α -pinene bileşeni tespit edilirken aynı peynirin daha yüksek rakımlı bölgelerde üretilen çeşitlerinde bu bileşene rastlanmamıştır (Di Cagno ve ark., 2003). Larrayoz ve ark. (2001) Roncal ve Fiore Sardo peynirlerinde α -pinene, limonene türü terpen bileşikleri saptamışlar ve bunların muhtemelen peynirde bulunan mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.16. Urfa peynir örneklerinde saptanan terpen bileşikleri ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu bileşikler	RI ^b	Peynirler					
				1	15	30	60	90
10,692	α -Pinene	1022	X	ND	0,07	0,36	0,29	0,55
		(1026)	SD		0,02	0,25	0,18	0,20
16,038	Limonen	1205	X	ND	0,09	1,08	0,11	ND
		(1197)	SD		0,13	1,01	0,16	
18,316	β -Cymene	1278	X	ND	ND	0,03	ND	0,60
		(1267)	SD			0,05		0,25
	Toplam Terpen				0.16	1.47	0.40	1.15

^aRT.: Retention time (Alıkonma zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir); X, ortalama; SD, standart sapma; ND, saptanamadı.

4.5.2.9.6. Asitler

Depolama süresince peynir örneğinde belirlenen asit bileşikleri ve konsantrasyonları Çizelge 4.17’de verilmiştir. Asetik asit yalnızca 90 günlük peynir örneğinde tespit edilirken 2 hidroksi 4-metil pentanoik asit depolamanın tüm aşamalarında tespit edilmiştir. 2 hidroksil 4-metil pentanoik asit konsantrasyonunda depolama süresince artış gözlenmiştir.

Bir çok peynir çeşidinde asetik asit düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve olgunlaşma süresince karbonhidratların fermentasyonu ya da amino asitlerin parçalanmasıyla açığa çıkmaktadır (Dimos ve ark., 1996; Colchin ve ark., 2001). Olgun Cheddar peynirlerinde düz zincir yapısında pentanoik, hekzanoik, dekanolik ve dodekanoik yağ asitleri belirlenmiş ve bunların aroma üzerinde önemli etkileri olduğu belirtilmiştir (Curioni ve Bosset, 2002).

Çizelge 4.17. Urfa peynir örneklerinde saptanan asitler ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu bileşikler	RI ^b		Peynirler				
				1	15	30	60	90
23,549	Acetic acid	1457	X	ND	ND	ND	ND	2,90
		(1480)	SD	ND	ND	ND	ND	4,10
24,363	2 Hydroxy 4-methyl pentanoic acid,	1485	X	10,30	23,13	29,41	28,90	64,32
		(1516)	SD	1,25	4,80	4,88	1,66	1,76
	Toplam asitler			10.30	23.13	29.41	28.90	67.22

^aRT.: Retention time (Alıkonma zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir); SD, standart sapma; ND, saptanamadı.

4.5.2.9.7. Diğer bileşenler

Deneme peynirinde depolama süresince açığa çıkan diğer bileşenler Çizelge 18’de verilmiştir. Klorofom, toluene, etilbenzen, 1,3-dimetil benzen, styrene, naftalin, 2,3 butandiol bileşenleri depolama süresince farklı konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Dumont ve ark. (1981), aromatik bir hidrokarbon olan toluene’i Beaufort ve Comte peyniri gibi farklı peynir çeşitlerinde tespit etmişlerdir. Bosset ve ark. (2000), toluene bileşeninin peynir örneklerinin dondurulmasına bağlı olarak açığa çıkmış olabileceğini belirtmişlerdir. Peynir örneklerinde, etilbenzen, 1,3-dimetil benzen ve stryene bileşenine rastlanması da peynirin plastik kaplara konularak depolanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Chiesa ve ark. (2008), peynir örneklerinin plastik kaplarda taşınması sonucu son üründe ethylbenzene ve stryene benzeri bileşenlerin oluşabileceğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.18. Urfa peynir örneklerinde saptanan çeşitli bileşikler ($\mu\text{g}/100\text{g}$ peynir)

RT ^a	Uçucu bileşikler	RI ^b		Depolama günleri				
				1	15	30	60	90
10,515	Chloroform	1017	X	0,14	0,40	0,65	0,57	1,06
		(1013)	SD	0,02	0,01	0,32	0,25	0,06
11,168	Toluene	1040	X	0,28	0,49	0,79	0,89	1,32
		(1041)	SD	0,03	0,01	0,36	0,08	0,21
13,756	Ethylbenzene	1131	X	ND	ND	0,23	0,34	ND
		(1126)	SD			0,23	0,49	
14,197	1,3-Dimethyl benzene	1145	X	0,03	0,11	0,04	0,46	0,62
		(1143)	SD	0,05	0,10	0,06	0,12	0,07
17,882	Styrene	1265	X	0,27	0,57	1,01	1,09	3,50
		(1260)	SD	0,01	0,08	0,71	0,55	0,38
31,852	Naphthalene	1775	X	ND	ND	0,14	0,02	0,20
		(1791)	SD			0,19	0,03	0,29
26,911	2,3 Butane diol	1579	X	0,85	1,67	2,83	3,68	5,14
		(1580)	SD	1,20	0,96	0,36	1,13	0,21
	Toplam			1.57	3.24	5.69	7.05	11.84

^aRT.: Retention time (Alıkonma zamanı) ^bRI: Retention Index değerleri (ilgili bileşiğin literatürdeki RI değeri parantez içinde verilmiştir); X, ortalama; SD, standart sapma; ND, saptanamadı.

4.5.2.10. Duyusal Değerlendirmeler

Deneme örneği, duysal özellikler açısından olgunluk süresi bilinmeyen Urfa peyniri (piyasadan sağlanan) ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.19’da sunulmuştur. Tüm peynir örnekleri Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde görevli 10 deneyimli panelist tarafından renk ve görünüş, tat, koku, yapı ve tekstür ile genel kabul edilebilirlik değerleri bakımından hedonik olarak değerlendirmeye alınmıştır. Değerlendirme hedonik olarak yapılmış olup panelistlere yönelik herhangi bir eğitim uygulanmamıştır.

Çizelge 4.19. Deneme örneklerine ait duysal değerlendirme sonuçları (n=2)

60. günlük deneme peyniri				
Örnekler	Renk ve Görünüş (20 PUAN)	Kitle ve Yapı (35 PUAN)	Koku (10 PUAN)	Tat (35 PUAN)
A	18.38±(0.43) ^a	29.86±(0.33) ^b	8.73±(0.11) ^{ab}	27.48±(0.76) ^a
B	17.60±(0.30) ^a	27.30±(0.45) ^a	7.95±(0.17) ^a	28.31±(0.43) ^{ab}
90. günlük deneme peyniri				
Örnekler	Renk ve Görünüş (20 PUAN)	Kitle ve Yapı (35 PUAN)	Koku (10 PUAN)	Tat (35 PUAN)
A	18.14±(0.47) ^{ab}	30.45±(0.51) ^b	8.20±(0.18) ^a	25.38±(0.75) ^a
B	17.42±(0.58) ^a	28.46±(0.54) ^a	7.70±(0.21) ^a	27.42±(0.53) ^b

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden p<0.05 düzeyinde farklıdır
A: Deneme peyniri, B: Piyasa örneği (olgunluk süresi bilinmemektedir)

Çizelge 4.19 incelendiğinde örneklerin renk ve görünüş dağılımının birbirine yakın değerler aldığı belirlenmiştir. Her iki peynir grubunda da renk ve görünüş değerlerinde meydana gelen azalma ihmal edilebilir düzeyde kalmıştır. Pastörize süttten üretilen Urfa peynirinin renk değeri çiğ süttten geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinden daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinin deneme peynirimizden daha yüksek tuz konsantrasyonunda salamura edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özer ve ark. (2002a) yaptıkları araştırmada Urfa peynirlerinin renk değerinin 5 tam puan üzerinden 4.3 olduğunu belirlemişlerdir.

Peynir örneklerinin kitle ve yapı değerleri incelendiğinde deneme peynirinin geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinden depolamanın hem 60. hem de 90. gününde daha yüksek puan aldığı belirlenmiştir. Panelistlerin büyük bir çoğunluğu (8 kişi) deneme peynirimizin yapısını geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinden daha yumuşak bulmuş ve olumlu görüş bildirmişlerdir. Kitle ve yapı puanları üzerine pastörizasyon işlemi ve salamura (%12) konsantrasyonun etkili olduğu düşünülmektedir. Pastörizasyon ile denatüre olmaya başlayan serum proteinlerinin kazeinler ile interaksiyona girmesi sonucu peynir kitesinin geleneksel olarak çiğ süttten üretilen Urfa peynirinden daha yumuşak yapı kazanmasına neden olmuştur. Rynne ve ark. (2004) peynire işlenecek sütün pastörize edilmesi peynir kitesinin nem içeriğinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca deneme peynir örneğinin geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinden daha düşük salamura konsantrasyonunda depolanmasının yumuşak yapı üzerinde etkisi olmuştur.

Peynir örnekleri, tat ve koku özellikleri bakımından ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Buna göre; peynir örneklerinin koku puanları incelendiğinde panelistler özellikle çiğ süttten üretilen Urfa peynirinde ahırımıslı/yemimsi bir koku tespit etmişler ve bunun sonucunda koku puanları deneme peynirinden daha düşük olmuştur. Örnekler tat özellikleri bakımından incelendiğinde panelistler çiğ süttten üretilen peynir örneğinin pastörize süttten üretilen peynir örneğine göre daha keskin tada sahip olduğunu, bunun yanında hissedilen yoğun tuz tadının aromayı bir miktar olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Depolama süresince her iki peynir grubunda da tat değerleri düşüş göstermiş ve bu düşüş deneme peynirinde daha belirgin olmuştur. Piyasa örneğinin daha yüksek tat değerlerine sahip olması olasılıkla deneme peynirinde proteolizin daha zayıf olmasına ve buna bağlı olarak tat gelişiminin yavaş seyretmesine dayanmaktadır.

Panelistler peynirleri genel olarak değerlendirdiklerinde, deneme peynirinin geleneksel olarak çiğ koyun sütünden üretilen Urfa peynirinden daha yüksek puanlar aldığı belirlenmiştir. Özellikle çiğ süttten üretilen peynirin yoğun tuz konsantrasyonunda depolanması peynirin görünüşü üzerinde olumsuz etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Panelistler deneme peynir örneğinin yapı ve görünüş

özellikleri üzerine olumlu görüş bildirirken geleneksel Urfa peynirine göre daha hafif aromaya sahip olduğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında fenotipik ve genotipik yöntemler aracılığı ile Şanlıurfa ilinin Viranşehir, Siverek, Birecik ilçeleri ile merkeze bağlı Kıyas beldesinde çiğ koyun sütünden üretilen ve kontrollü koşullarda 3 ay olgunlaştırılan Urfa peynirlerinde hakim laktik floranın suş düzeyinde karakterizasyonu sağlanmıştır. Urfa peynirlerinden izole edilen toplam 143 suşa ait fenotipik ve genotipik değerlendirmeler sonucunda en yaygın türün *Enterococcus* spp. olduğu belirlenmiştir. *Enterococcus* spp.'lerin ağırlıklı olarak fekal bulaşma indikatörü olarak değerlendirilmesi ve toksikolojik testlerinin tamamlanmamış olması nedeniyle en baskın ikinci tür olarak tespit edilen *Lactococcus* spp.'ye ait 3 suş (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* (suş no: 62), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (suş no: 63) ve *Lactococcus garvieae* (suş no: 44). starter kültür olarak kullanılarak pastörize süttten Urfa peyniri üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu araştırma sonucunda aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiş ve sonraki çalışmalar için önerilerde bulunulmuştur.

Farklı bölgelerde üretilen peynirlerde laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp.) dağılımı değişkenlik göstermiştir. Bu farklılığın Urfa peyniri üretim koşullarındaki bölgesel farklılıklar ile süt hayvanının beslenme rejimi farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür. 16S rDNA sekans dizi analizi ile tanımlaması yapılan suşların 70'i (% 48.95) *Enterococcus* spp., 58'i (% 40.55) *Lactococcus* spp., 13'ü (% 9.10) *Lactobacillus* spp., 1'i (% 0.69) streptokok ve 1'i (% 0.69) *Leuconostoc* spp. olmak üzere toplam 143 suş tanımlanmıştır. 70 enterokok izolatin 28 adedi *Enterococcus faecium* (% 40.00), 23 adedi *E. durans* (% 32.85), 13 adedi *E. faecalis* (% 18.57), 4 adedi *E. lactis* (% 5.71) ve 2 adedi (% 2.85) *E. hirae* olarak tanımlanırken, 59 *Lactococcus* spp. izolatin 37 adedi (% 62.71) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 18 adedi *Lactococcus garvieae* (% 30.50) ve 4 adedi (% 6.77) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanan 13 izolatin ise 6'sının (% 46.15) *Lactobacillus* spp., 4'ünün (%30.76) *Lactobacillus fermentum* ve 3'ünün (% 23.07) *Lactobacillus*

helveticus olduğu bulunurken, *Streptococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. olarak tanımlanan suşların ise sırasıyla *Streptococcus parauberis* ve *Leuconostoc lactis* olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, çiğ süttten geleneksel yolla üretilen olgunlaşmış Urfa peynirinde hakim olan florayı *Enterococcus* spp. ve *Lactococcus* spp. grubu laktik asit bakterilerinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Enterococcus spp. cinsi bakterilerin olgunlaşmış Urfa peynirindeki laktik asit bakteri florasında yüksek miktarlarda bulunması, bu bakteri türünün birçok suşunun düşük pH ve sıcaklık ile yüksek tuz konsantrasyonuna karşı dirençli olmasından kaynaklanmaktadır. Urfa peyniri yüksek tuz içeren salamura içerisinde (% 14-20 w/v) ve <10 °C’de olgunlaştırılmaktadır. Ayrıca çiğ süttün sağım ve işleme koşullarının büyük olasılıkla hijyenik olmamasının da bu tür bakterilerinin gelişimine olanak sağladığı düşünülmektedir.

İzole edilen *Lactococcus* spp. suşların % 27.86’sının *Lc. garvieae* türü bakterilere ait olması dikkat çekmektedir. *Lc. garvieae* süt ürünlerinde de bulunmakla birlikte deniz ürünlerinde yaygın bir bakteri türüdür. Yapılan birçok araştırmada bu türün geleneksel peynirlerde *Lc. lactis* ile birlikte doğal flora içerisinde yer aldığı belirlenirken peynirde de aroma gelişimi başta olmak üzere bazı spesifik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir.

Tanımlaması yapılan suşlarının fenotipik özellikleri incelendiğinde, enterokokların tamamının 10 °C, 45 °C ve % 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterdiği belirlenmiştir. *Lactococcus* spp. grubu bakteri içerisinde değerlendirilen 59 suşun 44’ünün (% 74.57) % 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterdiği, 15’inin (% 25.42) ise gelişemediği saptanmıştır. % 6.5 tuz konsantrasyonunda ve 45 °C’de gelişim gösteren suşlar *Lactococcus* cinsi bakterilere göre atipik özellik göstermiştir.

6 saatlik inkübasyon sonunda yağsız UHT süttte laktik asit üretim değerleri incelendiğinde, 62 *Enterococcus* spp., 54 *Lactococcus* spp. ve 9 *Lactobacillus* spp. suşunun % 0.25 üzerinde laktik asit ürettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar

doğrultusunda, özellikle izole edilen 54 *Lactococcus* spp. suşun laktik asit üretim kapasiteleri dikkate alındığında peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceği olasılığının bulunduğu belirlenmiştir.

Deneme peynirlerinden izole edilen ve tanımlaması yapılan suşların bakteriyosin üretebilme yetenekleri incelenmiştir. 143 suş içerisinde 4 suşun indikatör suş *Micrococcus luteus* 'a karşı oluşturdukları zonlar bakteriyosin aktivitesi olarak değerlendirilmiştir. Bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanan suşlardan 3'ünün *Enterococcus durans* 'a, 1'inin ise *Enterococcus faecium* 'a ait olduğu belirlenmiştir. Bu suşların starter kültür olarak kullanılabilirlikleri için öncelikle tüm patojenite testlerinin yapılması ve potansiyel risklerinin tespit edilmesi gerekmektedir.

Deneme peynirinin toplam kurumadde değerinin TS 13129 Urfa peyniri standardına uygun olduğu belirlenmiştir. Deneme örneğinin kurumadde tuz içeriği olgunlaşma süresi boyunca artış göstermiştir. Tuz geçişinin olgunlaşmanın ilk günlerinde çok hızlı gerçekleştiği, sonrasında ise yavaşladığı belirlenmiştir. T.S. 13129'da salamura Urfa peynirinin kurumadde tuz içeriğinin en yüksek %15 olması öngörülmektedir. Araştırmamızda elde ettiğimiz kurumadde tuz değerlerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumun peynir denememizde % 12'lik salamura kullanımından ve kurumaddenin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Depolama süresi boyunca peynir örneğinde pH değerleri dalgalı bir değişim göstermiştir. Örneklerin toplam asitlik değerleri olgunlaşma süresince artan ve azalan bir eğilim göstermiştir.

Peynir örneğinde depolama süresince toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayılarında sınırlı bir azalma kaydedilmiştir. Depolama sürecinin başlangıcında peynir örneğinin TAMB sayısı 8.62 log kob/g olarak saptanırken depolamanın 90. gününde 8.00 log kob/ g' a kadar düştüğü saptanmıştır.

Deneme peynirinin toplam azot içeriğinde 90 günlük depolama sürecinde sürekli bir azalma meydana gelmiştir. Toplam azot değerlerindeki değişime paralel

olarak, deneme peynirlerinin suda çözünen azot (WSN) değerlerinde 90 günlük olgunlaşma süreci boyunca sürekli bir artış gözlenmiştir. Gerek toplam azot değerindeki azalma seyri gerekse WSN oluşum hızı dikkate alındığında geleneksel salamura Beyaz peynirlere oranla daha yavaş seyreden bir proteoliz gerçekleştiği dikkat çekmiştir. Bu durumun deneme peynirlerinin üretiminde kullanılan laktik bakteri suşlarının proteolitik aktivitesinin ticari mezofilik starter kültürlerle oranla daha zayıf olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Deneme peynirinin pH 4.6'da çözünmeyen fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde 60- ve 90-günlük peynir örneğinde α_{s1} kazeini (α_{s1} -CN) temsil eden bantlarının yoğunluğunda sınırlı bir azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir. Buna karşın α_{s1} -CN parçalanma ürünlerini temsil eden ($M_w < 10.000$ Dalton) bir bant dizisi ile karşılaşmıştır. α_{s1} -CN'de belirlenen hidrolizasyonun β -CN'deki hidrolizasyondan bir miktar daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Depolama süresince deneme peynirinde suda çözünen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde depolama süresi boyunca düşük molekül ağırlıklı peptidler ve aminoasitlerin konsantrasyonunda azalma kaydedilmiştir. Özellikle, β -I-CN, α_{s1} -CN (f102-f199) ve α_{s1} -I-CN (f24-f199)'i temsil eden bantlarda azalma dikkat çekmiştir. Buna karşın; γ_1 -CN, γ_2 -CN ve γ_3 -CN'i temsil eden bantların yoğunluklarında belirgin bir değişim göze çarpmamıştır. Bu durum, peynirde plazmin aktivitesinin çok sınırlı olduğunu göstermektedir.

Depolama süresince peynir örneğinin % 70 etanolde çözünmeyen azot fraksiyonlarının üre-PAGE elektroforetogramları incelendiğinde olgunlaşma süresince kazein fraksiyonlarının bant yoğunluğunda azalma olduğu ancak, ileri proteolizin bir belirteci olan düşük molekül ağırlıklı peptidleri temsil eden bant dizisinin belirginleşmediği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda deneme peynirinin proteoliz düzeyinin geleneksel olarak üretilen Urfa peyniri ile benzerlik gösterdiği; ancak klasik salamura Beyaz peynirlere oranla daha düşük bir olgunlaşma profilinin oluştuğu anlaşılmıştır.

Deneme peynirinin depolama süresince pH 4.6'da çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profilleri incelendiğinde depolama süresince peynir örneğinde aynı alıkonma zamanlarında minör ve majör pikler belirirken, olgunlaşma süresince piklerin konsantrasyonlarında artış ve azalışlar gözlenmiştir. Daha önce Urfa peyniri üzerine yapılan çalışmaları deneme peynirimiz ile karşılaştırdığımızda geleneksel olarak üretilen piyasa örneklerinde gözlenen pik konsantrasyonları deneme peynirimizden daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun farklı türde ve kalitede hammadde kullanımı ile farklı üretim ve olgunlaştırma koşullarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte özellikle çiğ sütün kompleks mikroflorasının sütün aminopeptidaz aktivitesinde artışa neden olduğu da düşünülmektedir. Bu noktada, özellikle *Enterococcus* spp.'lerin peynir olgunlaşmasına katkısının önemli olduğu düşünülmektedir.

Deneme peynirinin depolama süresince %70 etanolde çözünmeyen ve çözünen fraksiyonlarının RP-HPLC peptid profilleri incelendiğinde hidrofobik peptid konsantrasyonunda meydana gelen artışın hidrofilik özellikteki peptidlerden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum hidrofilik peptidlerin etanolde çözünmesiyle ilişkilendirilmiştir. % 70 etanolde çözünen azot fraksiyonlarının RP-HPLC profillerini incelediğimizde erken alıkonma zamanında (0-25 dakika) (hidrofilik kısım) gözlenen piklerin konsantrasyonunun ileri alıkonma zamanlarında (25-55 dakika) gözlenen piklerden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Depolama süresince peynir örneğinin toplam serbest amino asit (TSAA) miktarında sınırlı ancak kararlı bir artış meydana gelmiştir. Gerek üre-PAGE analizleri gerekse RP-HPLC ve toplam aminoasit analizleri bir arada değerlendirildiğinde Urfa peynirinde proteolizin yavaş geliştiği görülmüştür.

Deneme peynirinin uçucu aroma bileşiklerinde olgunlaşma süresince meydana gelen değişimler SPME GC-MS tekniği ile izlenmiştir. Buna göre; deneme Urfa peynirinde 15 adet keton, 14 alkol, 13 aldehit, 12 metil ester, 3 terpen, 2 asit ve 7 diğer bileşikler olmak üzere toplam 66 farklı uçucu aroma bileşiği tespit edilmiştir. Ester bileşikleri içerisinde, etil asetat, konsantrasyonu en yüksek olan ester bileşeni olarak belirlenmiş ve depolama süresince bu bileşenin konsantrasyonunda düzenli bir

artış olmuştur. Etanol, 3-metil-1-bütanol ve 2-metil-1-propanol 90 günlük peynir örneğinde en yoğun tespit edilen alkoller olmuştur. Heptanal, heksanal ve 3-metil bütanal tüm olgunlaşma periyodu boyunca peynirde en fazla bulunan aldehytler olarak belirlenmiştir. 2-pentanone ve 2,3-pentanedione depolama boyunca konsantrasyonu en fazla olan metil ketonlar olarak tespit edilmiştir. Peynir örneğinde yalnızca 2 adet uçucu yağ asidi bileşiği belirlenmiştir. Bunlar içerisinde asetik asit sadece 90 günlük peynir örneğinde tespit edilirken 2 hidroksi 4-metil pentanoik asit depolamanın tüm aşamalarında tespit edilmiştir. α -pinene, limonen ve β -cymene deneme peynir örneğinde belirlenen terpen bileşenleridir. Klorofom, toluene, etilbenzen, 1,3-dimetil benzen, styrene, naftalin, 2,3 butandiol gibi farklı bileşenler depolama süresince farklı konsantrasyonlarda tespit edilmiştir.

Deneme peynirleri panelistler tarafından duyuşal açıdan değerlendirilmiştir. Tüm peynir örneklerinin 90. gününde renk ve görünüş puanlarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Bununla beraber pastörize süttten üretilen Urfa peynirinin renk değeri çığ süttten geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumun geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinin deneme peynirimizden daha yüksek tuz konsantrasyonundaki salamurada olgunlaştırılmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Kitle ve yapı değeri incelendiğinde deneme peynirinin geleneksel olarak üretilen Urfa peynirinden hem 60. hem de 90. günde daha yüksek puan aldığı belirlenmiştir. Peynir örneklerinin koku puanları incelendiğinde panelistler özellikle çığ süttten üretilen Urfa peynirinde ahırımsı/ yemimsi bir koku tespit etmişler ve bunun sonucunda koku puanları deneme peynirinden daha düşük olmuştur. Örnekler tat özellikleri bakımından incelendiğinde panelistler çığ süttten üretilen peynir örneğinin pastörize süttten üretilen peynir örneğine göre daha keskin tada sahip olduğunu, bunun yanında hissedilen yoğun tuz tadının aromayı olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Panelistler peynirleri genel olarak değerlendirdiklerinde, deneme peynirinin geleneksel olarak çığ koyun süttünden üretilen Urfa peynirinden daha yüksek puanlar aldığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; elde edilen bulgular ışığında aşağıdaki değerlendirmeler yapılmıştır:

1. İzolasyonu ve genotipik tanılması yapılan suşlardan özellikle *Lactococcus* cinsi bakterilerin proteolitik yetenekleri ortaya konulmalıdır,
2. Urfa peynirinde en yaygın tür olan ve peynir aroması üzerinde önemli etkileri oldukları düşünülen *Enterococcus* spp.'lerin toksikolojik testleri yapılmalı, ardından da peynir yapımına yönelik teknolojik özellikleri belirlenmelidir,
3. Proteolitik yetenekleri belirlenen suşlar içerisinde yüksek proteolitik özelliğe sahip suşların peynir üretiminde gerçek zamanlı denemeleri gerçekleştirilmelidir,
4. Proteolizin sınırlı olması nedeniyle Urfa peynirlerinin olgunlaşma süresi 6-9 aya kadar uzatılmalıdır.

KAYNAKLAR

- AGBOOLA, S., CHEN, S. J. and ZHAO, J., 2004. Formation of Bitter Peptides During Ripening of Ovine Milk Cheese Made with Different Coagulants. *Lait*, 84: 567–578.
- ALBENIZO, M., CORBO, M.R., REHMAN, S.U., FOX, P.F., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., SEVI, A. and GOBETTI, M., 2001. Microbiological and Biochemical Characteristics of Canestrato Pugliese Cheese Made from Raw Milk, Pasteurized Milk or by Heating the Curd in Hot Whey. *International Journal Food Microbiology*, 67: 35–48.
- ANDREWS, A.T., 1983. Breakdown of Caseins by Proteinases in Bovine Milks with High Somatic Cell Counts Arising from Mastitis or Infusion with Bacterial Endotoxin. *Journal of Dairy Research* 50: 57–66.
- ANDRIGHETTO, C., KNIJFF, E., LOMBARDI, A., TORRIANI, S., VANCANNEYT, M., KERSTERS, K., SWINGS, J. and DELLAGLIO, F., 2001. Phenotypic and Genetic Diversity of *Enterococci* Isolated from Italian Cheeses. *Journal of Dairy Research*, 68:303-316.
- ANONİM, 2002. Çiğ Süt Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, TS 1018, Ankara, 9 sayfa.
- ANONİM, 2005. Urfa Peyniri Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, TS 13129, Ankara,11 sayfa.
- ANONİM, 2006. Beyaz Peynir Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, TS 591, Ankara,.
- ANONİM, 2009. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, Resmi Gazete, 6 Şubat 2009, Sayı 27133.
- AQUILANTI, L., DELL'AQUILA, L., ZANNINI, E., ZOCCHETTI, A. and CLEMENTI, F., 2006. Resident Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Canestrato Pugliese Cheese. *Letters in Applied Microbiology*,43: 161-167.
- AQUILANTI, L., SILVESTRI, G., ZANNINI, E., OSIMANI, A., SANTARELLI, S. and CLEMENTI, F., 2007. Phenotypic, Genotypic and Technological Characterization of Predominant Lactic Acid Bacteria in Pecorino Cheese from Central Italy. *Journal of Applied Microbiology*,103: 948-960.
- ASLIM, B., YÜKSEKDAĞ, N. Z., SARIKAYA, E. and BEYATLI, Y. 2005. Determination of the Bacteriocin-like Substances Produced by Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Dairy Products. *Food Science and Technology*, 38: 691–694.
- ATASOY, F., 1999. Şanlıurfa İlinde Satışa Sunulan Urfa Peynirlerin Bazı Kimyasal Özellikleri ve Proteoliz Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Hr. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

- ATASOY A. F. ve AKIN M. S. 2004. Sanlıurfa İlinde Satışa Sunulan Urfa Peynirlerinin Bazı Kimyasal Özellikleri ve Proteoliz Düzeylerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 8: 9-15.
- ATASOY, F., 2004. Farklı Sütlerden Yapılan Urfa Peynirinin Nitelikleri Üzerine Değişik Pastörizasyon Normlarının ve Starter Kültürlerinin Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, s:261.
- AWAD, S., 2006. Texture and Flavour Development in Ras Cheese Made From Raw and Pasteurised Milk. Food Chemistry, 97: 394–400
- BANKS, J.M., 1992. Cheese. (Alınmıştır: The Technology of Dairy Products, Ed. R.Early, VCH Publ., New York, 39-65).
- BÁRCENAS, P., PÉREZ-ELORTONDO, F.J., SALMERÓN, J. and ALBISU, M., 1999. Development of a Preliminary Sensory Lexicon and Standard References of Ewes Milk Cheeses Aided by Multivariate Statistical Procedures. Journal of Sensory Studies, 14: 161-179.
- BARCINA, Y., IBÁÑEZ, F. C. and ORDÓÑEZ, A. I., 1995. Evolution of Free Amino Acids During Idiazábal Cheese Ripening. Food Control 6: 161–164.
- BARUZZI, F., MOREA, M., MATARANTE, A. and COCCONCELLI, P. S., 2000. Changes in the *Lactobacillus* Community During Ricotta Forte Cheese Natural Fermentation. Journal of Applied Microbiology, 89: 807-814.
- BARUZZI, F., MATARANTE, A., MOREA, M. and COCCONCELLI, P. S., 2002. Microbial Community Dynamics During the Scmorza Altamura Cheese Natural Fermentation. American Dairy Science Association, 85: 1390-1397.
- BEASLEY, S. S. and SARIS, P. E. J., 2004. Nisin Producing *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Human Milk. Applied Environmental Microbiology. 70: 5051–5053.
- BENKERROUM, N. and TAMIME, A.Y., 2004. Technology Transfer of Some Moroccan Traditional Dairy Products (Lben, Jben And Smen) to Small Industrial Scale. Food Microbiology, 21: 399–413.
- 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.
- BERGER, C., 1999. Composes Darômes Soufres Produits Par La Flore Daffinage Des Fromages a Pâte Molle: Importance de *Geotrichum candidum*. Ph.D. thesis, Institut national agronomique, Paris-Grignon.
- BERTHIER, F., BEUVIER, E., DASEN, A. and GRAPPIN, R., 2001. Origin and Diversity of Mesophilic *Lactobacilli* in Comte cheese, as Revealed by PCR with Repetitive and Species-Specific Primers. International Dairy Journal, 11: 293-305.
- BINTSIS, T. and ROBINSON. R.K., 2004. A Study of the Adjunct Cultures on the Aroma Compounds of Feta Type Cheese. Food Chemistry, 88(3):435-441.
- BLAIOTTA, G., PEPE, O., MAURIELLO, G., VILLANI, F., ANDOLFI, R and MOSCHETTI, G., 2002. 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region Polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as Revealed by PCR and Nucleotide Sequence Analysis. System Applied Microbiology, 23: 267-278.

- BLAKESLEY, R. W. and BOEZI, J. A., 1977. A New Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gels Using Coomassie Brilliant Blue G 250. *Analytical Biochemistry*, 82: 580-582.
- BOSSET, J. O., GUBLER, M., UTIKOFER B. U., GAUCH, R., 2000. Mono-, Di- And Tri-Methyl Benzene in Frozen Cheese Samples: Natural Metabolites or Environmental Pollutants. *Travaux de Chimie Alimentaire et Hygiene*, 91: 287-299.
- BOUBEKRI, K. and OHTA Y., 1996. Identification of Lactic Acid Bacteria from Algerian Traditional Cheese, El-Klila. *Journal of Science and Food Agriculture*, 70: 501-505.
- BOUTON, Y. and GRAPPIN R., 1995. Comparison of the Final Quality of a Swiss-Type Cheese Made from Raw or Microfiltered Milk. *Lait*, 75: 31-44.
- BOUTON, Y., GUYOT, P. and GRAPPIN, R., 1998. Preliminary Characterization of Microflora of Comte Cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 123-131.
- BOUTON, Y., GUYOT, P., BEUVIER, E., TAILLIEZ, P. and GRAPPIN, R., 2002. Use of PCR-Based Methods and PFGE for Typing and Monitoring Homofermentative *Lactobacilli* During Comte Cheese Ripening. *International Journal Food Microbiology*, 76: 27-38.
- BUCHIN, S., MARTIN, B., DUPONT, D., BORNARD, A. and ACHILLEOS, C., 1999. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *Journal of Dairy Research*, 66: 579-588.
- BUGAUD, C., BUCHIN S., HAUWUY A. and COULON J. B., 2001. Relationships Between Flavour and Chemical Composition of Abundance Cheese Derived from Different Types of Pastures. *Lait*: 81: 757-773.
- CALLON, C., MILLET, L. and MONTEL, L. C., 2004. Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Salers Cheese. *Journal Dairy Research*, 71:231-244.
- CARBONELL, M., NUÑES, M. and FERNÁNDEZ-GARCIA, E., 2002. Seasonal Variation of Volatile Compounds in Ewe Raw Milk La Serena Cheese. *Lait*, 82: 699-711.
- CARIDI, A., 2003. Identification and First Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Artisanal Ovine Cheese Pecorino del Poro. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 105-110.
- CARR, F. J., CHILL, D. and MAIDA, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28:281-370.
- CASLA, D., REQUENA, T. and GO'MEZ, R., 1996. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat's Milk and Artisanal Cheeses: Characteristics of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 35-41.
- CHAMPION, H. and STANLEY, D. 1982. HPLC Separation of Bitter Peptides From Cheddar Cheese. *Canadian Institute Food Science Technology Journal* 15: 283-286.
- CHIESA, L. M., SONCIN, S. , PANSERI, S. and CANTONI, C., 2008. Release of Ethylbenzene and Styrene From Plastic Cheese Containers. *Veterinary Research Communications*, 32: 319-321.
- CLEMENTI, F., CENCIG. B. T., TRABALZA M. M. and Di ANTONIO E., 1998. Use of Selected Starter Cultures in the Production of Farm Manufactured Goat Cheese From Thermized Milk. *Italian Journal Food Science*, 10: 41-56.

- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES I. F. and CHIKINDAS, M. L., 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1–20.
- COEURET, V., DUBERNET, S., BERNARDEAU, M., GUEGUEN, M. and VERNOUX, J. P., 2003. Isolation, Characterisation and Identification of *Lactobacilli* Focusing Mainly on Cheeses and Other Dairy Products, *Lait*, 83:269-306.
- COGAN, T., 1995. History and Taxonomy of Starter Cultures. pp. 1–24. In: *Dairy Starter Cultures*, Eds. T. Cogan ve J.P. Accolas. VCH Publishers, New York.
- COGAN, T. M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P. S., FERNANDES, I., GOMEZ, J., GOMEZ, R., KALANTZOPOULOS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M. C. and RODRIGUEZ, E., 1997. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Artisanal Dairy Products, *Journal of Dairy Research*, 64:409–421.
- COLLINS, Y. F., MCSWEENEY, P. L. H. and WILKINSON, M. G., 2003. Lipolysis and Free Fatty Acid Catabolism in Cheese: a Review of Current Knowledge. *International Dairy Journal*, 13: 841–866.
- COLCHIN, L. M., OWENS S. L., LYUBACHEVSKAYA G., BOYLE-RODEN E., RUSSEK-COHEN E., and RANKIN S. A., 2001. Modified Atmosphere Packaged Cheddar Cheese. *Journal of Agriculture Chemistry*, 49:2277–2282.
- COPPOLA, R., NANNI, M., SUCCI, M., SORRENTINO, A., IORIZZO, M., CHIAVARI, C. and GRAZIA, C., 2001. Enumeration of Thermophilic Lactic Acid Bacteria in Ripened Cheeses Manufactured From Raw Milk. *Milchwissenschaft*, 56:140-142.
- COPPOLA, R., SUCCI, M., SORRENTINO, E., IORIZZO, M. and GRAZIA, L., 2003. Survey of Lactic Acid Bacteria During the Ripening of Caciocavallo Cheese Produced in Molise. *Lait*, 83: 211-222.
- CORROLER, D., MANGUIN, I., DESMASURES, N. and GUEGUEN, M., 1998. An Ecological Study of Lactococci Isolated from Raw Milk in the Camembert Cheese Registered Designation of Origin Area. *Applied Environmental Microbiology*, 64:4729–4735.
- CURIONI, P. M. G. and BOSSET, J. O., 2002. Key Odorants in Various Cheese Types as Determined by Gas Chromatography-Olfactometry. *International Dairy Journal*, 12: 959–984.
- ÇAĞLAR, A., TÜRKÖĞLU, H. ve ÇAKMAKÇI, S., 1996. Urfa Peynirinin Yapılışı ve Bileşimi Üzerinde Araştırmalar. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*. 10(13): 115-124.
- ÇAKMAKÇI, S., DAGDEMİR, E., HAYALOĞLU, A. A., GÜRSES, M. AND GÜNDOĞDU, E., 2008. Influence of Ripening Container on the Lactic Acid Bacteria Population in Tulum Cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 293-299.
- de ANGELIS, M., CORSETTI, A., TOSTI, N., ROSSI, J., CORBO, M. R. and GOBBETTI, M., 2001. Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria From Italian Ewe Cheeses Based On Phenotypic, Genotypic and Cell Wall Protein Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2011-2020.
- de LLANO, D., RODRIGUEZ, A. and CUESTA, P., 1996. Effect of Lactic Starter Cultures on the Organic Acid Composition of Milk and Cheese During Ripening-Analysis by HPLC. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 570-576.

- de VOS, W. M., 1996. Metabolic Engineering of Sugar Catabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie von Leeuwenhoek*, 70: 223–242.
- di CAGNO A, R., BANKS, B, J., SHEEHAN, C, L., FOX, P. F., BRECHANY, B, E. Y., CORSETTI, D, A and GOBBETTIA, M., 2003. Comparison of the Microbiological, Compositional, Biochemical, Volatile Profile and Sensory Characteristics of Three Italian PDO Ewes' Milk Cheeses. *International Dairy Journal*, 13: 961–972.
- DIMOS, A., URBACH, G. E. and MILLER, A. 1., 1996. Changes in Flavor and Volatiles of Full Fat and Reduced-Fat Cheddar Cheeses During Maturation. *International Dairy Journal*, 6: 981-995.
- DOI, E., SHIBATA, D. and METOBA, T., 1981. Modified Colorimetric Ninhydrin Methods for Peptidase Assay. *Analytic Biochemistry*, 118: 173–184
- DOLCI, P., ALESSANDRIA, V., ZEPPA, G., RANTSIOU, K. and COCOLIN, L., 2008. Microbiological Characterization of Artisanal Raschera PDO Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 25: 392-399.
- DUAN, Y., TAN, Z., WANG, Y., LI, Z., QIN, G., HUO, Y. and CAI , Y., 2008. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tibetan Qula Cheese. *Journal of General and Applied Microbiology*, 54:51-60.
- DUMONT, J. P., ADDA, J. and ROUSSEAUX, P., 1981. Example of Aroma Variation Within the Same Cheese: Gruyère de Comté. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 14: 198–202
- DURLU-OZKAYA, F., XANTHOPOULOS, V., TUNAIL, N. and LITOPOULOU-TZANETAKI, E., 2001. Technology Important Properties of Lactic Acid Bacteria Isolates from Beyaz Cheese Made from Raw Ewe's Milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 861-870.
- DUTHOIT, F., GODON, J. J. and MONTEL, M. C., 2003. Bacterial Community Dynamics During Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16 s RNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3840–3848
- EL-BARADEI, G., DELACROIX-BUCHET, A. and OGIER, J-C., 2007. Biodiversity of Bacterial Ecosystems in Traditional Egyptian Domiati Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1248-1255.
- ELDAR, A., GORIA, M., GHITTINO, C., ZLOTKIN, A. and BERCOVIER, H., 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Starins Isolated from Fish in Europe, Asia and Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1005-1008.
- ESTEPAR, J., SANCHEZ, M. M., ALONSO, L. and MAYO, B., 1999. Biochemical and Microbiological Characterization of Artisanal “Peñamellera” Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 9: 737–746
- FAJARDO-LIRA, C., GARCIA-GARIBAY, M., WACHER-RODARTE, C., FARRES, A. and MARSHALL, V. M. E., 1997. Influence of Water Activity on the Fermentation of Yogurt Made with Extracellular Polysaccharide-Producing or Non-Producing Starters. *International Dairy Journal*, 7: 279–281.

- FALLICO, V., MCSWEENEY, P. L. H., SIEBERT, K. J., HORNE, J., CARPINO, S. ve LICITRA, G., 2004. Chemometric Analysis of Proteolysis During Ripening of Ragusano Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 3138-3152.
- FALLICO, V., TUMINELLO, L., PEDILIGGIERI, C., HORNE, J., CARPINO, S. and LICITRA, G., 2006. Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese Made Using Different Farm Technologies. *Journal of Dairy Science*, 89: 37–48
- FERNANDEZ-GARCIA, E., CARBONELL, M. and NUNEZ, M., 2002. Volatile Fraction and Sensory Characteristics of Manchego Cheese. 2. Seasonal Variation. *Journal of Dairy Research*, 69: 595–604.
- FLOREZ, A. B., LOPEZ-DIAZ, M. T., ALVAREZ M. P. and MAYO, B., 2006. Microbial Characterization of the Traditional Spanish Blue-Veined Cabrales Cheese: Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria. *European Food Research Technology*, 223: 503-508.
- FOLKERTSMA, B. and FOX, P. F., 1992. Use of the Cd-Ninhydrin Reagent to Assess Proteolysis in Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Research*, 59: 217–224
- FORTINA, M. G., RICCI, G., ACQUATI, A., ZEPPA, G., GANDINI, A. and MANACHINI, P. L., 2003. Genetic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Occuring in an Artisanal Protected Domination Origin (PDO) Italian Cheese, Toma Piemontese. *Food Microbiology*, 20: 397-404.
- FORTINA, M. G., RICCI, G., FOSCHINO, R., PICOZZI, C., DOLCI, P., ZEPPA, G., COCOLIN, L. and MANACHINI, P. L., 2007. Phenotypic Typing, Technological Properties and Safety Aspects of *Lactococcus garvieae* Strains from Dairy Enviroments. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 445-453.
- FOX, P.F., 1987. Significance of Salt in Cheese During Ripening. *Dairy Industries International*. 52: 19-22.
- FOX, P. F., 1989. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *Journal Dairy Science*, 72: 1379-1400.
- FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. and LYNCH, C. M., 1998. Significance of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Cheddar Cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 53: 83–88.
- FRANCIOSI, E., SETTANNI, L., CAVAZZA, A. and POZNANSKI, E., 2008. Biodiversity and Technological Potential of Wild Lactic Acid Bacteria from Raw Cow's Milk. *International Dairy Journal*, 19: 3-11.
- FRENGOVA, G. I., SIMOVA, E. D., BESHKOVA, D. M. and SIMOV, Z. I., 2000. Production and Monomer Composition of Exopolysaccharides by Yogurt Starter Culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 1123–1127.
- GALLOIS, A. and LANGLOIS, D., 1990. Volatile Compounds of French Blue Cheeses. *Le Lait*, 70: 89–106.
- GARDE, S., TOMILLO, J., GAYA, P., MEDINA, M. and NUN EZ, M., 2002. Proteolysis in Hispa´nico Cheese Manufactured Using a Mesophilic Starter, a Thermophilic Starter, and Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* INIA 415 Adjunct Culture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:34793485
- GARDINER, G. E., ROSS, R. P., WALLACE, J. M., SCANLAN, F. P., JAEGER, P. P. J. M. and FITZGERALD, G. F., 1999. Influence of a Probiotic Adjunct

- Culture of *Enterococcus faecium* on the Quality of Cheddar Cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4907–4916.
- GIRAFFA, G., ROSSETTI, L. and NEVIANI, E., 2000. An Evaluation of Chelex-Based DNA Purification Protocols for the Typing of Lactic Acid Bacteria. Journal of Microbiological Methods, 42: 175–184
- GIRAFFA, G. 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. International Journal of Food Microbiology, 88: 215– 222.
- GIRAFFA, G. and ROSSETTI, L., 2004. Monitoring of the Bacterial Composition of Dairy Starter Cultures by RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters, 237: 133–138.
- GOBBETTI, M., MOREA, M., BARUZZI, F., CORBO, M. R., MATARANTE, A., CONSIDINE, T., di CAGNO, R., GUINEE, T. and FOX, P.F., 2002. Microbiological, Compositional Biochemical and Textural Characterisation of Caciocavallo Pugliese Cheese During Ripening. International Dairy Journal, 12: 511-523.
- GOMEZ, M. J., GARDE, S., GAYA, P., MEDINA, M. and NUNEZ, M., 1997. Relationship Between Levels of Hydrophobic Peptides and Bitterness in Cheese Made from Pasteurized and Raw Milk. Journal of Dairy Research, 64: 289–297.
- GONZALES, L., SANDOVAL, H., SACRISTAN, N., CASTRO, J. M., FRESNO, J.M. and TORNADIJO, M.E., 2007. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Genestoso Cheese Throughout Ripening and Study of Their Antimicrobial Activity. Food Control, 18: 716-722.
- GRAPPIN, R., RANK, T. C. ve OLSON, N. F., 1985. Primary Proteolysis of Cheese Proteins During Ripening. A Review. Journal of Dairy Science, 68: 531-540.
- GRAPPIN, R. and BEUVIER, E., 1997. Possible Implications of Milk Pasteurization on the Manufacture and Sensory Quality of Ripened Cheese. International Dairy Journal, 7: 751-761.
- GRIPON J. C., DESMAZEAUD, M. J., BARS, D. and BERGERE, J. L., 1975. Etude du Role des Microorganismes et des Enzymes au Cours de la Maturation des Fromages. Le Lait, 55: 502-516.
- GROBBEN, G. J., BOELS, I. C., SIKKEMA, J. and DEBONT J. A. M., 2000. Influence of Ions on Growth and Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Journal of Dairy Science, 67: 131–135.
- HASSAN, A. N., CORREDIG M., FRANK, J. F., and ELSODA, M., 2004. Microstructure and Rheology of an Acid-Coagulated Cheese (Karish) Made with an Exopolysaccharide-Producing ***Streptococcus thermophilus*** Strain and its Exopolysaccharide Non-Producing Genetic Variant. Journal of Dairy Research, 71: 116-120.
- HAYALOĞLU, A. A., GÜVEN, M. ve FOX, P.F. 2002. Microbiological, Biochemical and Technological Properties of Turkish White Cheese ‘Beyaz Peynir’. International Dairy Journal, 12: 635-648.
- HAYALOĞLU, A. A., GUVEN, M., FOX, P. F., HANNON, J. A. and MCSWEENEY P. L. H., 2004. Proteolysis in Turkish White-Brined Cheese Made with Defined Strains of *Lactococcus*. International Dairy Journal, 14: 599-610.

- HAYALOĞLU, A. A., GUVEN, M., FOX P.F., ve MCSWEENEY P.L.H., 2005. Influence of Starters on Chemical, Biochemical, and Sensory Changes in Turkish White-Brined Cheese During ripening. *Journal of Dairy Science*, 88:3460-3474.
- HAYALOĞLU, A. A. ve BRECHANY, E.Y., 2007. Influence of Milk Pasteurization and Scalding Temperature on the Volatile Compounds of Malatya, A Farmhouse Halloumi-Type Cheese. *Lait*, 87:39-57.
- HAYALOĞLU, A. A., ÇAKMAKÇI, S., BRECHANY, E.Y., DEEGAN, K.C. and MCSWEENEY P.L.H., 2007. Microbiology, Biochemistry, and Volatile Composition of Tulum Cheese Ripened in Goat's Skin or Plastic Bags. *Journal of Dairy Science*, 90:1102-1121.
- HAYALOĞLU, A. A., 2009. Türkiye'de Ekonomik Değeri Olan Önemli Bazı Peynir Çeşitlerinin Proteoliz, Lipoliz ve Aroma Yönünden Karakterizasyonu. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, İnönü Üniversitesi, Malatya, s:63.
- HEBERT, E. M., RAYA, R. R., TAILLIEZ, P. and DE GIORI, G. S., 2000. Characterization of Natural Isolates of *Lactobacillus* Strains to be Used as Starter Cultures in Dairy Fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 59:19-27.
- HERREROS, M.A., FRESNO, J.M., PRITETO, J.M. and TORNADIJO, M.E., 2003. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria (Spanish Goat's Milk Cheese). *International Dairy Journal*, 13: 469-479.
- HESARI, J., EHSANI, M. R., KHOSROSHAHI, A. and MCSWEENEY, P. L. H., 2006. Contribution of Rennet and Starter to Proteolysis in Iranian UF White Cheese. *Lait*, 86: 291–302.
- IZCO, J. M. and TORRE, P., 2000. Characterisation of Volatile Flavour Compounds in Roncal Cheese Extracted by the "Purge and TRAP" Method and Analysed by GC-MS. *Food Chemistry*, 70: 409–417.
- JACK, R. W., TAGG, J. R. and BIBEK R., 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *American Society for Microbiology*, 59: 171–200.
- KANDARAKIS, I ve MOATSOU, G. A., GEORGALA, I., KAMINARIDES, K. S. and ANIFANTAKIS, E., 2001. Effect of Draining Temperature on the Biochemical Characteristics of Feta Cheese. *Food Chemistry* 72: 369–378
- KARAKUŞ, M. ve ALPERDEN, I., 1992. Beyaz Peynirin Olgunlaşması Sürecinde Laktik Asit Bakterileri. *Gıda Dergisi*, 6: 34-47.
- KATSIARI, M. C., VOUSINAS, L. P., ALICHANIDIS, E. ve ROUSSIS, I. G. 2000. Proteolysis in Reduced Sodium Feta Cheese Made by Partial Substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 10: 635-646.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., and REUTER, G., 1998. Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125.
- KLIJIN, N., WEERKAMP, A. H., and de VOS, W., 1995. Detection and Characterization of Lactose-Utilizing *Lactococcus* spp. in Natural Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 788-792.
- KONDYLI, E., KATSIARI, M. C. MASSOURAS, T. and VOUSINAS, L. P., 2002. Free Fatty Acids and Volatile Compound of Low Fat Feta-Type Cheese Made with a Commercial Adjunct Culture. *Food Chemistry*, 79: 199-205.

- KUCHROO, C. N. and FOX, P. F., 1982. Soluble Nitrogen in Cheddar Cheese: Comparison of Extraction Procedures. *Milchwissenschaft*, 37: 331–335.
- LANE, C.N. and FOX, P.F., 1996. Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 6 :715–728.
- LARRÁYOZ, P., MARGHERITA, A., ROLAND, G., BOSSET, J. O., 2001. Comparison of Dynamic Headspace and Simultaneous Distillation Extraction Techniques Used for the Analysis of the Volatile Components in Three European PDO Ewes' Milk Cheeses. *International Dairy Journal*, 11: 911–926 .
- LARSEN, T. O. 1998. Volatile Flavour Production by *Penicillium caseifulvum*. *International Dairy Journal*, 8: 883-887.
- LAU, K.Y., BARBANO, D. M. and RASMUSSEN , R. R., 1991. Influence of Pasteurization of Milk on Protein Breakdown in Cheddar Cheese During Aging. *Journal of Dairy Science*, 74: 727–740.
- LEE B. H., LALEYE L. C., SIMARD R. E., MUNSCH M. H., HALLEY R. A., 1990. Influence of Homofermentative *Lactobacillus* on the Microflora and Soluble Nitrogen Components in Cheddar Cheese. *Journal of Food Science*, 55: 391–397.
- LEMIEUX, L. and SIMARD, R. E., 1992. Bitter Flavour in Dairy Products. II A Review of Bitter Peptides from Caseins: Their Formation, Isolation and Identification, Structure Masking and Inhibition. *Lait*, 72: 335-382.
- LIMSOWTIN, G. K. Y., POWELL, I. B. and PORENTE, E. 1996. Type of Starters. In: T. Cogan and J. Accolas, Editors, *Dairy Starters Cultures*, VCH Publishers, Inc., USA.
- LIMSOWTIN, G. K., BROOME, M. C. and POWELL, I. B. 2002. Lactic Acid Bacteria: Taxonomy. In: *Encyclopedia of Dairy Science*, Ed. H. Roginski. Elsevier Science, Cambridge, 1470–1478.
- LOPEZ-DIAZ, T. M., ALONSO, C., ROMAN, C., GARCIA-LOPEZ, M. L. and MORENO, B., 2000. Lactic Acid Bacteria Isolated from a Hand-Made Blue Cheese. *Food Microbiology*, 17: 23-32.
- MAMA, V., HATZIKAMARI, M., LOMBARDI, A., TZANETAKIS, N and LITOPOULOU-TZANETAKI, E., 2002. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Heterogeneity: the Diversity Among Strains Isolated from Traditional Greek Cheeses. *Italian Journal of Food Science*, 14: 351–362.
- MARIACA, R. G., BERGER T. F. H., GAUCH, R., IMHOF, M. I., JEANGROS, B and BOSSET, J. O., 1997. Occurrence of Volatile Mono- and Sesquiterpenoids in Highland and Lowland Plant Species as Possible Precursors for Flavour Compounds in Milk and Dairy Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 4423–4434 .
- MAS, M., TABLA, R., MORICHE, J., ROA, I., GONZALES, J., REBOLLO, E. J. and CACERES, P., 2002. Iborea Goat's Milk Cheese: Microbiological and Physicochemical Changes Throughout Ripening. *Lait*, 82: 579-587.
- MCAULIFFE, O., HILL, C. and ROSS, R. P., 2001. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action. *FEMS Microbiology*, 25: 285-308.
- MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F., LUCEY J. A., JORDAN, K. N., and COGAN, T. M., 1993. Contribution of the Indigenous Microflora to the Maturation of Cheddar Cheese. *International Dairy Journal*, 3: 613-634.

- MCSWEENEY, P. L. H. and FOX, P. F., 1997. Chemical Methods for the Characterisation of Proteolysis in Cheese During Ripening. *Lait*, 77: 41–76.
- MCSWEENEY, P. L. H. ve SOUSA, M. J., 2000. Biochemical Pathway for the Production of Flavour Compounds in Cheese During Ripening: A Review. *Lait*, 80: 293-324.
- MENDEZ, S., CENTENO, J. A., GODINEZ, R. and RODRIGUEZ-OTERO, J. L., 2001. Identification and Characterization of Enterococci and Micrococci Isolated from Tetilla Cheese Made From Raw Milk. *Alimentaria*, 38: 67–73.
- MOATSOU, G., KANDARAKIS, I., MOSCHOPOULOU, E., ANIFANTAKIS, E. and ALICHANIDIS, E., 2001. Effect of Technological Parameters on the Characteristics of Kasseri Cheese Made from Raw and Pasteurized Ewes Milk. *International Journal of Dairy Technology*, 54: 69–77.
- MOLIMARD, P. and SPINNLER, H. E., 1996. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, 79: 169–184.
- MOLINA, E., RAMOS, M. ALONSO, L. and LOPEZ-FANDINO, R., 1999. Contribution of Low Molecular Weight Water-Soluble Compounds to the Taste of Cheeses Made of Cows', Ewes', and Goats' Milk. *International Dairy Journal*. 9: 613–621
- MONSAN, P., BOZONNET, S., ALBENNE, C., JOUCLA, G., WILLEMOT, R. and REMAUD-SIMEON, M. 2001. Homopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 675–685.
- MORANDI, S., BRASCA, M., ANDRIGHETTO C., LOMBARDI, A. and LODI R., 2006. Technological and Molecular Characterization of Enterococci Isolated from North-West Italian Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16:867-875.
- MOREA, M., BARUZZI, F. and COCCONCELLI, P. S., 1999. Molecular and Physiological Characterization of Dominant Bacterial Populations in Traditional Mozzarella Cheese Processing. *Journal of Applied Microbiology*, 87:574-582.
- MÜLLER, T., 1990. Comparison of Methods for Differentiation Between Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *Zentralblatt Mikrobiologie*, 145: 363–366.
- NES, I.F., DIEP, D. B., HAVARSTEIN, L. S., BRURBERG, M. B., EIJSINK, V. and HOLO, H., 1996. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:113–128
- NORRIS, J. R., BERKELEY, RCW., LOGAN, N.A. and O'DONNELL, A. G., 1981. The Genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus* In: Starr, MP Stolp, H, Trüper, HG, Ballows, A and Schlegel, H.G. In *The Procaryotes vol II*. Springer Verlag, Berlin, 1711-1742
- O'KEEFFE, R.B., FOX, P. F., DALY, C., 1978. Proteolysis in Cheddar Cheese: Role of Coagulant and Starter Bacteria. *Journal of Dairy Research*, 45: 465–477.
- OUADGHIRI, M., AMAR, M., VANCANNEYT, M. and SWINGS, J., 2005. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Moroccan Soft White Cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251: 267-271.
- OUMER, A., E. FERNÁNDEZ-GARCÍA, SERRANO, C., and NUÑEZ, M., 2000. Flavour of Hispánico Cheese Manufactured with *Lactococcus lactis* subsp.

- lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* as Starter Cultures. *Milchwissenschaft*, 55: 325–328.
- ÖKSÜZTEPE, G., PATIR, B. and ÇALICIOĞLU M., 2005. Identification and Distribution of Lactic Acid Bacteria During the Ripening of Şavak Tulum Cheese. *Turk Journal of Veterinary and Animal Science*, 29: 873-879.
- ÖZER, B.H., ATASOY, A. F. ve AKIN, M.S., 2000. Pastörizasyon ve Haşlama İşlemlerinin Geleneksel Urfa Peynirlerinin Mikrobiyolojik ve Kimyasal Nitelikleri Üzerine Etkileri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Tekirdağ, 517-523 s.
- ÖZER, B. H., ROBINSON, R. K., and GRANDISON, A S., 2002a. Textural and Microstructural Properties of Urfa Cheese (a White-Brined Turkish cheese). *International Journal of Dairy Techonology*, 56: 171-176.
- ÖZER, B. H., YETİŞMEYEN, A., URAZ, G., AKIN, S., ATASOY, F. ve DEVECİ, O. 2002b. Ultrafiltrasyon Tekniği ile Üretilen Urfa Peynirlerinin Bazı Kalite Özellikleri ve Patojen Mikroorganizmaların Urfa Peynirinde Yaşam Süreleri. TÜBİTAK Proje Kesin Sonuç Raporu, TARP 2536, Ankara, 174 sayfa.
- ÖZER, H. B., URAZ, G., YILMAZ, E. B., and ATASOY, A. F., 2004. The Effects of Brine Concentration and Scalding on Survival of Some Pathogens in Urfa Cheese: a Traditional White-Brined Turkish Cheese. *International Journal of Food Science and Techonology*, 39:727-735.
- ÖZER, B., 2006. Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Sidas Yayıncılık, İzmir, s. 1–10.
- ÖZER, B., 2007a. Introduction to Lactic Acid Bacteria. pp. 1–14. In: *Metabolism and Applications of Lactic Acid Bacteria*, Ed. B. Özer. Research Signpost Publ., Kerala.
- ÖZER, B., 2007b. Lactose Metabolism in Yogurt Starter Bacteria. pp. 129–156. In: *Metabolism and Applications of Lactic Acid Bacteria*, Ed. B. Özer, Research Signpost, Kerala.
- PAOLA, D., VALENTINA, A., GIUSEPPE, Z., KALLIOPI, R. and COCOLIN, L., 2007. Microbiological Characterization of Artisanal Raschera PDO Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 25 :392-399.
- PARANTE, E., ROTA, M. A., RICCIARDI, A. and CLEMENTI, F., 1997. Characterization of Natural Starter Cultures Used in the Manufacture of Pasta Filata Cheese in Basilicata (Southern Italy). *International Dairy Journal*, 7: 775-783.
- PAVIA, M., TRUJILLO, A. J., GUAMIS, B., and FERRAGUT, V., 2000. Ripening Control of Salt-Reduced Manchego-Type Cheese Obtained by Brine Vacuum- Impregnation. *Food Chemistry*, 70: 155-162.
- PEREZ, G., CARDELL, E., and ZARATE, V., 2003. Techonological Characterization of Lactic Acid Bacteria From Tenerife Cheese. *International Journal of Food Science and Techonology*, 38: 537-546.
- PIRAINO P., ZOTTA, T., RICCIARDI, A. and PARENTE, E., 2005. Discrimination of Commercial Caciocavallo Cheeses on the Basis of the Diversity of Lactic Microflora and Primary Proteolysis. *International Dairy Journal*, 15: 1138-1149.
- PISANO, B. M., FADDA, E. M., DEPLANO, M., CORDA, A. and COSENTINO, S. 2006. Microbiological and Chemical Characterization of Fiore Sardo, a Traditional Sardinian Cheese Made from Ewe's Milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 171-179.

- POLYCHRONIADOU, A., 1994. Objective Indices of Maturity of Feta and Teleme Cheese. *Milchwissenschaft*, 49(7):376-379.
- POOLMAN, B., 1990. Precursor/Product Antiport in Bacteria. *Molecular Microbiology*, 4: 1629–1636.
- POVEDA, J. M., CABEZAS, L. and MCSWEENEY, P. L. H., 2004. Free Amino Acid Content of Manchego Cheese Manufactured with Different Starter Cultures and Changes Throughout Ripening. *Food Chemistry*, 84: 213–218
- POZNANSKI, E., CAVAZZA, A., CAPPA, F. and COCCONCELLI, P.S., 2004. Indigenous Raw Milk Microbiota Influences the Bacterial Development in Traditional Cheese from an Alpine Natural Park. *International Journal of Food Microbiology*, 92:141-151.
- PRIPP, A. H., UR REHMAN, S., MCSWEENEY, P. L. H., SORHAUG, T., and FOX, P. F., 1999. Multivariate Statistical Analysis of Peptide Profiles and Free Fatty Acids to Evaluate Effects of Single Strain Starters on Proteolysis in Miniature Cheddar Type Cheeses. *International Dairy Journal*, 9: 473-479.
- PRITCHARD, G. G. and COOLBEAR, T., 1993. The Physiology and Biochemistry of the Proteolytic System in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 179–206.
- RANDAZZO, L.C., VAUGHAN, E. E. and CAGGGIA, C., 2006. Artisanal and Experimental Pecorino Siciliano Cheese: Microbial Dynamics During Manufacture Assessed by Culturing and PCR-DGGE Analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 1-8.
- REA, M. C., and COGAN, T. M., 2003. Glucose Prevents Citrate Metabolism by *Enterococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 201–206.
- RODRIGUEZ, J.M., CINTAS, L.M., CASAUS, P., HORN, N., DODD, H.M., HERNANDEZ ,P.E. and GASSON, M.J., 1995. Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains from Dry Fermented Sausages, *Journal of Applied Bacteriology* 78: 109–115.
- ROSS, R.P., GALVIN, M., MCAULIFFE O., MORGAN, S. F., RYAN, M.P., TWOMEY, D.P., MEANEY, W.J. and HILL, C., 1999. Developing Applications for Lactococcal Bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 337-346.
- ROSS, R.P., STANTON, C., HILL, C., FITZGERALD, G.F., and COFFEY, A., 2000. Novel Cultures for Cheese Improvement. *Trends in Food Science Technology*, 11: 96-104.
- RYNNE, N. M., BERESFORD, T. P., KELLY, A.L. and GUINEE, T.P., 2004. Effect of Milk Pasteurization Temperature and in situ Whey Protein Denaturation on the Composition, Texture and Heat-Induced Functionality of Half-Fat Cheddar Cheese. *International Dairy Journal*, 14: 989–1001.
- SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N. and HAVRANEK, J.L., 2001. Taxonomy, Physiology and Growth of *Lactococcus lactis*: A Review. *Mljekarstvo*, 51: 35–48.
- SANCHEZ, I., SESENA, S., POVEDA, M. J., CABEZAS, L. and PALOP, L. 2005. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Lactobacilli* Isolated from Spanish Goat Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 355-362.

- SARANTINOPOULOS, P., KALANTZOPOULOS, G. and TSKALIDOU, E., 2001. Citrate Metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E229. Applied and Environmental Microbiology, 67: 5482-5487.
- SARANTINOPOULOS, P., KALANTZOPOULOS, G. and TSAKALIDOU, E., 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Greek Feta Cheese. International Journal of Food Microbiology, 76: 93-105.
- SCHILLINGER, U. and LUCKE, F.K., 1987. Identification of *Lactobacilli* from Meat and Meat Products. Food Microbiology, 4: 199-208.
- SCHLEIFER, K. H. and BALZ, K. R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* com. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 34: 31-34.
- SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BALZ, R., COLLINS, M.D. and FISCHER, W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related *Streptococci* to the Genus *Lactococcus* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, 6: 183-195.
- SHALABI, S. I. and FOX, P. F., 1987. Electrophoretic Analysis of Cheese: Comparison of Methods. Irish Journal of Food Science Technology, 11: 135-151.
- SHARP, M.E., 1979. Identification of the Lactic Acid Bacteria. In: F.A. Skinner and D.W. Lovelock, Editors. Identification Methods for Microbiologists, Academic Press, London, pp. 244-259.
- SHIUFÉ, G.A., ZORRILLA, S.E. ve RUBIÓLO, A.C., 2010. The Influence of Ripening Temperature and Sampling Site on the Proteolysis in Reggiano Argentino Cheese. LWT Food Science and Technology, 43: 247-253.
- SINHA, R.P., 1991. Effect of Carbohydrate on Viability of *Streptococcus thermophilus*. Journal of Food Protection, 54: 537-541.
- SOUSA, M. J., ARDÖ, Y. and MCSWEENEY, P. L. H., 2001. Advances in the Study of Proteolysis During Cheese Ripening. International Dairy Journal, 11: 327-345.
- STILES, M. E. and HOLZAPFEL, W. H., 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36: 1-29.
- SUZZI, G., LOMBARDI, A., LANORTE, M.T., CARUSO, M., ANDRIGHETTO, C. and GARDINI, F., 2000. Phenotypic and Genotypic Diversity of Yeasts Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. Journal of Applied Microbiology, 88: 117-123.
- SWEARINGEN, A., P., O'SULLIVAN, D. J. and WARTHESEN, J. J., 2001. Isolation, Characterization and Influence of Native Nonstarter Lactic Acid Bacteria on Cheddar Cheese Quality. American Dairy Science Association, 84:50-59.
- ŞAHAN, N., VAR, I. ve AKIN, S.M., 1998. Taze Urfa Peynirlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri ve Bazı Patojen Bakterilerin Aranması. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 21-22 Mayıs, Tekirdağ, MPM Yayınları, 621: 315-327.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S. and WANNAMAKER, L.W., 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Bacteriological Reviews, 40: 722-756.

- TAMIME, A.Y. and ROBINSON, R. K., 2007. Historical Background. In: Yoghurt Science and Technology. Woodhead Publishing, Cambridge. pp. 1–12
- TAVARIA, F. K. and MALCATA, F. X., 2000. Microbiological Characterization of Serra da Estrela Cheese Throughout Its AOP Region. *Journal of Food Protection*, 61: 601–607.
- TERZIC-VIDOJEVIC, A., VUKASINOVIC, M., VELIJOVIC, K., OSTOJIC, M. and TOPISIROVIC, L., 2007. Characterization of Microflora in Homemade Semi-Hard White Zlata Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 36–42.
- TORRES-LLANEZ, M. J., VALLEJO-CORDOBA, B., DIAZ-CINCO, M. E., MAZORRA-MANZANO, M. A. and GONZALEZ-CORDOVA A. F., 2006. Characterization of the Natural Microflora of Artisanal Mexican Fresco Cheese. *Food Control*, 17: 683–690.
- TRUJILLO, A. J., CAPELLAS, M. SALDO, J., GERVILLA, R. and GUAMIS, B., 2002. Applications of High-Hydrostatic Pressure on Milk and Dairy Products: A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 295–307.
- TUNAİL, N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti., Ankara, 434 s.
- URAZ, T., 1979. Peynirlerde Acı Tadın Oluşumu. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No: 730. Ankara. 13 s.
- URAZ, G., COSKUN, S. and ÖZER, B., 2008. Microflora and Pathogen Bacteria (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) In Urfa Cheese (A Traditional White-Brined Turkish Cheese). *Pakistan Journal of Nutrition*, 7: 630–635.
- van BELKUM, M. J., HAYEMA, B., GEİS, A., KOK, J. and VENEMA, G., 1989. Cloning of Two Bacteriocin Genes from a *Lactococcal* Bacteriocin Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1187–1191.
- VELIJOVIC, K., TERZIC-VIDOJEVIC, A., VUKASINOVIC, M., STRAHINIC, I., BEGOVIC, J., LOZO, J., OSTOJIC, M. and TOPISIROVIC, L. 2007. Preliminary Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Zlata Cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2141–2152.
- VERNILE, A., GIAMMANCO, G., SPANO, G., BERESFORD, P. T., FOX, P.F. and MASSA, S., 2008. Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Pecorino Siciliano cheese. *Dairy Science Technology*, 88: 619–629.
- VIALON, C., MARTIN, B., VERDIER-METZ, I., PRADEL, P. GAREL, J.P., COULON, J. B. and BERDAGUE, J. L., 2000. Transfer of Monoterpenes and Sesquiterpenes from Forages into Milk Fat. *Lait*, 80: 635–641.
- VICENTE, M. S., IBÁÑEZ, F. C., BARCINA, Y. and BARRON, L. J. R., 2001. Changes in the Free Amino Acid Content During Ripening of Idiazabal cheese: Influence of Starter and Rennet Type. *Food Chemistry*, 72: 309–317.
- VILLANI, F. and COPPOLA, S., 1994 Selection of Enterococcal Strains for Water-Buffered Mozzarella Cheese Manufacture. *Annals of Microbiology and Enzymology*, 44: 97–105.
- VILLANI, F., APONTE, M., BLAIOTTA, G., MAURIELLO, G., PEPE O. and MOSCHETTI, G., 2001. Detection and Characterization of a Bacteriocin, Garviecin L1-5, Produced by *Lactococcus garvieae* Isolated From Raw Cow's Milk. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 430–439

- WHITTENBURY, R., 1964. Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 35: 13-26.
- YETİŞMEYEN, A. ve YILDIZ, F. 2001. Ankara Piyasasında Satılan Urfa Peynirlerinin Mikrobiyolojik, Kimyasal ve Duyusal Niteliklerinin Saptanması. GAP II.Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, 259-268.
- ZEPPA, G., FORTINA, M. G., DOLCI, P., ACQUATI, A., GANDINI, A. and MANACHINI, P. L., 2004. Characterization of Autochthonous Lactic Acid Bacteria from an Artisanal Italian Cheese. *Acta Agriculture Slovenica*, 84: 3-9.
- ZOURARI, A., ACCOLAS, J. P. and DESMAZEUD, M. J. 1992. Metabolism and Biochemical Characteristics of Yoghurt Bacteria: A review. *Lait*, 72: 1–34.

ÖZGEÇMİŞ

1978 Yılında Rize’de doğdu. İlk öğrenimini Ankara Demetevler ilk öğretim okulunda, orta öğrenimini TED Ankara Kolejinde tamamladı. 1998 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümüne girdi. 2002 yılında aynı bölümden Ziraat Mühendisi unvanıyla mezun oldu. 2002 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2005 yılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Süt Teknolojisi Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimini tamamladı.

ÖZET

Bu çalışmada biyokimyasal, fenotipik ve genotipik yöntemler yardımı ile çiğ koyun sütünden geleneksel olarak üretilen Urfa peynirlerinde hakim laktik floranın suş düzeyinde karakterizasyonunun yapılması ve endüstriyel düzeyde Urfa peyniri üretiminde kullanılabilir olacak özgün starter kültür çeşidinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; Şanlıurfa ilinin 4 farklı bölgesinden geleneksel olarak üretilen taze peynir örnekleri (n=20) toplanmış ve 3 ay olgunlaştırılmıştır. Olgunlaşma dönemi sonunda peynir örneklerinde yer alan bakteri izolatlarının (n=180) fenotipik testler ve 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanması ve sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir. İzole edilen tüm suşların asit ve bakteriyosin üretim yetenekleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında, peynir örneklerinde oransal olarak en yaygın bulunan 3 laktokok (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* (suş no:62), *Lactococcus garvieae* (suş no:44), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (suş no:63) izolatu starter kültür olarak kullanılarak Urfa peyniri üretilmiştir. Depolama süresince deneme peynirinin kimyasal ve duyu özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuştur:

- 143 izolatın %48.95'inin *Enterococcus* spp., %40.55'inin *Lactococcus* spp., %9.10'unun *Lactobacillus* spp., %0.69'unun *Streptococcus* spp., %0.69'unun ise *Leuconostoc* spp. türüne ait olduğu belirlenmiştir. En baskın tür olarak tespit edilen enterokokların %40.0'ı *Enterococcus faecium*, %32.8'i *E. durans*, %18.5'i *E. faecalis*; laktokokların %62.71'i *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, %30.50'si ise *Lactococcus garvieae* olarak sınıflandırılmıştır.
- Tanımlaması yapılan izolatlardan laktokokların büyük bir çoğunluğunun % 6.5 NaCl gelişim göstererek laktokoklar için atipik özellik gösterdiği, bu durumun Urfa peynirinin tuz içeriği yüksek salamurada depolanması sonucu tuza dirençli bakterilerin ortama hakim olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Tuza dirençli suşların endüstriyel üretimde starter kültür olarak kullanımlarının önemli avantajları olacağı düşünülmektedir.

- 90 gün olgunlaştırılan peynirlerde depolama süresince kimyasal analizler yapılmış ve elde edilen sonuçlar önceki çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Toplam kurumadde, kurumaddede yağ, kurumaddede tuz içeriklerinde belirlenen farklılıklar peynir üretiminde kullanılan süt bileşimi ve salamura tuz konsantrasyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür.
- Depolama süresince deneme peynirinin proteoliz düzeyinin belirlenmesinde Üre-PAGE elektroforez, RP-HPLC ve toplam serbest amino asit analizleri yapılmıştır. Depolamanın 90. gününde α_{s1} -kazein parçalanma ürünlerinin açığa çıktığı, olgunlaşma periyodunda hem hidrofilik hem de hidrofobik peptitlerin konsantrasyonunda artış meydana geldiği, toplam serbest amino içeriğinde de depolama süresince sınırlı ancak düzenli bir artış olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar piyasa örnekleri ile karşılaştırıldığında deneme peynirimizde meydana gelen proteoliz düzeyinin piyasa örneklerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir.
- Deneme peynirinde depolama süresince 15 keton, 14 alkol, 13 aldehit, 12 metil ester, 3 terpen, 2 asit ve 7 diğer bileşenler olmak üzere toplam 66 farklı uçucu aroma bileşiği tespit edilmiştir. Genel olarak depolama süresince uçucu aroma bileşiklerinin konsantrasyonunda artışlar gözlenmiştir.
- Duyusal değerlendirmeler sonucunda deneme peynirinin geleneksel olarak üretilen peynirlerden görünüş, renk ve koku yönünden daha iyi puanlar aldığı, aroma yönünden ise daha düşük puan aldığı saptanmıştır.

SUMMARY

In this study, characterization of dominant strains of lactic flora in traditional Urfa cheese made from sheep's milk, was done using biochemical, phenotypic and genotypic methods. Selection of the promising species and strains of lactic acid bacteria for the purpose of development of novel starter culture candidates was the paramount aim of the present study. For this purpose, 20 fresh Urfa cheese samples were collected from 4 different regions of Şanlıurfa province and the cheeses were stored under controlled conditions for a period of 3 months. Isolates were classified using phenotypic tests and 16S rDNA sequence analysis. Acidification and bacteriocin production abilities were also determined for each isolate. Three lactococcus isolates (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* (strain no:62), *Lactococcus garvieae* (strain no:44), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (strain no:63) were used as candidate starter culture in the production of Urfa cheese. During ripening period, chemical and organoleptic properties were investigated. In summary, the following results were obtained during the present work:

- The percentage distributions of the lactic acid bacteria isolated were as follows: 48.95% *Enterococcus* spp., 40.55 % *Lactococcus* spp., 9.10 % *Lactobacillus* spp., 0.69 % *Streptococcus* spp. and 0.69% *Leuconostoc* spp. Among the *Enterococcus* spp. *Enterococcus faecium* (40 % of total enterococcus strains) was the most frequently present species, followed by *E. durans* (32.85 %), *E. faecalis* (18.57 %), respectively. *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (62.71 % of total lactococcus species) and *Lactococcus garvieae* (30.50 %) were the most frequently present lactococci.
- The majority of lactococcal isolates showed an atypical phenotypic character as they grew in the presence of % 6.5 NaCl. Due to the high salt content of Urfa cheese, the salt resistant lactococcal isolates were thought to become dominant. Use of salt-resistant strains in industrial cheese production as a starter cultures were evaluated to be advantageous.

- During 90 days of storage, chemical analysis were carried out and the results of the experimental cheese were compared with previous studies. The differences in total dry matter, total fat-in-dry matter and total salt-in-dry matter contents were thought to be resulted from the differences in milk composition and brine concentration.
- To determine the level of proteolysis during ripening period of the experimental cheese, urea-PAGE electrophoresis, RP-HPLC and total free amino acid analysis were carried out. Urea-PAGE electrophoretograms revealed that at the end of ripening period, α_{s1} -casein degradation products became visible. The peptide profile of the cheese sample as determined by RP-HPLC during ripening period showed that both hydrophilic and hydrophobic peptide concentrations were increased. Accordingly, total free amino acid content was increased to a limited extend during ripening period. Results revealed that the development of proteolysis in Urfa cheese was rather limited, compared with the market samples.
- During storage period, in total 66 different volatiles (15 ketones, 14 alcohols, 13 aldehydes, 12 methyl esters, 3 terpenes, 2 acids and 7 to other components) were identified. In general, during storage period, an increase in the concentration of volatile aroma compounds was observed.
- According to the organoleptic evaluations, the experimental cheese received higher sensory scores in terms of appearance, color and smell than traditionally produced Urfa cheese. On contrary, the aroma scores of the experimental cheese were found to be lower than that of the market samples.