T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEYNİRLERDE GEÇ ŞİŞME ETMENİ *CLOSTRIDIUM* TÜRLERİNİN KORUYUCU LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İLE ENGELLENMESİ

Fatma Nur DEMİRBAŞ

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Prof. Dr. Muhammet ARICI

Eş Danışman

Doç. Dr. Enes DERTLİ

Temmuz, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEYNİRLERDE GEÇ ŞİŞME ETMENİ *CLOSTRIDIUM* TÜRLERİNİN KORUYUCU LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İLE ENGELLENMESİ

Fatma Nur DEMİRBAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 21.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muhammet ARICI Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Doç. Dr. Enes DERTLİ Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR, Üye
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi _____

Doç. Dr. FATİH TÖRNÜK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. YUNUS EMRE TUNÇİL, Üye
Necmettin Erbakan Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Muhammet ARICI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Peynirlerde geç şişme etmeni *Clostridium* türlerinin koruyucu laktik asit bakterileri ile engellenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fatma Nur DEMİRBAŞ

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FBA - 2021 - 4098 numaralı projesi ile finanse edilmiştir. Fatma Nur DEMİRBAŞ YÖK 100/2000 Gıda - Metabolizma Etkileşim alanında Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2211/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Burs Programları tarafından desteklenmiştir.

Aileme,

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI ve eş danışman hocam Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye,

Tez izleme komitemde yer alarak görüş ve önerileri ile katkı sağlayan Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ ve Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a,

Tez jüri üyelerim Doç. Dr. Yunus Emre TUNÇİL ve Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK'e,

Çalışmalarım boyunca her aşamada yardımcı olan tecrübeleriyle bana yol gösteren Öğr. Gör. Dr. Hümeyra İSPİRLİ'ye,

Doktora çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen Burcu YAŞAR KAHRAMAN'a, Arş. Gör. Selma KAYACAN ÇAKMAKOĞLU ve Arş. Gör. Kader KORKMAZ'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne,

2211/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Burs Programı ile bana destek olan TÜBİTAK'a,

ve Maddi-manevi olarak destekleri ile her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler.

Fatma Nur DEMİRBAŞ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xii

TABLO LİSTESİ xiv

ÖZET xvi

ABSTRACT 18

1 GİRİŞ 20

1.1 Literatür Özeti 20

1.2 Tezin Amacı 21

1.3 Hipotez 23

2 GENEL BİLGİLER 24

2.1 Peynir ve Mikrobiyatası 24

2.1.1 Starter Laktik Asit Bakterileri 26

2.1.2 Starter Olmayan Laktik Asit Bakterileri 27

2.1.3 Küfler ve Mayalar 27

2.1.4 Patojen Mikroorganizmalar 28

2.1.5 Peynirde İstenmeyen Kusurlara Sebep Olan *Clostridium* Türleri .. 29

2.2 Peynirde *Clostridium* Türlerinin Gelişimini Etkileyen Faktörler 34

2.2.1 pH 34

2.2.2 Starter Kültür 35

2.2.3 Tuz Konsantrasyonu 35

2.2.4 Sıcaklık 36

2.2.5 Mevsimsel Etki 36

2.3 *Clostridium* Türlerinin Kaşar ve Beyaz Peynirde Gelişiminin Engellenmesi 36

2.3.1 Mikrofiltrasyon ve Baktofugasyon Uygulaması 37

2.3.2 Peynire İşlenen Sütün Pastörizasyonu 38

2.3.3 Peynir Üretiminde Koruyucu Laktik Asit Bakterilerinin İlavesi 39

2.3.4 Peynire İşlenecek Süte Nitrat İlavesi 42

2.3.5 Peynire İşlenecek Süte Lizozim İlavesi 42

2.3.6 Bakteriyofaj Uygulaması 43

2.4 Dünya ve Türkiye'de Peynir Üretimi ve Tüketimi 44

3 MATERYAL VE METOT 48

3.1 Materyal 48
3.1.1 *Clostridium* Türlerinin İzolasyonu İçin Kullanılan Numuneler 48
3.1.2 Kullanılan Besiyerleri 50
3.1.3 PCR Aşamasında Kullanılan Sarflar 51
3.1.4 Peynir Üretiminde Kullanılan Bileşenler 51
3.2 Metot 53
3.2.1 *Clostridium* spp. Varlığının Belirlenmesi 53
3.2.2 *Clostridium* Türlerinin İzole Edilmesi 53
3.2.3 En Muhtemel Sayı (EMS) Metodu 53
3.2.4 Fenotipik Karakterizasyon 54
3.2.5 Kültür Stoklarının Oluşturulması ve İzolatların Saklanması 55
3.2.6 Genotipik Özelliklerin Belirlenmesi 55
3.2.7 Tanımlanan *Clostridium* Türlerinin En Muhtemel Sayı Yöntemi ile Sayımlarının Yapılması 58
3.2.8 LAB Şuşlarının Antiklostridial Aktivitesinin Belirlenmesi 58
3.2.9 LAB Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi 58
3.2.10 LAB Suşlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi 59
3.2.11 LAB'de Belirlenen Bakteriyosin veya Bakteriyosin Benzeri Maddelerin Ön Karakterizasyonu 60
3.2.12 Çiğ Sütte Uygulanan Analizler 61
3.2.13 Peynire İnoküle Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Hazırlanması 63
3.2.14 Peynire İnoküle Edilen *Cl. sporogenes* Sporlarının Hazırlanması 63
3.2.15 Kaşar Peyniri Üretimi 63
3.2.16 Beyaz Peynir Üretimi 68
3.2.17 Peynire Uygulanan Mikrobiyolojik Analizler 71
3.2.18 Peynire Uygulanan Fizikokimyasal Analizler 72
3.2.19 İstatistiksel Analiz 73
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 74
4.1 *Clostridium* spp. Varlığı 74
4.2 Peynir ve Yem Örneklerinden *Clostridium* İzolasyonu 74
4.3 İzolatlarının Tanımlanması 75
4.3.1 Bakterilerin Fenotipik Tanımlanması 75
4.3.2 RAPD PCR Analizi ile Genotipik Karakterizasyon 76
4.3.3 *Clostridium* Türlerinin 16S rRNA Gen Sekansı Sonuçları 77
4.3.4 İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik İlişkisi 78

4.3.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları 79
4.4 En Muhtemel Sayı Yöntemi Sonuçlarının Değerlendirilmesi..... 80
4.5 LAB Şuşlarının Antiklostridial Aktivitesinin Değerlendirilmesi 81
4.6 LAB Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi 83
4.7 LAB Suşlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Değerlendirilmesi 84
4.7.1 LAB İzolatlarının Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerinin Agar Kuyucuk Yöntemi ile Değerlendirilmesi 84
4.7.2 LAB İzolatlarının Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi 85
4.8 LAB'nin Bakteriyosin ve/veya Bakteriyosin Benzeri Maddelerin Ön Karakterizasyonu 92
4.8.1 Enzimin Etkisinin Değerlendirilmesi 92
4.8.2 pH'nın Etkisinin Değerlendirilmesi 94
4.8.3 Sıcaklık Etkisinin Değerlendirilmesi..... 99
4.9 Peynir Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Özellikleri 101
4.9.1 Laktobasillerin Sayısı 101
4.9.2 Laktokokların Sayısı 104
4.9.3 Anaerobik Sporların Sayısı..... 107
4.9.4 Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayısı..... 112
4.9.5 Küf ve Maya Sayısı..... 114
4.10 Peynir Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri..... 115
4.10.1 Kaşar ve Beyaz Peynir Örneklerinin pH Değerleri 115
4.10.2 Kaşar ve Beyaz Peynir Örneklerinin Titre Edilebilir Asitlik Değerleri 118
4.10.3 Kaşar ve Beyaz Peynir Örneklerinin Su Aktivitesi Değerleri 121
4.10.4 Kaşar Peynirinin Redoks Potansiyeli Değerleri..... 123
4.10.5 Beyaz Peynir Örneklerinin Kuru Madde Miktarı 125
4.10.6 Renk Özellikleri 126
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **130**
KAYNAKÇA **134**
A *CLOSTRIDIUM* TÜRLERININ 16S rDNA GEN DİZİLİMLERİ **154**
B LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT 16S rDNA GEN DİZİLİMLERİ **157**
C EMS Çizelgesi **164**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **165**

SİMGE LİSTESİ

a*	Kırmızılık
b*	Sarılık
cm	Santimetre
Eh	Redoks potansiyeli
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
L*	Parlaklık
log	Logaritma
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
%	Yüzde
±	Artı Eksi İşareti
× g	Yerçekimi İvmesi
°C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	American Type Culture Collection
BB	Bryant Burkey with Resazurin and Lactate Broth
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz Çifti
CFU	Colony Forming Unit
Cl.	*Clostridium*
CNM	Clostridial Nutrient Medium
CO_2	Karbondioksit
Da	Dalton
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNTP	Deoxynucleotide Triphosphates
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HTST	Yüksek Sıcaklıkta Kısa Süreli
IDF	Dünya Süt Zirvesi
kob	Koloni Oluşturan Birim
L.	*Lactobacillus*
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LB	Luria-Bertani
Lc.	*Lactococcus*
Leu.	*Leuconostoc*
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe
N	Azot
NA	Nutrient Agar

NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NJ	Neighbour-joining
NSLAB	Non Starter Laktik Asit Bakterileri
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PAB	Propiyonik Asit Bakterileri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCS	Plate Count Skim Milk Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Asitlik veya Bazlık Derecesini Gösteren Ölçü Birimi (Potansiyel hidrojen)
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RCM	Reinforced Clostridial Medium
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
S.	*Staphylococcus*
sa	Saat
SLAB	Starter Laktik Asit Bakterileri
sn	Saniye
ssp.	Subspecies
St.	*Streptococcus*
TAMB	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri
Taq	*Thermus Aquaticus*
TBE	Tris Base, Boric Acid and EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TTA	Titre Edilebilir Asitlik
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UF	Ultra Filtrasyon
USK	Ulusal Süt Konseyi
UV	Ultraviyole
V	Volt
WCA	Wilkins Chalgren Anaerobic Agar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1 Tez kapsamında toplanılan peynir ve yem örnekleri. 50

Şekil 3.2 Kaşar peyniri üretimi.....65

Şekil 3.3 Kaşar peyniri ile ilgili görseller çiğ süt (A), kontrol grubu (B), LAB ilaveli (D, F, J), *Clostridium*- Laktik Asit Bakterisi ilaveli (E, G, H), CL ilaveli (C, K).....67

Şekil 3.4 Beyaz peynir üretimi. 69

Şekil 3.5 Beyaz peynir ile ilgili görseller 70

Şekil 4.1 Gaz oluşumu gözlemlenen muhtemel *Clostridium* içerdiği kabul edilen örnekler. 74

Şekil 4.2 Gaz oluşumu gözlemlenmeyen *Clostridium* içermediği kabul edilen örnekler. 74

Şekil 4.3 İzole edilen bakterilerin Gram boyama görüntüsü.....75

Şekil 4.4 Muhtemel *Clostridium*'ların spor keselerinin görüntüsü. 75

Şekil 4.5 Katalaz pozitif ve katalaz negatif bakterilerinin katalaz testinin görüntüsü. 76

Şekil 4.6 Muhtemel *Clostridium*'ların spor boyama görüntüsü.....76

Şekil 4.7 *Clostridium* türlerinin GTG5 profili. 76

Şekil 4.8 16S geninin amplifikasyonuna ait agaroz jel (%1) görüntüsü. 77

Şekil 4.9 Peynir izolatlarının 16S rRNA sekanslarına ait filogenetik Neighbour-Joining metoduyla elde edilen dendogram. 79

Şekil 4.10 LAB'nin GTG5 profilini gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.....80

Şekil 4.11 LAB'nin GTG5 profilini gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.....80

Şekil 4.12 LAB'nin GTG5 profilini gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.....80

Şekil 4.13 LAB'nin *Cl. sporogenes*'e karşı antiklostridial etkileri. 83

Şekil 4.14 LAB izolatlarının bakteriyosin ve benzeri maddelerinin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmesi ile ilgili görseller. 85

Şekil 4.15 LAB izolatlarının bakteriyosin ve benzeri maddelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller. 92

Şekil 4.16 Seçilen bakterilerin enzim ile muamele edilmesi sonucunda inhibisyon zon çaplarının (mm) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.....93

Şekil 4.17 Seçilen bakterilerin farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çaplarının (mm) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.....99

Şekil 4.18 Seçilen bakterilerin farklı sıcaklık ve süreye ait inhibisyon zon çaplarının (mm) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.....101

Şekil 4.19 Kaşar peynirlerinin 4°C depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen değişim. 109

Şekil 4.20 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen değişim. 109

Şekil 4.21 Beyaz peynirin 4°C depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen değişim. 111

Şekil 4.22 Beyaz peynire ait depolama sırasında geç şişme olayına ait görseller.....111

Şekil 4.23 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında pH değişimi. 116

Şekil 4.24 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında pH değişimi. 116

Şekil 4.25 Beyaz peyniri depolama sırasında pH değişimi.....117

Şekil 4.26 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında titre edilebilir asitlik (%) değişimi. 119

Şekil 4.27 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında titre edilebilir asitlik (%) değişimi. 119

Şekil 4.28 Beyaz peynirlerin depolama sırasında titre edilebilir asitlik (%) değişimi. 120

Şekil 4.29 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında su aktivitesi değişimi. 122

Şekil 4.30 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında su aktivitesi değişimi. 122

Şekil 4.31 Beyaz peynirlerinin depolama sırasında su aktivitesi değişimi.....123

Şekil 4.32 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında oksidasyon redüksiyon potansiyeli değişimi. 124

Şekil 4.33 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında oksidasyon redüksiyon potansiyeli değişimi. 124

Şekil 4.34 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinin kuru madde değerleri(%). 126

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Süt ve süt ürünleri (süt kategorisine göre) yıllık üretim miktarı ve değişimi 2020, 2021 (TÜİK). 45

Tablo 2.1 Süt ve süt ürünleri (süt kategorisine göre) yıllık üretim miktarı ve değişimi 2020, 2021 (TÜİK) (devamı). 46

Tablo 2.2 Süt ve süt ürünleri (sertlik derecesine göre) üretimi, 2021 (TÜİK). ...46

Tablo 2.3 Toplanan inek sütü ile üretilen süt ürünleri miktarı (ton). 46

Tablo 2.4 Dünyada peynir üretiminde lider ülkeler. 46

Tablo 2.4 Dünyada peynir üretiminde lider ülkeler (devamı). 47

Tablo 3.1 Tez kapsamında toplanılan örneklere ait bilgiler. 48

Tablo 3.2 Kaşar ve beyaz peynir üretiminde kullanılan çiğ sütün bazı fizikokimyasal özellikleri. 51

Tablo 3.3 Çalışma kapsamında kullanılan LAB'leri. 52

Tablo 3.3 Çalışma kapsamında kullanılan LAB'leri.(devamı). 53

Tablo 3.4 16S rRNA geninin amplifikasyon PCR karışımı. 55

Tablo 3.5 16S rRNA geninin amplifikasyonu için PCR şartları. 56

Tablo 3.6 RAPD-PCR karışımı. 57

Tablo 3.7 RAPD-PCR koşulları. 57

Tablo 3.8 Çalışma kapsamında kullanılan patojen mikroorganizmalar. 59

Tablo 4.1 Sekanslanan bakterilerin BLAST sonuçları. 77

Tablo 4.1 Sekanslanan bakterilerin BLAST sonuçları (devamı). 78

Tablo 4.2 *Cl. sporogenes'lerin* EMS mL^{-1} cinsinden sonuçları. 81

Tablo 4.3 Antiklostridial aktivite gösteren LAB'nin oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm). 82

Tablo 4.4 LAB'nin patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi sonucunda oluşan inhibisyon zon çapları (mm). 83

Tablo 4.5 *L. plantarum*'un oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm). 86

Tablo 4.5 *L. plantarum*'un oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm) (devamı). 87

Tablo 4.6 *Leu. mesenteroides*'in inhibisyon zon çapları (mm). 88

Tablo 4.7 *St. thermophilus*'un inhibisyon zon çapları (mm). 89

Tablo 4.8 *Lc. lactis*'in inhibisyon zon çapları (mm). 90

Tablo 4.8 *Lc. lactis*'in inhibisyon zon çapları (mm) (devamı). 91

Tablo 4.9 *L. plantarum*'un farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çapları (mm). 96

Tablo 4.10 *Lc. lactis*'in farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çapları (mm). 97

Tablo 4.11 *Leu. mesenteroides, St. thermophilus ve* MRS Broth kontrol grubunun farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çapları (mm). 98

Tablo 4.12 *Leu. mesenteroides*'in farklı sıcaklık ve süre uygulandığında inhibisyon zon çapları (mm).....100

Tablo 4.13 *L. plantarum* farklı sıcaklık ve süre uygulandığında inhibisyon zon çapları (mm). 100

Tablo 4.14 *St. thermophilus* ve *L.lactis'in* farklı sıcaklık ve süre uygulandığında inhibisyon zon çapları (mm).....101

Tablo 4.15 Kaşar peynir örneklerinde 4°C'de depolama süresinde laktobasil sayısında meydana gelen değişim (log kob^{-1}).....103

Tablo 4.16 Kaşar peynir örneklerinde 25°C'de depolama süresinde laktobasil sayısında meydana gelen değişim (log kob^{-1}).....103

Tablo 4.17 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinde laktobasil sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}). 104

Tablo 4.18 Kaşar peynir örneklerinde 4°C'de depolama süresinde laktokok sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).....105

Tablo 4.19 Kaşar peynir örneklerinde 25°C'de depolama süresinde laktokok sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).....105

Tablo 4.20 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinin laktokok sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}). 106

Tablo 4.21 Kaşar peyniri örneklerinde 4°C'de depolama süresinde TAMB sayısında meydana gelen değişim(log kob g^{-1}). 113

Tablo 4.22 Kaşar peyniri örneklerinde 25°C'de Depolama süresinde TAMB sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).....113

Tablo 4.23 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinde TAMB sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}). 114

Tablo 4.24 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinin renk değerleri.....128

ÖZET

Peynirlerde Geç Şişme Etmeni *Clostridium* Türlerinin Koruyucu Laktik Asit Bakterileri ile Engellenmesi

Fatma Nur DEMİRBAŞ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Eş-Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ

Süt endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet veren geç şişmeden sorumlu *Clostridium* türlerinin engellenmesine yönelik, LAB'nin koruyucu kültür olarak kullanımı günden güne önem kazanmaktadır. Bu tez çalışması ile geç şişmiş peynirlerden izole edilen *Clostridium* türlerinin LAB ile engellenmesi incelenmiştir.

Tez çalışmasında 18 farklı peynirden izole edilen *Cl. sporogenes* (6) ve *Cl. tepidium* (3) tanımlanmıştır. *Cl. sporogenes*'e karşı *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), sırasıyla 8 mm ve 9 mm inhibisyon zonu tespit edilmiştir. Tezde 37 adet LAB'sinin bakteriyosin aktivitesinin kontrolü sonucu 15 adet LAB'sinin bakteriyosin benzeri maddelerin ön karakterizasyonu için tripsin ve proteinaz-K ile aktivite kaybına uğradığı, katalaz enziminden ise etkilenmediği, pH 2,0-6,0 değerleri arasında aktivitesini koruduğu 25-40 mm arasında inhibisyon zonu ölçülmüş, pH 8,0-12,0 değerleri arasında aktivite kaybına uğradığı tespit edilmiştir. 40 ve 60°C'de 10 dk ısıl işleme dayanıklı olduğu 15-24 mm inhibisyon zonu tespit edilmiştir.

L. plantarum Y48 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K suşları, kaşar ve beyaz peynir üretiminde koruyucu starter kültür olarak kullanılmıştır. Kaşar ve beyaz peyniri, üretim aşamasında, koruyucu kültür ilavesinden sonra *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 sporları ile 10^4 kob g^{-1} kontamine edilmiştir. *L. plantarum* Y48 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K kaşar peyniri üretiminde 10^7 kob g^{-1}, beyaz peynir üretiminde 10^8 kob g^{-1} inoküle edilmiştir.

Kaşar peynir örnekleri 40 günlük depolama süresi boyunca 4°C ve 25°C'de muhafaza edilmiş ve challenge test yapılmış ve mikrobiyolojik, fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. LAB ko-inokulum kaşar peyniri örneklerinde *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 sporlarında yaklaşık 1 log kob g^{-1}'lik azalma tespit edilmiştir.

Beyaz peynir örneklerinin de 4°C yapılan 90 günlük depolama süresi boyunca mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. LAB ko-inokulum beyaz peynir örneklerinde *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 sporlarında 1 log kob g^{-1}'lik bir azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada, *L. plantarum* Y48 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K kullanımının kaşar ve beyaz peynirlerde *Cl. sporogenes* sporlarını kontrol etme potansiyeli olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium* spp.*,* geç şişme, beyaz ve kaşar peynir, biyokontrol, LAB.

ABSTRACT

Prevention of *Clostridium* Species Causing Late Blowing in Cheeses with Protective Lactic Acid Bacteria

Fatma Nur DEMİRBAŞ

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Enes DERTLİ

The use of LAB as a protective culture for the prevention of *Clostridium* species responsible for late blowing, which causes serious economic losses in the dairy industry, is gaining importance day by day. In this thesis study, the inhibition of *Clostridium* species isolated from late blowing cheese by LAB was investigated.

In the thesis study, *Cl. sporogenes* (6) and *Cl. tepidium* (3) isolated from a total 18 different cheeses late blowing cheeses were identified. Anticlostridial activities of LAB isolated from local cheeses were tested *in vitro*. *L. plantarum* (Y48) with a zone diameter of 8 mm and *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) with a zone diameter of 9 mm, which showed the highest inhibition effect against. In this thesis, as a result of the control of bacteriocin activity of 37 LABs, 15 LABs their activity for the preliminary characterization of bacteriocin-like substances with trypsin and proteinase-K was examined and it was determined that it lost activity and was not affected by the catalase enzyme. İt is observed that bacteriocins produced by LAB maintain their activity between pH 2.0-6.0 and have an inhibitory effect in diameters ranging from 25 to 40 mm, and activity at basic pH (8.0-12.0). When the effect of temperature application on bacteriocin activity was examined, it was

determined that LAB was resistant to heat treatment at 40ºC and 60ºC for 10 minutes and showed an inhibition effect between 15 and 24 mm.

L. plantarum Y48 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K strains were used as a protective starter culture in the production of kashar and white cheese. Kashar and white cheese were contaminated with *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 spores at 10^4 cfu g^{-1} after the addition of preservative culture during production. *L. plantarum* Y48 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K were inoculated as a protective starter culture with 10^7 cfu g^{-1} in the production of kashar cheese and 10^8 cfu g^{-1} in the production of white cheese.

Kashar cheese samples were stored at 4°C and 25°C during the 40-day storage period and the challenge test was performed and their microbiological and physicochemical properties were determined. A decrease of approximately 1 log cfu g^{-1} was detected in *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 spores in kashar cheese samples produced

Microbiological and physicochemical properties of white cheese samples were determined during the 90-day storage period at 4°C. As a result, a decrease of 1 log cfu g^{-1} was observed in *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 spores in white cheese samples produced with LAB co-inoculum. In this study, it was revealed that the use of *L. plantarum* Y48 and *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K has the potential to control *Cl sporogenes* ZMP-1-4 spores in kashar and white cheese.

Keywords: *Clostridium* spp., late blowing, white and kashar cheese, biocontrol, LAB.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Peynir teknolojisinde en önemli mikrobiyolojik sorunların başında geç şişme gelmekte olup çok ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir (Silvetti vd., 2018). Bütirik asit fermentasyonundan kaynaklanan geç şişme hatası, sert veya yarı sert peynirlerin en önemli ve sık görülen kusurlarından biridir ve önemli düzeyde güvenlik ve ekonomik sorunlarına neden olmaktadır (Bergere ve Lenoir, 2000; Lopez-Brea vd., 2017). Anaerobik gram pozitif spor oluşturan bir bakteri olarak gaz üreten *Clostridium* spp., peynirlerde geç şişme kusuruna neden olan ana faktör olarak kabul edilmektedir (Le Bourhis vd., 2005; Gómez-Torres vd., 2015; Bermúdez vd., 2016). Fakat *Cl. sporogenes*, *Cl. beijerinckii* ve *Cl. butyricum* gibi diğer türlerin de yapılan çalışmalarda geç şişmeye sebep olduğu belirlenmiştir (Cocolin vd., 2004; Špehar vd., 2020). Peynir üretiminde *Clostridium* ve sporlarının kaynağı başta çiğ süt olmak üzere üretim ortamındaki yetersiz hijyen şartlarıdır. *Clostridium* sporlu bir bakteridir ve pastörizasyonla sporlar bertaraf edilememektedir. Sporların eleminasyonu için çeşitli yöntemler kullanılsa da önemli dezavantajları bulunmaktadır. *Clostridium* türlerinin peynirde gelişimi ve beraberinde bütirik asit fermentasyonunu gerçekleştirmesi ortamda gaz oluşumuna bağlı peynirde düzensiz çatlakların oluşmasına ve oluşan yüksek miktardaki amino asitlerde ransit tada sebep olmaktadır.

Doğal katkı maddelerinin kullanımı son yıllarda giderek popülerleşmektedir. Bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı gıdaların raf ömrünün uzatılması ve mikrobiyolojik özelliklerinin iyileştirilebilmesi son derece önemlidir. LAB koruyucu kültür, starter kültür olarak kullanılması gıdaların fermentasyonunda istenmeyen mikroorganizmaların inhibisyonunda önemli rol oynayarak, gıdanın kalitesi ve güvenilirliğini arttırmaktadır. Fermente gıdalarda LAB'nin önemi büyüktür. LAB'ler; gıdaların tat, aroma, raf ömrü, besinsel değerini önemli ölçüde etkilemektedir. LAB'lerin, laktik, asetik ve propiyonik asit gibi organik asitler,

H_2O_2, antimikrobiyal enzimler, diasetil, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler gibi anrimikrobiyal aktviteye sahip, belirli patojenik ve istenmeyen mikroorganizmaları kontrol etmek için (Ahmad vd., 2017; Castellano vd., 2017) birden fazla metabolit ürettiği bilinmektedir (İşleroğlu vd., 2008). Buna ilave olarak, LAB suşları farklı metabolitleri üretebilmelerine rağmen, hedef mikroorganizmalara karşı spesifik antimikrobiyal aktiviteye sahip ve biyokoruyucu olarak kullanılabilecek en uygun LAB suşlarını tercih etmek önem arz etmektedir (Rilla vd., 2003). LAB'ler tarafından üretilen metabolitler, istenmeyen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki göstermektedirler. Peynirde *Clostridium* türlerinin gelişmesinin önlenmesi amacıyla alternatif ve etkin bir uygulama olarak LAB'lerin kullanım potansiyeli bulunmaktadır.

Lc. lactis'in yardımcı kültür olarak kullanılmasının, *Listeria* türleri ve *Staphylococcus aureus* gibi istenmeyen bakterilere karşı etkili olduğu ve yarı sert peynirlerde *Cl. tyrobutyricum*'un gelişmesini engellediği tespit edilmiştir (Rodrıguez vd., 2005). Bakteriyosin üreten LAB'nin antiklostridial aktivitesi, *Cl. tyrobutyricum*'un vejetatif hücrelerine ve sporlarına karşı *in vitro* koşullarda araştırılmıştır (Matijašic ve Rogelj, 2000). Bu bulgular, LAB'nin *Clostridium* türleri gibi istenmeyen mikroorganizmaları kontrol etme rolünün kaşar ve beyaz peynir gibi farklı koşullar altında üretilen farklı peynir örneklerinde test edilmesi gerektiğini göstermektedir (Martínez-Cuesta vd., 2010; Garde vd., 2011; Dal Bello vd., 2012; Pingitore vd., 2012).

1.2 Tezin Amacı

Clostridium spp. ile oluşturdukları sporların peynirde bulunması güncel bir sorun olup mevcut çözüm önerileri bazı önemli dezavantajları beraberinde getirmekte ve önleyici uygulamalar çoğu zaman yetersiz kalabilmektedir. Örneğin, nitrat ilavesi ile ilgili temel sorun asidik koşullarda nitritin peynirdeki aromatik amino asitler ile birleşip potansiyel kanserojen nitrozaminlere dönüşme ihtimalinin yüksekliği olup bu durum sağlık açısından önemli riskleri beraberinde getirebilmektedir (Beresford vd., 2001). Ayrıca peynir üretiminde rol alabilecek diğer mikroorganizmalara karşı olan potansiyel olumsuz etkisi de nitrat kullanımını sınırlandırmaktadır. *Clostridium*'ların peynirde gelişmesini

engelleyebilecek bir diğer uygulama ise lizozim kullanımıdır. Lizozim, vejetatif *Clostridium*'ların hücre duvarlarını lize etme şeklinde etkisini gösterip, bakterinin gelişimini ve bütirik asit fermentasyonunu engelleyerek peynirlerde geç şişme sorununu giderebilmektedir. Ancak sütteki yüksek *Clostridium* sporunun varlığından dolayı lizozim etkinliğini gösteremeyebilmektedir. Diğer taraftan, peynir üretiminde kullanılan starter kültürler de lizozim uygulamasından olumsuz etkilenmektedir. Görüldüğü üzere, peynirde *Clostridium*'ların gelişmesinin önlenmesi amacıyla alternatif ve etkin uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada bu sorunun giderilmesine dönük olarak bakteriyosin üretecisi olan LAB'nin, *Clostridium* türleri üzerindeki antagonistik etkisinin araştırılması bu tezin nihai amacıdır. LAB'leri normalde süt ve süt ürünlerinde bulunmakta, hatta bazı türleri peynir yapımında ve fermente süt ürünlerinde de koruyucu starter kültür olarak kullanılmaktadır. *Clostridium*'lar ise süt içerisinde sıklıkla bulunabilen sporlu bakteriler olup ısıl işleme rağmen yine de canlı kalabilmektedir. Bu nedenle LAB'nin üründe direkt kullanılması veya metabolitleri sayesinde istenmeyen organizmaların inhibisyonu ile son ürünün kabul kriterlerinde önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin karakterize edilerek bakteriyosinlerin farklılıkları açığa çıkartılacaktır.

Sonuç olarak bu tezin amaçları;

1) Türkiye'de üretilip geç şişme sorunu gözlemlenen peynirlerden *Clostridium*'ların izolasyonunun gerçekleştirilmesi ve mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tanımlanması (PCR),
2) LAB'lerin antiklostridial özelliklerinin belirlenmesi,
3) LAB'lerin bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi,
4) Bakteriyosin aktivitesi olan LAB'nin bakteriyosin ön karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi,
5) Antiklostridial, antimikrobiyal ve bakteriyosin aktivitesi belirlenen kültürlerle kaşar peynir ve beyaz peynir üretimi yapılarak peynirlerin depolama boyunca fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi,

6) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PY91K ve *Lactiplantibacillus plantarum* Y48 koruyucu starterleri ile yapılan peynirlerdeki ortak analizler olarak mikrobiyolojik analiz, pH ve titre edilebilir asitlik (TTA) ile su aktivitesinin (a_w) belirlenmesi,
7) Depolama süresince ortak analizler dışında kaşar peynirinde redoks potansiyelinin belirlenmesi,
8) Depolama süresince ortak analizler dışında beyaz peynirinde renk analizi ve kuru madde içeriğinin belirlenmesidir.

Bu amaçlar doğrultusunda kaşar ve beyaz peynirlerde depolama boyunca *Clostridium sporogenes* (ZMP-1-4) sporları inoküle edilmiş peynir matrisindeki mikrobiyolojik ve fizikokimyasal değişimler tespit edilmiştir. *Cl. sporogenes*'in (ZMP-1-4) inhibisyonunu sağlayan koruyucu kültürler *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K ve *L. plantarum* Y48 olarak belirlenmiştir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi, ülkemizde karşılaşılan geç şişme sorunun araştırılması üzerine yeteri kadar çalışma olmayışından dolayı geç şişmeye sebep olan *Clostridium* türlerinin koruyucu LAB ile engellenmesi üzerine planlanmıştır. *Clostridium* türlerine etki edebilecek bakteriyosin ve benzeri madde üreten LAB'nin belirlenmesinin süt endüstrisi için önem arzedeceği öngörülmektedir. Biyokontrol olarak adlandırılan bu yöntem ile LAB tarafından üretilen metabolitlerin ya da koruyucu starter kültür olarak bakteriyosin üreticisi olan mikroorganizmalar kullanımıyla, patojen veya bozulma etmeni mikroorganizmalar inaktive edilebilir. Bakteriyosin üreticisi LAB'nin *in vitro* denemelerde *Clostridium* sporları ile belirli oranlarda kontamine edilmiş süt ile üretilen peynir örnekleri üzerinde test edilmesi ve uygulamanın etkinliğinin belirlenmesinin literatüre de katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak tezin hipotezinin olumlu neticelenmesi durumunda geç şişmenin önlenmesi yani *Clostridium* türlerinin inhibisyonunu sağlayan önemli bir uygulama metodolojisi ortaya çıkarılabileceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Peynir ve Mikrobiyatası

İnsan yaşamında süt ve süt ürünlerinin önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle süt üretimi ve sütün ürünlere işlenmesi gıda endüstrisinde önemlidir. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği'nde peynir; sütün pıhtılaştırmayı sağlayan uygun pıhtılaştırıcı vasıtasıyla pıhtının oluşturulması ve pıhtıdan; peynir altı suyunun uzaklaştırılmasıyla veya sütün permeatının ayrılmasını takiben pıhtılaştırılmasıyla oluşan, sertliği ve yağ içerikleri bakımından değişiklik gösteren, salamura veya kuru tuzlama ile tuz ilave edilerek veya tuz ilave edilmeden, starter kültürlü veya starter kültürsüz, telemenin haşlanma işlemi yapılarak veya haşlanma işlemi yapılmadan, çeşni ilave edilmiş veya çeşni ilave edilmemiş, üretim prosesine uygun olarak üretilen, olgunlaştırılmış veya olgunlaştırılmamış olarak tüketilen, peynir türüne has karakteristik özellikleri olan süt ürünleri olarak tanımlanmıştır (Türk Gıda Kodeksi, 2015).

Ülkemizde sütün önemli bir kısmı peynire işlenmektedir. Türkiye'de 200'e yakın peynir çeşidinin olduğu bilinmektedir. Ulusal Süt Konseyi Süt Raporu ve TEPGE Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporuna göre ülkemizde pazar payı en yüksek ve en çok tüketilen peynir çeşidi beyaz peynirdir (Ulusal Süt Konseyi, 2018). Türkiye'de üretimi yapılan peynirlerin %60'ı beyaz peynir, %17'si kaşar peyniri, %12'si tulum ve Mihaliç peyniri, %11'i de diğer yerel peynir çeşitlerini oluşturmaktadır (Tarakçı vd., 2015). Peynir çeşidinde bulunan mikroorganizmalar peynir mikrobiyotasını oluşturmaktadır. Peynirde tat, koku, aroma ve yapı gibi istenilen özellikleri starter kültürler sağladığı için mikrobiyota çok önemlidir (Ercolini, 2013). Bir ortamda bulunan mikrobiyal topluluğun tamamına mikrobiyota denir (Liu, 2016).

Peynir yapımında; süt mikrobiyotası önemlidir ve peynirin karakteristik lezzet ve doku gelişiminin önemli parçasıdır (Tilocca vd., 2020). Geleneksel yöntemlerle çiğ sütten üretilen peynirler çok çeşitli ve zengin bir mikrobiyal ekosistemden oluşur ve mikrobiyal çeşitlilik peynirlerin kalitesini etkilemektedir (Yeluri vd.,

2018). Peynir üretiminde kullanılan çiğ sütte bulunan mikroorganizma topluluğu da peynir mikrobiyotası için önemlidir (Quigley vd., 2012). Çiğ sütte var olan mikroorganizmalar pastörizasyonla bir kısmı elimine edilememektedir (Kable vd., 2016). Tüm bunların yanısıra peynir üretim aşamasında peynirin direkt temas ettiği ekipmandan peynire mikroorganizmalarda dahil olabilmektedir. Peynir mikrobiyotasına starter kültüre ek peynire işlenen sütten gelen mikroorganizmalar ve işletme ekipmanından peynir mikrobiyotasının mikrobiyal yükünü zenginleştirdiği bildirilmiştir (Stellato vd., 2015). Pişirme sıcaklığı ve pıhtı işleme gibi üretim parametrelerindeki değişiklikler peynirlerin özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamakta ve peynir olgunlaşma mikrobiyotası peynir çeşidinin benzersiz özelliklerinin geliştirilmesinde kritik önem taşımaktadır (Beresford vd., 2001). Peynir mikrobiyatası, peynirin hem kalitesini hem de güvenliğini etkileyen organoleptik ve fizikokimyasal özelliklerini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır (Yeluri vd., 2018).

Peynir mikrobiyotasının, başlatıcı birincil mikrobiyota ve ikincil mikrobiyotadan oluştuğu bilinmektedir (Tunail, 2009). Birincil mikrobiyota; LAB'nin fermentasyonuyla sütün asitliğini arttırırmakta ve olgunlaşma esnasında enzimler aracılığıyla peynirin tat, koku, tekstür gibi kendine has özelliklerini oluşturmaktadır. İkincil mikrobiyota temel olarak starter olmayan *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* türleri, Propiyonik Asit Bakterileri, küfler ve mayalar olarak sınıflandırılmaktadır (Beresford ve Williams, 2004; Fox vd., 2004). Peynir matrisinin iç veya dış kısmında var olan başlatıcı kültürler haricindeki LAB, maya ve küfler ikincil mikrobiyotayı oluşturmaktadır. İkincil mikrobiyota; olgunlaşma esnasında çeşitli organik asitlerin oluşumu için önemlidir. Ülkemizde beyaz peynir genellikle taze peynir olarak tüketilmektedir. Olgunlaştırılmayan beyaz peynirlerde ikincil mikrobiyota yoktur (Tunail, 2009). Beyaz peynirin mikrobiyotasında starter kültüre ilaveten çevresel mikrobiyota ve non-starter kültürlerin de etkisinin olabileceği açığa çıkartılmıştır (Yeluri vd., 2018).

Daha önce yapılan çalışmalar beyaz peynire hakim tür olarak *Lc. lactis* ve *Streptococcus thermophilus* olduğunu açığa çıkarmıştır. Bu iki mikroorganizmanın peynirin olgunlaşmasında önemli rolü vardır. Beyaz peynir

mikrobiyatasında önemli diğer mikroorganizmalar *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur, *L. fermentum, L. brevis, L. casei, L. plantarum, Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ve *Leu. lactis* türleridir. Ülkemizde beyaz peynir ile ilgili çalışmalarda *Lc. lactis* subsp*. cremoris* ve *Lc. lactis* subsp*. lactis* ve bunlara ek *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, St. thermophilus, L. helveticus* ve *L. plantarum* bakterilerinin beyaz peynir yapımında başlatıcı kültür olarak kullanıldığı bilinmektedir. LAB'nin starter kültür olarak kullanılması peynirin karakteristik tat ve koku gibi organoleptik özelliklerinin oluşmasında etkilidir (Yeluri vd., 2018). Beyaz peynirin duyusal özelliklerine ve besin içeriğine katkı sağlayabilecek bir diğer faktör; non-starter kültür, çiğ süt ve/veya çevresel kaynaklardan mikrobiyotaya ilave edilen LAB'ler olduğu bildirilmiştir (Wolfe vd., 2014).

Çiğ koyun ve inek sütünden veya bunların karışımından yapılan pasta filata peyniri olan kaşar peyniri, en önemli peynir çeşitlerinden biridir. Kaşar peyniri; İtalya'nın caciocavallo ve mozzarella, Bulgaristan'ın kashkaval, Yunanistan'ın kasseri, Rusya'nın kachekavalo ve Hırvatistan'ın kachkavaly gibi diğer pasta filata türü peynirleri ile benzerlikler göstermektedir (De Angelis vd., 2001; Yuvaşen vd., 2018). Ancak günümüzde genellikle yöresel peynirler çiğ inek sütünden yapılmaktadır (Kamber, 2007). Kaşar peynirinin özellikleri üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen mikrobiyal ekosisteminin gerçek bileşimi hakkında çok az bilgi mevcuttur (Cetinkaya ve Soyutemiz, 2006; Cıbık vd., 2010). Aydemir vd., (2015) yapmış olduğu çalışma ile Kars peynirinin olgunlaşması sırasında laktobasillerin (%64,5) hakim flora olduğunu bildirmişlerdir. *St. thermophilus* türü genellikle peynir üretimi sırasında mezofilik LAB türleri olarak yer almaktadır (Champagne vd., 2009).

Clostridium spp.'nin gelişmesinin peynirde koliformlar, laktokoklar, lökonostoklar, laktobasiller ve propionibakteriler gibi diğer mikroorganizmaların varlığı ile desteklendiği bilinmektedir (Anastasiou vd., 2009).

2.1.1 Starter Laktik Asit Bakterileri

Peynir üretimi, lezzet ve doku gibi karakteristik özelliklerin gelişiminin yanı sıra raf ömrünü uzatmak, kalite kusurlarını önlemek ve olgunlaşmayı hızlandırmak için starter kültür eklenerek gerçekleştirilmektedir (Hill ve Kethireddipalli, 2013).

Bu amaçla peynir üretim aşamasında stater kültüre ek koruyucu kültür kullanılmaktadır. LAB'ler peynir işleme sırasında önemli bir rol oynamaktadır. Bazı türler fermentasyon sürecine katkıda bulunurken, diğer türler olgunlaşma sürecine dahil olmaktadır. Laktozu yüksek konsantrasyonlarda laktik aside dönüştürerek fermentasyona katkıda bulunan laktik asit bakterileri SLAB (Starter Laktik Asit Bakterileri) olarak bilinmektedir (Fox vd., 2004). Starter kültür; peynir yapım aşamasında ya da üretimin sonraki aşamalarında da inoküle edilmektedir (Hill ve Kethireddipalli, 2013). *Lc. lactis*, hem yumuşak hem de sert peynirler için yaygın olarak kullanılan starter kültürdür (Willey vd., 2009).

2.1.2 Starter Olmayan Laktik Asit Bakterileri

Starter olmayan laktik asit bakterileri (Non Starter Laktik Asit Bakterileri, NSLAB), başlangıç kültürünün bir parçası olarak veya ikincil ek kültürler olarak sütte kendiliğinden var olan mikroorganizma grubudur. NSLAB'nin en iyi bilinen kaynaklarından biri çiğ süttür (Montel vd., 2014). NSLAB ayrıca zeminler, kanallar ve ekipman yüzeyleri dahil olmak üzere peynir üretim tesislerinde izole edilebilmektedir (Bokulich ve Mills, 2013). NSLAB'i; olgunlaştırma sürecinde ortaya çıkan laktik asit bakterileridir (Fox vd., 2004). Peynirin olgunlaşma aşamasında *Leu. mesenteroides*, *L. helveticus*, *L. zeae* ve *Enterococcus* spp. gibi NSLAB'i tespit edilmiştir. NSLAB, artık laktoz veya diğer şekerlerin fermentasyonuna katkı sağlamakta ve aromatik bileşiklerin oluşumu dahil olmak üzere sitrat, peptit ve aminoasit üretiminde yer alarak olgunlaşma sürecine katkıda bulunmaktadır (Biolcati vd., 2020).

Choi vd., (2020) yapmış olduğu çalışma ile peynir örneklerinde bulunan bazı NSLAB'lerin, çalışmanın parçası olmayan ancak aynı tesiste üretilmiş diğer peynir türlerinin starter kültürlerinde bulunması nedeniyle çapraz kontaminasyonun NSLAB'nin başka bir kaynağı olabileceğini açıklamıştır.

2.1.3 Küfler ve Mayalar

Candida spp., *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* ve *Pichia* spp. gibi mayalar peynirde bozulmaya sebep olan yaygın organizmalarıdır (Johnson, 2001). Birçok maya 0°C ile 37°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilmektedir (Thylin, 2000). Mayalar, tuzlu suda canlı

kalabilmektedir ve peynirlerin kabuğundaki yüksek besin ve su içeriğinden dolayı tercih edildikleri için sıklıkla tuzlu peynirlerde bulunmaktadır (Ledenbach ve Marshall, 2009). Bazı maya türleri, laktat/laktoz metabolizması yoluyla CO_2 üreterek erken şişme kusuruna neden olabilmektedir (Sheehan, 2007). Renk bozulması ve fermente/mayalı kötü tatlar meydana gelebilmektedir (Hill ve Kethireddipalli, 2013). Peyniri bozan mikroorganizmalar, peynirin dokusunu, tadını ve kokusunu değiştiren parçalayıcı enzimler üreterek peynirlerin kalitesini düşürmektedir (Ledenbach ve Marshall, 2009). Mayaların parçalayıcı enzimleri farklı besin maddelerini açığa çıkardığından, maya bozulması genellikle diğer mikroorganizmalar tarafından bozulmayı da kolaylaştırmaktadır. Psikrotrofik bakteriler, mantarlar, mayalar, spor oluşturan bakteriler, koliform bakteriler ve heterofermentatif bakteriler bozulma gözlemlenen peynirlerde en yaygın bulunan mikrorganizmalardır (Te Giffel ve Wells-Bennik, 2010). Süt ürünlerinde maya kontaminasyonu hijyen standardı ve sanitasyon kriterlerini etkileyen önemli faktör olduğu bilinmektedir (Jakobsen ve Narvhus, 1996).

2.1.4 Patojen Mikroorganizmalar

Peynir üretimi sırasında risk oluşturan başlıca patojenik bakteriler arasında; *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* serotipleri ve *Escherichia coli* O157:H7 yer almaktadır (Adhikari vd., 2018). Bu mikroorganizmalar çiğ sütte kontaminasyona neden olmakta ve peynirlerde düşük sıcaklık ve pH'da gelişimlerine devam etmektedir. Bazı patojen mikroorganizmalar psikrotrofiktir ve olgunlaşma sürecinde uzun süre canlı kalabilmektedir. Örneğin; *L. monocytogenes* süt tesisi ortamına kolayca adapte olduğu için süt üretiminde yüksek riskli bir bakteri olarak bilinmektedir (Stessl ve Hein, 2010). Erken şişme olayı koliform bakteriler ve mayaların sütte veya peynirde bulunmasından kaynaklanmaktadır (Sheehan, 2007). *E. coli*'ye ek olarak *Shigella*, *Bacillus* ve *Clostridium*, gıda zehirlenmelerine sebep olan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (EFSA, 2017). Süt ve süt ürünlerinin diğer yaygın patojenik kontaminantlar arasında *S. aureus*, *Mycobacterium* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* serotipleri ve *B. cereus* yer almaktadır (Te Giffel ve Wells-Bennik, 2010).

S. aureus zehirlenmeleri en çok süt ürünleri içerisinde peynir grubunda görülmektedir. Çiğ sütte doğal olarak *S. aureus* bulunmakla birlikte, pastörizasyonun yetersiz olması veya ekipman ve personelden kaynaklı kontaminasyon nedeni ile pastörize süt ve diğer süt ürünlerinde de bulunduğu belirlenmiştir (Demirel ve Karapınar, 2000).

Peynirin üretim aşamasında koliform bakterilerin sebep olduğu şişme olayı erken şişme olarak tanımlanmaktadır. Bazı koliformlar, laktoz metabolizması yoluyla CO_2 ve H_2 üreterek kötü tatlara ve erken şişme kusurlarına neden olabilmektedir. Örneğin, *Enterobacter aerogenes* peynirlerde erken şişmeye sebep olarak tat ve aroma bozukluklarına neden olmaktadır (Alichanidis, 2007).

Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da peynir tüketimi ile ilgili ortaya çıkan salgınların *S. aureus, L. monocytogenes*, ve *E. coli* 0157:H7 gibi gıda kaynaklı patojenlerden kaynaklandığı açıklanmıştır (Swaminathan ve Gerner-Smidt, 2007; Choi vd., 2016).

Genel olarak peynir, fizikokimyasal özellikleri ve mikrobiyatasının patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle güvenli bir gıda olarak kabul edilmektedir (Irlinger vd., 2015). Peynirin fermentasyon yoluyla asitliğinde meydana gelen artışın pastörize edilmemiş sütten yapılan çiğ süt peynirlerinde patojenik mikroorganizmaların gelişmesini engellediğine inanılmaktadır (Johnson, 2017). Buna rağmen, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC) tarafından yayınlanan 2015 yılı verilerine göre birçok ülkede patojenik bakteri ve/veya toksinlerinin salgın ve zehirlenmelere neden olduğu bildirilmiştir (EFSA, 2017). Özellikle salgın ve zehirlenmelere stafilokok enterotoksinleri veya *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş yumuşak (≥%50 nem) peynirlerin sebep olduğu tespit edilmiştir (Babić vd., 2018).

2.1.5 Peynirde İstenmeyen Kusurlara Sebep Olan *Clostridium* Türleri

Clostridium'ların doğada (toprak, tatlı su kaynakları, yem ve atıklar) bol miktarda bulunduğu bilinmektedir, genellikle mezofilik, bir kısmı termofilik olduğu bilinen mikroorganizmalardır (Julien vd., 2008). *Clostridium* sporları süt, toprak, yem, silaj, saman vb. gıda dışı ortamlarda bulunabilmektedir (Vissers vd., 2006).

Sporlar; yem ve silajdan süte, sütten peynire geçerek depolama esnasında sorun teşkil etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda *Cl. tyrobutyricum* bozulmuş peynirden (Lycken ve Borch, 2006) ve bozulmuş meyve özünden (De Carvalho vd., 2007) izole edilmiştir. *Clostridium* sporları çevrede uzun süre canlı kalabilmekte ve hatta düşük sayıda spor düzeyinde bile gıdaların bozulmasına neden olabilmektedir (Su ve Ingham, 2000). Sağım sonrasında süte kontamine olan mikroorganizmalar bulaşma kaynakları değerlendirildiğinde değişiklik gösterebilmektedir. Süt, dışkı ve hayvan derisinden koliform ile topraktan, *Bacillus*, *Clostridium* ve *Salmonella* ile yemlerden, *Cl. butyricum* ve *Cl. tyrobutyricum* ile kontamine olabilmektedir (Yoon vd., 2016). *Clostridium* sporları, çiğ süt dahil çiftlik ortamlarında yaygındır (Oliveira vd., 2016). Süt ürünlerinde anaerobik floranın %75'ini *Cl. sporogenes*, *Cl. perfiringens*, *Cl. butyricum* ve *Cl. tyrobutyricum* oluşturmaktadır (Le Bourhis vd., 2007; Špehar vd., 2020). Sütün peynire işlenmesi sırasında uygulanan ısıl işlem sonucunda *Clostridium* sporları canlılıklarını devam ettirebilmektedir (Storari vd., 2016). Canlılıklarını devam ettiren sporlar uygun şartlar altında vejetatif hale dönüşerek bütirik asit fermentasyonu sonucunda gaz üreterek peynir matriksinde çatlakların ve yarıkların oluşması ile iri gözenekli yapıya, akabinde şişmelere (D'Incecco vd., 2018) istenmeyen koku ve aromanın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (López-Enríquez vd., 2007). Anaerobik bir bakteri olan *Cl. tyrobutyricum* sporları ekstrem koşullara; ısıl işleme, kimyasal maddelere, ışınlamaya, basınca ve kurumaya oldukça dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Garde vd., 2013; Olguín-Araneda vd., 2015).

Clostridium spp. ve özellikle *Cl. tyrobutyricum* geç şişme sonrasında yarı sert ve sert peynirlerden en yaygın izole edilen mikroorganizmalardır (Panelli vd., 2013). Peynirde LAB, laktatı parçalayarak bütirik asit, CO_2 ve H_2 gazı ile çok az miktarda asetik asit ve diğer bazı metabolitler oluşturmaktadır. Geç şişme olgunlaşmanın sonunda meydana gelen peynir dokularının karakteristik bir mikrobiyal hatası olup, süt endüstrisi için birincil olarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yarı sert (örn. Gouda, Edam) ve sert peynirlerde (örn. Emmental, Gruyère) geç şişme kusurlarına neden olabilen mikrobiyal türler arasında *Cl. tyrobutyricum* en yaygın olarak izole edilen bakteridir (Aureli vd., 2011; Ivy ve

Wiedmann, 2014). *Cl. tyrobutyricum* ayrıca en az altı ay olgunlaşan Grana, Padano, Parmigiano Reggiano, Pecorino Sardo ve Pag peyniri gibi çok sert peynirlerdeki geç şişmenin nedeni olarak bilinmektedir (Gómez-Torres vd., 2015; D'Incecco vd., 2018). Ayrıca *Cl. sporogenes*, anaerobik peynir ortamında proteoliz nedeniyle gaz üretebilmektedir (Goudkov ve Sharpe, 1965; Gómez-Torres vd., 2015).

Clostridium türlerinin varlığı, peynirlerin iç kısmında büyük doku kusurlarına ve gaz üretimine neden olmakta ve asidik, fermente edilmiş bir lezzetin yanı sıra bütirik asitten kusmuk benzeri bir koku oluşumuna neden olmaktadır (Zhao vd., 2013). Geç şişme kusuru, Propiyonik Asit Bakterileri (PAB) veya spor oluşturan *Clostridium* ile kontamine olmuş peynirlerde görülen tipik bir durumdur. Heterofermentatif LAB ve PAB, peynirleri erken ve geç şişme kusuru ile bozabilmektedir (Hill ve Kethireddipalli, 2013). Geç şişme meydana gelmiş peynirler tüketiciler tarafından kabul görmemektedir. Tüketiciler değişen yaşam koşullarıyla beraber doğal veya daha az işlem görmüş, güvenilir gıdaları tüketmeyi tercih etmektedirler.

2.1.5.1 *Clostridium* spp. Genel Özellikleri, Morfolojileri, Hücresel Bileşimi

Clostridiaceae familyasına ait olan *Clostridium* cinsi 203 tür ve 5 alt tür içermekte olup bu türlerlerden sadece birkaçı insanlar için patojenik özelliktedir (Euzeby, 2013). *Clostridium* filogenetik olarak heterojendir ve Gram pozitiftir, ancak Gram negatif olarak da mikroskopta görüntülenebilir yani Gram değişken olduğu ispatlanmıştır (Yutin ve Galperin, 2013). Gram boyama reaksiyonunu doğru bir şekilde belirlemede hatalar olabilmektedir (birçok anaerob mikroorganizma oksijenden etkilenerek aşırı derecede renksizleşir ve Gram negatif görünmektedir). Örneğin, Gram negatif boyanan *Clostridium* türleri, özellikle *Cl. clostridioforme*, *Bacteroides* gibi yanlış tanımlanabilmektedir (Jousimies-Somer vd., 2002). Birçok *Clostridium* spp. tipik bir Gram-pozitif hücre duvarına sahip olmasına rağmen Gram negatif boyandığı bildirilmiştir (Freier vd., 1988).

Clostridium türleri. hem spor oluşturan hem spor oluşturmayan, anaerobik veya anaerobik olmayan, çubuk ve kok şeklinde bakterileri içermektedir (Finegold vd., 2002). *Clostridium* türlerinin sınıflandırılmasında değişiklikler yapılmıştır

(Ludwig vd., 2009). *Clostridium* suşları, genellikle ikili veya kısa zincirler halinde, yuvarlak veya bazen sivri ya da kare uçlu, 0,3–2,0 x 1,5–20,0 μm, Gram pozitif çubuk şeklinde (bazıları Gram değişkendir), genellikle pleomorfiktir ve oksijene tolerans açısından önemli ölçüde farklılık gösteren (Koneman vd., 1997), sakkarolitik veya proteolitik karakterde ve genellikle katalaz negatif mikroorganizmalardır (Rainey vd., 2015).

Clostridium'larda guanin ve sitozin miktarı oldukça değişkendir (%22-55 mol). Ancak toksijenik türlerde guanin ve sitozin miktarlarıyla miktarları benzerdir (%24-29 mol). Bu cins endospor varlığı, çok sıkı olan anaerobik metabolizması, sülfatı sülfite dönüştürme yeteneği ile tanımlanmaktadır (Murray ve Farrington, 2010). *Clostridium* spp., çevrede uzun süre canlı kalabilen yüksek dirençli yapıda endosporlar oluşturmaktadır (Kennedy vd., 1994; Gould, 2006). *Clostridium* türleri oval veya yuvarlak sporlara sahip olup sporlar santral, terminal veya subterminal yerleşim gösterebilmektedir. Spor genellikle bakteriden daha geniş yapıda olup, bakterinin yapısını bozmaktadır. Anaerob şartlarda ve kan içeren anaerob besiyerlerinde kolaylıkla gelişebilmektedir, pastörizasyon normlarında canlılıklarını koruduğu bilinmektedir (Özkuyumcu, 2009).

Yarı sert ve sert peynir çeşitlerinin pH değeri 5,2 ile 5,3 olup, *Cl. butyricum*, *Cl. beijerinckii* veya *Cl. sporogenes*, 6,5 ile 7,0 pH değerinde optimum gelişme ve çoğalma göstermektedir. Bu bakterilerin geç şişmeye neden olduğu bilinmektedir (Špehar vd., 2020).

Olgunlaşma dönemi sonralarında *Clostridium* türlerinin sebep olduğu şişme olayı geç şişme olarak tanımlanmaktadır, bütirik asit fermentasyonu sonucu peynirde geç şişme ortaya çıkmaktadır (Yaygın, 1989). Ülkemizde, olgunlaştırılmış kaşar ve beyaz peynirlerinde geç şişme olayı gözlemlenmektedir. Gouda, Emmental, Grona padano, Provolone ve Danbo gibi çeşitli yarı sert ve sert peynirlerle diğer salamurada tuzlanan peynir tiplerinde görülen anormal şekilde şişme, çatlama ve bunu takiben istenmeyen tat ve koku olarak bilinen geç şişme olayı peynir üretiminde sorunlara neden olmaktadır. Geç şişme kusuru, bütirik asit, asetik asit, karbon dioksit ve hidrojen üretimi ile laktik asidi fermente edebilen *Clostridium* spp.'nin ortamda aşırı gelişmesinden kaynaklanmaktadır *Cl. tyrobutyricum*'un geç

şişmenin ana nedeni olduğu düşünülmekte fakat *Cl. sporogenes*, *Cl. beijerinckii* ve *Cl. butyricum* benzeri diğer türlerin de geç şişmeye sebep olduğu açığa çıkarılmıştır (Cocolin vd., 2004; Le Bourhis vd., 2005; Le Bourhis vd., 2007). Peynirin olgunlaşma döneminde potansiyel olarak patojenik bakterilerin azaldığı bilinmektedir (Choi vd., 2020), ancak *Clostridium* türleri için elverişli bir ortam olduğu için geç şişme kusuru gözlemlenebilmektedir (Bottazzi, 1993; Panari vd., 2001). Peynire işlenen sütün, koliform, *Clostridium* ve *Bacillus* cinsi bakterileri içermemesi gerekmektedir (Hayaloglu vd., 2002).

2.1.5.2 Patojen *Clostridium* Türleri ve Özellikleri

Clostridium türlerinden *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens* ve *Cl. butyricum*'un bazı toksinler ürettiği bilinmektedir (Brüggemann ve Gottschalk, 2009). İnsanlarda hastalığa neden olduğu bildirilen *Clostridium* türleri; *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyii* tip A, *Cl. sordellii*, *Cl. tetani*, *Cl. difficile*, *Cl. botulinum*, *Cl. butyricum*, *Cl. baratii*, *Cl. tertium*, *Cl. histolyticum*'dur (Jousimies-Somer vd., 2002).

2.1.5.3 *Clostridium* spp. Kontaminasyon Kaynakları

Clostridium spp.'nin yaygın kontaminasyon kaynağı inek sütü olarak bilinir (Vissers vd., 2007). Ancak başlıca kontaminasyon kaynakları arasında silaj, su veya hijyenik olmayan hayvan yataklarının da olduğu düşünülmektedir (Julien vd., 2008; Driehuis vd., 2016). Silaj; LAB'nin yeşil bitkiler, diğer bitkisel ürünlerle, endüstriyel ve tarımsal artıkların fermentasyonu ile elde edilen süt ineklerinin beslenmesinde kullanılan yemdir. Peynir üretiminde kullanılan sütte sporların ana kontaminasyon kaynağı silajdır ve silajın spor konsantrasyonunu kontrol ederek *Clostridium* spp. bulaşı en kolay şekilde önlenebilmektedir (Barbosa-Cánovas ve Bermúdez-Aguirre, 2010; Heyndrickx vd., 2010).

Gouda peynirinin üretim aşamasında kullanılan çiğ sütte; 5-10 spor L^{-1} varlığının peynirin geç şişmesi için yeterli olduğu bildirilmiştir. Geç şişme kusuru için gerekli olan bu bakterinin çiğ sütteki başlangıç sayısının son derece düşük olduğu, ancak çeşidine bağlı olarak bozulan peynirden izole edilen spor sayısının 10^3 ile 10^6 g^{-1} arasında olduğu tespit edilmiştir (Samaržija vd., 2007).

2.2 Peynirde *Clostridium* Türlerinin Gelişimini Etkileyen Faktörler

Peynir yapım aşamasında, bozulmaya neden olan mikroorganizmaların başlangıçtaki sayıları yeterliyse ve çevre koşulları örneğin; asitlik ve düşük su aktivitesi ile buna izin veriyorsa peynirde gaz kusurlarının meydana gelmesi mümkündür. *Clostridium* türleri, termodurik endosporlar üretebilmektedir. Sporlar sütten peynire geçebilmektedir ve peynirin olgunlaşması sırasında kolonize olabilmektedir (Brüggemann ve Gottschalk, 2009).

Peynirlerde bozulma; su içeriği, sıcaklık, pH, redoks potansiyeli, besin mevcudiyeti, tuzluluk, starter ve ek kültürlerin özellikleri, rekabetçi mikrobiyota, oksijen mevcudiyeti, kontamine mikroorganizma yükü ve ayrıca üretilen enzimlerin türü ve miktarları gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir (Ledenbach ve Marshall, 2009).

2.2.1 pH

Cl. tyrobutyricum'un optimum pH 5,8'de çoğaldığı, fakat pH 4,5-4,7'de de faaliyet gösterebileceği belirlenmiştir. Peynirde asitlik yükseldikçe gelişme yavaşlamakta ve durmaktadır (Yaygın, 1989). Fermentasyon aşaması ve sonrasında LAB ortamda; laktik asit, uçucu organik asitler ve etanol, hidrojen peroksite ilaveten pH'nın düşmesine neden olarak Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerden dolayı geniş bir inhibitör etki gözlemlenmektedir (Blom ve Mørtvedt, 1991). LAB, pH 5'de; maya ve küflere karşı etki gösterememesine rağmen sporlu bakterilerin inhibisyonunda önemli rol almaktadır (Çon ve Gökalp, 2000). Şişme üzerine önemli bir faktör de peynirin asitliğidir. *Clostridium* spp.'nın pH 4,5'ten düşük değerlerde önemli oranda inhibisyona uğradığı bilinmektedir (Wilkinson, 2005).

Peynirin pH'ı, LAB metabolizması tarafından yaklaşık 4,2-5,5'e düşürülmektedir. pH'nın düşmesi birçok mikroorganizmayı inhibe etmekte, peynirin stabilitesini geliştirmekte ve doku ve lezzeti iyileştirdiği bilinmektedir (Adams ve Moss, 2008; Coultate, 2009).

Yumuşak ve taze peynirler, yüksek pH ve yüksek nem içeriği ve düşük tuzluluk oranları nedeniyle kolayca bozulabilmektedir. Sert ve olgunlaşmış peynirler ise

düşük pH, düşük su aktivitesi (a_w) ve tuzluluk oranları nedeniyle daha iyi korunmaktadır (Ledenbach ve Marshall, 2009).

2.2.2 Starter Kültür

Peynir üretiminde, bakteriyosinler toksik olmayan koruyuculara ve kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanılmaktadır (Cotter vd., 2013; Choyam vd., 2019) Bakteriyosin üreticisi starter kültür seçiminin geleneksel koruyuculara göre daha avantajlı olduğu bilimmektedir (Špehar vd., 2020).

2.2.3 Tuz Konsantrasyonu

Gıdaların salamurada bekletilmesi aşamasında tat ve aroma oluşumu önemlidir. Tuz ilavesi gıdanın lezzetine katkıda bulunmanın yanı sıra su aktivitesini düşürerek peynirleri bozulmaya karşı korumaktadır (Guinee ve O'Kennedy, 2007). Olgunlaştırılmış peynirlerde, tuz ve nem içeriğinin %3'ten fazla olması, *Clostridium* türlerinin yanı sıra diğer istenmeyen mikroorganizmalarında gelişmesini engellemektedir (Ledenbach ve Marshall, 2009). *Cl. tyrobutyricum* sporları tuz ve sıcaklıktan etkilenmektedir (Silvetti vd., 2018).

Silvetti vd., (2018) çalışmasında 37°C'de, pH 5,75-6,50, %1-2 NaCI içeren besin ortamında *Cl. butyricum, Cl. tyrobutyricum, Cl. sporogenes* ve *Cl. beijerinckii*'nin vejetatif hücrelerinin gaz üretebildiğini, *Cl. sporogenes* ve *Cl. tyrobutyricum*'un vejetatif hücrelerinin diğer *Clostridium* spp'den daha dayanıklı olduğu, pH 5 ve %2 NaCl içeren besin ortamında gaz oluşumunun gerçekleştiği ancak %4 NaCl içeren besin ortamında *Clostridium* hücreleri stres koşullarına, ozmotik stresten kaynaklı inhibisyon tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada ise; *Cl. tyrobutyricum, Cl. sporogenes, Cl. butyricum* ve *Cl. beijerinckii* türlerinin farklı pH, NaCl konsantrasyonu ve sıcaklık koşullarına dirençleri incelenmiş, 20°C'de uygulanan asitlik ve tuz konsantrasyonlarında *Cl. tyrobutyricum* sporlarının gaz oluşumunun etkilenmediği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 10°C ve altı sıcaklıklarda, pH≤5,00 olduğunda %2'lik NaCl içeren besin ortamında sporların ve gaz oluşumunun engellenebileceği belirlenmiştir. Koliformların neden olduğu erken şişme kusurunun, peynir yapımında pıhtının %2 tuzla önceden tuzlanmasıyla basit ve etkili bir şekilde engellenebildiği belirtilmiştir (Melilli vd., 2004).

2.2.4 Sıcaklık

Clostridium türlerinde. yüksek veya düşük sıcaklık uygulamaları ile sporülasyon hızlanmaktadır. Sıcaklığın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *Cl. tyrobutyricum* sporlarının sporülasyonu 8°C'de depolama ile yavaşlarken, 13°C'de depolama ile arttığı bildirilmiştir (Morandi vd., 2021). *Clostridium*'ların toksin üretimi ve gelişiminin 25°C'de depolama yapıldığında en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Ter Steeg ve Cuppers, 1995).

2.2.5 Mevsimsel Etki

Çiğ sütlerde mevsime bağlı olarak *Clostridium* türlerinin varlığı değişiklik göstermektedir. *Clostridium* sporlarının yaz aylarında daha fazla olduğu, yazın toplanan sütlerden yapılan peynirlerde daha sık geç şişme gözlemlendiği tespit edilmiştir. Geç şişmenin sebebinin ise yaz ayında toplanan sütlerde, taze ot ile beslemeye bağlı olarak, *Cl. sporogenes* ve *Cl. butyricum* türlerininin, kışın toplanan sütlerde ise *Cl. tyrobutyricum*'un mikrobiyotaya hakim olmasından kaynaklandığı belirlenmiştir (Garde vd., 2011b).

2.3 *Clostridium* Türlerinin Kaşar ve Beyaz Peynirde Gelişiminin Engellenmesi

Süt endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olan; düşük asitli, sert ve yarı sert peynirlerde görülen geç şişme sorununun *Clostridium* türlerinden kaynaklandığı (Bassi vd., 2013) ve problemin çözümünde yaygın olarak süte uygulanan mikrofiltrasyon, baktofügasyon, ısıl inaktivasyon, nitrat veya lizozim ilavesi ve LAB ile sorunun kontrol edilebildiği rapor edilmiştir (Havlíková vd., 2018; Carvalho vd., 2021). Ancak, bu yöntemlerin birçoğunda belirli sınırlamalar bulunmaktadır (Oliveira vd., 2016; Oliveira vd., 2018).

Kaliteli güvenilir gıda üretimi ve gıdaların muhafazası için alternatif çözümlerle birlikte uygulaması pratik ve maliyeti düşük biyokoruma yöntemleri, ürünün raf ömrüyle birlikte hijyenik kalitesini de arttırmaktadır. Ayrıca biyokoruma yöntemlerinin bir diğer hedefi de kolay bozulan gıda ürünlerinin organoleptik özellikleri ve besin değerlerine zarar vermeden gıdayı koruyabilmektir (Kalkan vd., 2011). *Clostridium* ve oluşturdukları sporların peynirde bulunmasından

dolayı geç şişme güncel bir sorundur ve mevcut çözüm önerileri bazı önemli dezavantajları beraberinde getirmekte ve çoğu zaman bu tip uygulamalarda yetersiz kalabilmektedir. Biyokoruma uygulamaları arasında laktoperoksidaz sistemi, bakteriyosin üretimi olan LAB'nin koruyucu kültür olarak kullanılması ve bakteriyofajların uygulanması gibi yöntemler yer almaktadır (Carlton vd., 2005).

2.3.1 Mikrofiltrasyon ve Baktofugasyon Uygulaması

Çiğ süte uygulanan mikrofiltrasyon veya baktofügasyon işlemi *Clostridium* spp. etkilerini azaltmak için kullanılan yöntemlerden biridir (Skeie, 2010). Alternatif bir yöntem olarak, sütün mikrofiltrasyon uygulanmasına dayanır (Abgrall vd., 1985). Bakterilerin sütten uzaklaştırılması için baktofügasyon işlemi ile karşılaştırıldığında mikrofiltrasyon işleminin bakteri ve sporlarının sütten elimine edilmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Özcan ve Kurtuldu, 2011).

Cl. tyrobutricum sporlarını elimine etmek için endüstriyel olarak ilk kez 1980'lerde mikrofiltrasyon işlemi yarı sert ve sert peynir üretiminde kullanılmıştır (Ünver ve Çelik, 2017).

Mikrofiltrasyon işlemi bakterileri ve sporlarını elimine etmek için iyi bir yöntem olmasına rağmen düşük üretim kapasitesine sahip olması ve kurulum maliyetlerinin yüksek olması dezavantajları arasındadır (Yetişmeyen ve Yıldız, 2006). Bu dezavantajların yanısıra coğrafi işaretli peynirlerin üretimi esnasında fiziksel işlemlerden biri olan mikrofiltrasyona izin verilmemektedir (Silvetti vd., 2018).

Mikrofiltrasyon ile birleştirilmiş ısıl işlem, süt ürünlerinin raf ömrünü uzatmanın en yaygın yöntemlerindendir (De Jong, 2008). Mikrofiltrasyon, gözenek boyutu 1-10 μm arasında değişen membran filtrasyonu ile bakteri ve sporları 200.000 Da'nın üzerindeki moleküler ağırlığa sahip unsurları uzaklaştırılabilmektedir. Ultra filtrasyon (UF), moleküler ağırlıkları 1000 Da ile 200000 Da arasında değişen ve gözenek boyutları 10^4–10^3 μm olan molekülleri ayıran bir filtrasyon yöntemidir (Skeie, 2010). UF en çok peynir verimini artırma, jel oluşturma özelliklerini iyileştirme ve tek tip süt bileşimini kolaylaştırma yeteneği nedeniyle kullanılmaktadır (Banks, 2007).

Baktofügasyon ile sütten bakteri hücreleri ve sporlar uzaklaştırılarak peynirlerin raf ömrünün uzadığı tespit edilmiştir (Ledenbach ve Marshall, 2009). Baktofügasyon, sporların uzaklaştırılması ve aynı zamanda nitrat gibi katkı maddelerinin kullanılmasından kaçınmak için iyi bir yöntem olarak bilinmektedir (Johnson, 2001). Isıl olmayan işlemlerin gıdalarda uygulanması ise zor ve maliyeti yüksek olduğu için tercih edilmemektedir.

2.3.2 Peynire İşlenen Sütün Pastörizasyonu

Pastörizasyon, mikroorganizmaları yok etmek, enzimleri inaktive etmek ve peynir altı suyu proteinlerini kısmen denatüre etmek için peynir sütüne uygulanan ısıl işlemdir (Te Giffel ve Wells-Bennik, 2010). HTST (yüksek sıcaklık/kısa süre) en yaygın pastörizasyon yöntemidir ve genellikle 72°C'de 15 s olarak uygulanmaktadır (Heyndrickx vd., 2010). Pastörizasyon, ısıya en dayanıklı *Coxiella burnetii* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi patojenleri ve küf sporlarını inhibe etmekte, ancak endosporları inaktif hale getirememektedir (De Jong, 2008; Ledenbach ve Marshall, 2009). Endosporların inaktif hale getirilememesi daha önce kullanılan gıda işleme yöntemlerine alternatif yeni gıda işleme ve muhafaza yöntemlerinin araştırılıp yaygınlaşmasına yol açmıştır. Geliştirilen yeni yöntemler tercih edilirken; gıdanın yapısı, tat ve aroması, rengi ve özellikle peynir gibi süt ürünlerinin doğal mikrobiyotasına ve starter kültürlerde yer alan mikroorganizmaların gelişimine olumsuz etkisinin olmaması önemlidir. Yıllardır mikroorganizmaların inaktivasyonunda uygulanan ve hâlâ popüleritesini yitirmeyen başlıca yöntem ısıl işlemdir. Pastörizasyon, gıdanın organoleptik özelliklerini ve besin içeriğini olumsuz etkileyebileceğinden, harcanan enerji de fazla ve maliyetli olduğundan ve pastörizasyonla elimine edilemeyen mikroorganizma varlığından dolayı alternatif yöntemler arayışına girilmiştir.

Gıdalara ilave edilen kimyasal koruyuculara yönelik tüketicilerin olumsuz yaklaşımı ve antibiyotiklere dirençli yeni bakteri suşlarının ortaya çıkması araştırcıları ve üreticileri alternatif, uygulanması kolay, maliyeti düşük ve daha doğal yaklaşımlara yönlendirmektedir (Brovko vd., 2012). Peynir üretiminin tüm aşamalarında sporların canlı kalması ve sütün, ısıtılmasının tek başına sporları etkisiz hale getirememesi nedeniyle peynirlerde *Clostridium* ve sporlarının

gelişmesinin önlenmesi için alternatif ve etkin uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır (Cosentino vd., 2018).

2.3.3 Peynir Üretiminde Koruyucu Laktik Asit Bakterilerinin İlavesi

Antimikrobiyal aktiviteye sahip LAB'ler *Clostridium* türlerinin neden olduğu peynir kusurlarından biri olan geç şişmeyi azaltma potansiyeline sahip olabilmektedir (Rodrıguez vd., 2000). LAB'ler normalde süt ve süt ürünlerinde bulunmakta, hatta bazı türleri peynir yapımında ve fermente süt ürünlerinde kullanılmaktadır. *Clostridium*'lar ise süt içerisinde sıklıkla bulunabilen sporlu bakteriler olup ısıl işleme rağmen canlı kalabilmektedir. Bu nedenle LAB'lerin üründe direkt kullanılması veya metabolitleri sayesinde istenmeyen organizmaların inhibisyonu ile son ürünün kabul kriterlerinde önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir. Bakteriyosin üreticisi olan LAB'lerin, *Clostridium* türleri üzerindeki antagonistik etkisi daha önceki bilimsel çalışmalara konu olmuştur (Mathot vd., 2003; González ve Zárate, 2015; Ávila vd., 2020).

Biyokoruma yöntemleri olarak laktoperoksidaz sistemi, bakteriyosin üretimi olan LAB'nin koruyucu kültür olarak kullanılması gibi yöntemler örnek verilebilir (Temelli ve Çetin, 2011). Laktik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2), diasetil, asetaldehit, asetoin ve reuterin gibi LAB tarafından oluşturulan maddeler de antimikrobiyal özelliktedir (Hugas, 1998; Evren vd., 2006).

Lc. lactis subps. *lactis* suşları tarafından üretilen nisin, üzerinde birçok çalışma yapılmış ve en yaygın kullanım alanı olan bakteriyosindir. Ticari olarak nisin ilk kez, 1950'de peynirde *Cl. tyrobutyricum* gelişimini engellemek amacıyla yapılan bir çalışmada kullanılmıştır (Gharsallaoui vd., 2016).

Nisin, *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinde aktivite gösteren geniş etki spektrumuna sahiptir ve nisinin spor gelişimini önleyici etkisi de vardır (Gharsallaoui vd., 2016; Özel vd., 2018).

Ramseier (1960) yapmış olduğu çalışma ile *Cl. butyricum* hücreleri üzerinde nisinin etkili olduğunu tespit etmiştir. Nisinin hücre içinde hücre membranını parçalayarak akabinde sitoplazmik membranı parçaladığı ve sitoplazmik materyalin bozulması ile etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çimlenme sonunda sitoplazmik membranı sporlar parçalamaktadır (Leuck, 1980). Bakterisidal ve

antimikrobiyal etkinin incelenmesi ile *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin sporlarına karşı nisinin etkili olduğu tespit edilmiştir (Hampikyan ve Çolak, 2007). Nisin çoğu Gram pozitif bakteriye karşı etkili olmasına karşın sporlu bakterilerde aynı etki gözlenememiştir. *Cl. tyrobutyricum*'un vejetatif formuna karşın nisin etkili iken sporlu formunda direnç gösterebildiği tespit edilmiştir. Ancak ısıl işlem görmüş gıdalarda, nisinin etkinliği artmaktadır. Direkt süte nisin ilavesi maliyetli olacağı için nisin üreticisi starter kültür kullanılması önerilmektedir (Delves-Broughton vd., 1996).

Rilla vd., (2003)'te Vidiago peyniri üretiminde nisin üreticisi *Lc. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729'un starter olarak kullanılmasıyla *Cl. tyrobutyricum* inhibisyonunu incelemişlerdir. Vidiago peyniri üretiminde kullanılan sütü kontrollü koşullar altında *Cl. tyrobutyricum* ile kontamine etmişlerdir. 15 günlük olgunlaştırma süreci ile *Cl. tyrobutyricum*'un $1,2x10^6$ kob g^{-1}'dan $1,3x10^3$ kob g^{-1}'a kadar azaldığını bildirmişlerdir.

Matijašić vd., (2007)'de *L. gasseri ile Cl. tyrobutyricum*'un peynir matrisinde etkileşimini incelemişler, peynirlerde *Cl. tyrobutyricum* gelişmesinin yavaşladığını akabinde geç şişmenin azaldığını bildirmişlerdir.

Němečková vd., (2010) yapmış olduğu çalışmada *L. paracasei* 171R2'nin *Cl. tyrobutyricum* üzerine inhibisyonunu incelemişlerdir. Peynirin üretim aşamasında *L. paracasei* 171R2, nisin, nitrat ve lizozim ilave edilmiştir. Olgunlaştırma boyunca 8°C'de 60 gün boyunca muhafaza etmişlerdir. Lizozim, potasyum nitrat ve nisinin 14 gün boyunca güçlü bir antiklostridial etki gösterdiği fakat etkilerinin gün geçtikçe azaldığını tespit etmişlerdir. *L. paracasei* 171R2'nin antiklostridial etkisinin olgunlaştırma boyunca stabil kaldığı ve *Cl. tyrobutyricum* sporlarında 1,5–2 desimal azalma sağladığını bildirmişlerdir.

L. reuteri tarafından üretilen reuterinin; Gram pozitif ve Gram negatif çoğu bakteriye karşı inhibisyon etkisi olduğu (Ávila vd., 2014) bilhassa *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium, Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* ve *Trypanosoma* üzerinde bakteriyostatik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Evren vd., 2006). Gómez-Torres vd., (2014) yapmış olduğu çalışmada *Cl. tyrobutyricum* ile kontamine ettikleri süte reuterin üreticisi *L. reuteri* ilave etmişlerdir. *L. reuteri* ilave edilen peynirlerde 30

günlük depolama sonunda geç şişme gözlemlenmediği belirtilmiştir. Depolamanın 60. gününde yapılan kontrollerde ise *Cl. tyrobutyricum* sporlarında önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiş, araştırma sonunda *L. reuteri'nin Cl. tyrobutyricum*'u inhibe ettiği bildirilmiştir.

Mathot vd., (2003) sert peynir üretiminde *Cl. tyrobutyricum'a* (10^2-10^4 spor g^{-1}) karşı koruyucu kültür *St. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp*. lactis*'i kullanarak yapmış oldukları deneyde, peynirin olgunlaşması aşamasında 20. gün gaz oluşumu tespit edilmemiştir. Aksine, kontrol numunelerinde gaz oluşumu 8 gün sonra meydana gelmiş, 14 gün sonra ise sporların azaldığı tespit edilmiştir.

Tüketici talepleri gıda endüstrisinde bazı istenmeyen mikroorganizmaları kontrol altına almak için yeni metodolojilerin araştırılmasında önemli bir etkendir. Çünkü son zamanlarda tüketiciler kimyasal değil, sadece doğal katkı maddeleri içeren gıda ürünlerini tercih etmektedir. Bu bağlamda biyokoruyucuların kullanılması, istenmeyen mikroorganizmaların kontrol altına alınmasının yanı sıra güvenlik ve sağlık açısından tüketici taleplerinin yerine getirilmesi ile sonuçlanabilecek bir tercih yöntemi olabilmektedir. LAB'ler iyi bilinen biyokoruyucu ajanlar olup (Holzapfel vd., 1995) bazı LAB suşları, fonksiyonel biyolojik koruyucu başlangıç kültürleri olarak kaşar peynirinde *Clostridium* spp.'yi kontrol etmek için kullanılabilmektedir (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Cl. tyrobutyricum'a ve diğer *Clostridium* türlerine karşı ülkemizde *in situ* bakteriyosin uygulamasına dair literatürde kapsamlı bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Son zamanlarda, alternatif bir yöntem olan bakteriyosinojenik LAB'lerin peynir teknolojisine doğrudan uygulanması araştırılmıştır (Grattepanche vd., 2008; Garde vd., 2013; Gómez-Torres vd., 2014; Furtado vd., 2015). Bakteriyosinojenik bakterilerin bir başlangıç kültürüne eklenmesi, olgunlaşma süreci sırasında istenmeyen mikroorganizmalara karşı koruma sağlayabileceği ve peynirlerin raf ömrünü uzatabileceği açıklanmıştır (Briggiler-Marcó vd., 2007).

Peynirlerde biyokoruyucu olarak bakteriyosin ürecisi LAB'ler kullanılabilmektedir. Peynirlerde koruyucu kültür kullanılması, genellikle iki aylık olgunlaşmadan sonra yarı sert (%39-%50 nem) ve sert peynirler (<%39 nem) için (Cogan ve Beresford,

2002), geç şişme kusuruna neden olan *Clostridium* spp.'nin inhibisyonu için önemlidir. Diğer fermente gıda türleri ile karşılaştırıldığında, peynir üretiminde bakteriyosinlerin kullanımı sınırlıdır ve peynir matrisindeki gerçek etkilerinin araştırılması son derece karmaşıktır. Patojenik bakterilerin veya mikrobiyal bozulma ajanlarının gelişmesini önlemek veya peynirin olgunlaşma ve duyusal özelliklerini iyileştirmek için önerm arzetmektedir (Špehar vd., 2020).

2.3.4 Peynire İşlenecek Süte Nitrat İlavesi

Nitratlar genellikle *Clostridium*'ları inhibe etme yeteneklerinden dolayı salamurada tuzlanmış peynirlere eklenir (Beresford, 2007). Örneğin nitrat ilavesi ile ilgili temel sorun asidik koşullarda nitritin peynirdeki aromatik amino asitler ile birleşip potansiyel kanserojen nitrozaminlere dönüşme ihtimali yüksektir ve sağlık açısından önemli riskleri beraberinde getirebilmektedir. Ayrıca peynir üretiminde rol alabilecek diğer mikroorganizmalara potansiyel olumsuz etkisi nitrat kullanımını sınırlandırmaktadır. Nitrat ilavesi ile ilgili temel sorun; peynir olgunlaştıkça nitratın nitrite dönüşmesidir. Nitrozamin; nitritin aromatik amino asitler ile reaksiyonu sonucunda oluşur (Beresford vd., 2001). EFSA nitrozamin seviyesini olabildiğince düşük tutmak için nitrat ve nitrit kullanımını gıda katkı maddesi olarak en az düzeyde istemektedir (Ávila vd., 2014).

2.3.5 Peynire İşlenecek Süte Lizozim İlavesi

Clostridium'ların peynirde gelişmesini engelleyebilecek bir diğer uygulama da süte lizozim ilavesidir. Lizozim vejetatif *Clostridium*'ların hücre duvarlarını lize etme şeklinde etkisini gösterip bakterinin gelişimini ve bütirik asit fermentasyonunu engelleyerek peynirlerde geç şişme sorununu giderebilmektedir. Sütte *Clostridium* sporlarının yüksek olması lizozimin etkinliğini azaltmaktadır. Aynı zamanda peynir üretiminde kullanılan starter kültürler de lizozimden olumsuz etkilenmektedir.

Bitki, mikroorganizma, yumurta ve hayvansal salgılardan elde edilen lizozim antimikrobiyal bir enzimdir (Lopes vd., 2019). *Clostridium* spp. ve diğer Gram pozitif bakterileri inhibe edebilme özelliğine sahiptir (Öztürkcan ve Sıla, 2017). Wasserfall ve Teuber (1979) yapmış olduğu çalışma ile lizozimin *Cl. tyrobutyricum*'un vejetatif hücre duvarlarını lize etme şeklinde etkisini gösterip

bakterinin gelişimini ve bütirik asit fermentasyonunu engelleyerek peynirlerde geç şişme sorununu giderebileceğini açıklamıştır. Ancak sütteki yüksek *Cl. tyrobutyricum* sporları olduğu sürece lizozim beklenen etkinliği gösterememektedir. Aynı zamanda peynir üretiminde kullanılan starter kültürlerin de bu uygulamadan olumsuz etkilenebildiği ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, peynirdeki lizozim konsantrasyonları önemli (250-400 mg kg^{-1}) olduğundan ve gıda alerjisinin ön plana çıkmasından dolayı yumurta alerjisi olan tüketicilerde lizozimin potansiyel alerjenitesine ilişkin bazı endişeler son zamanlarda ortaya çıkmıştır (EFSA, 2005). Süte %0,03 oranında ilave edilerek peynirde geç şişme olayı engellenebilmektedir. Çoğu mandırada yumurta beyazından ekstrakte edilen lizozim (E1105), geç şişme kusurunu önlemek için kullanılmaktadır (Cosentino vd., 2015). Ávila vd., (2014)'de lizozimin belirli *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum* ve *Cl. beijerinckii* suşları üzerinde inhibitör etkilerini bildirirken*, Cl. sporogenes* için hiçbir inhibitör etki kaydedilmemiştir.

2.3.6 Bakteriyofaj Uygulaması

Bakteriyofaj uygulaması; biyokoruma yöntemlerinden birisi olarak ön plana çıkmaktadır. Bakterilerin yanı sıra diğer prokaryot hücrelere de etki eden, insanlar için patojen olmayan gıda güvenliğini tehdit eden bakterilerin gıda matriksinden veya gıda ambalajı, alet ve ekipman gibi gıda ile temas eden araçlardan mikroorganizmaların elimine edilmesi için kullanılmaya başlanmıştır. Bakterilerin doğal öldürücüleri olarak kabul edilen bakteriyofajlar gıda güvenliğinin sağlanması için kullanımları hakkında birçok araştırma yapılmıştır (Mayer vd., 2010; Gómez-Torres vd., 2019; Mohammadi vd., 2022; Tabla vd., 2022).

Gıdalar, *Campylobacter* (Goode vd., 2003; Loc Carrillo vd., 2005), *Esherichia* (O'flynn vd., 2004; Abuladze vd., 2008), *Brochothrix* (Greer ve Dilts, 2002), *Salmonella* (Whichard vd., 2003; Pao vd., 2004; Leverentz vd., 2006) ile kontamine edilerek, fajlar ile biyokontrol çalışması yapılmıştır.

Bakteriyofaj kullanmanın avantajı, bakteri popülasyonlarının, doğal mikrobiyotayı bozmadan ve gıda fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadan selektif olarak kontrol edilebilmesidir. Ayrıca, faj

tedavilerinin diğer tedavilere kıyasla daha ekonomik olduğu rapor edilmiştir (Pérez Pulido vd., 2016).

Gıda koruyucu amaçlı ticari faj preparatlarının üretimine FDA 2006 yılında onay vermiştir (O'Flaherty vd., 2009). Bakteriyofajların gıdalarda patojen bakterilere karşı kullanılması doğal biyokoruyucular arasında en umut verici sistem olarak görmesine neden olmuştur (Şanlıbaba ve Uymaz, 2015).

Cl. tyrobutyricum'a karşı *in situ* faj uygulamasına dair örnekler literatürde ulaşılamamıştır. Ancak Mayer vd., (2010) tarafından yapılan çalışma ile *Cl. tyrobutyricum*'a özel bir bakteriyofajın ortaya çıkartılması ve sonrasında bu fajın tüm genom sekansının açığa çıkartılarak fajın litik evrede hücre içinden dışına çıkmasını sağlayan endolisin proteinin farklı bir konakta üretilmesi ve endolisinin bu bakteriyi *in vitro* olarak parçalama kabiliyeti açığa çıkarılmıştır.

2.4 Dünya ve Türkiye'de Peynir Üretimi ve Tüketimi

Çiğ süt üretimi dünyada 2019 yılında %1,3 oranında artış sağlayarak 2020 yılında yaklaşık 875 milyon tona ulaşmıştır. Süt üretimindeki artış ile dünya süt ithalatı 2020 yılında %3,7 artış sağlayarak 1,5 milyon ton, dünya süt ihracatı %1,4 artış sağlayarak 1,9 milyon tona ulaşmıştır. Dünyada peynir üretimi, 2019 yılında %1,24 oranında artış sağlayarak yaklaşık 24 milyon tona ulaşmıştır. Küresel peynir ithalatı 2019 yılında %1,8 oranında artış sağlayarak 2,6 milyon tona, peynir ihracatı %1,74 artış sağlayarak 2,7 milyon tona ulaşmıştır (TÜİK, 2020). Süt ve süt ürünleri (süt kategorisine göre) yıllık üretim miktarı ve değişim oranları, Tablo 2.1'de verilmiştir.

Türkiye'de süt üretimi 2018 yılına göre %3,8 artış sağlamış ve yaklaşık 23 milyon tona ulaşmıştır. Türkiye'de sağılan hayvan sayısı her yıl artış göstermekte ve 2019 yılında bir önceki yıla göre %4,6 artış sağlayarak 31,9 milyon başa ulaşmıştır. Türkiye'de peynir üretiminin 2019 yılına göre %9,7 artış sağlayarak 767 bin tona, toplam arzın ise %8,4 artışla 774 bin tona ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca 2019 yılında peynir ihracatı %2,2 azalarak 49 bin tona ulaşmıştır (TÜİK, 2020). Süt ve süt ürünleri (sertlik derecesine göre) üretimi Tablo 2.2'de verilmiştir. IDF yapmış olduğu araştırma ile peynir üretiminde %90 inek sütünün kullanıldığını bildirmiştir. TÜİK (2022) verilerine göre 2021 ocak ayına göre ticari süt işletmeleri

tarafından yapılan tereyağı üretiminin %55,7, ayran üretiminin %28,6 artış gösterirken; inek peyniri üretiminin %11,5, yoğurt üretiminin %9,7, içme sütü üretiminin %8,4 ve toplanan inek sütü miktarı %5,7 azaldığı bildirilmiştir. Toplanan inek sütü ile üretilen süt ürünleri miktarının Tablo 2.3'te verilmiştir. Manda, keçi ve koyun sütlerinden yapılan peynirler ile ev yapımı olan ve ev içinde tüketilen peynirler hariç tutulmuştur. Son 20 yılda peynir üretimi, tüketimi ve uluslararası ticarette istikrarlı yer edinmesiyle en dinamik gıdalardan biri olmasına rağmen; son birkaç yılda peynir üretiminin azalmasının temel sebebi; Avrupa'daki üretime bağlıdır. Toplam peynir üretiminin önemli bir kısmını oluşturan endüstriyel inek sütü peynirlerinin yurtiçi talebindeki azalma nedeniyle Avrupa'da üretim hızı azalmıştır.

Avrupa ve Kuzey Amerika'da süt ürünleri tüketiminin 2020 yılında önemli bir bölümünü peynir oluşturmaktadır. Dünyada peynir üretiminde lider ülkeler Tablo 2.4'te verilmiştir. Peynir tüketimi Dünya genelinde artış göstermektedir. Peynir tüketiminin kişi başı en yüksek olduğu ülkeler arasında AB, ABD, Yeni Zelanda ve Kanada yer almaktadır. OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028 ön çalışma raporuna göre 2021'de peynir üretiminin 2020 yılına göre %1,2 artış göstererek 24,5 milyon tona ulaşması beklenmektedir (FAO, 2020). Türkiye'de en çok tüketilen süt ürünlerinden biri de peynirdir. Peynir üretimine paralel, tüketimininde arttığı peynir çeşidi beyaz peynirdir. Beyaz peynir en yüksek pazar payına sahiptir. USK entegre süt işletmeleri inek, koyun, keçi ve manda sütü dışındaki süt üretim miktarı ile peynir ithalat ve ihracatının da eklenerek yapılan hesaplama ile Türkiye'de 2019 yılında kişi başı yıllık peynir tüketim miktarının 17,5 kg olduğu tespit edilmiştir (Ulusal Süt Konseyi, 2019).

Tablo 2.1 Süt ve süt ürünleri (süt kategorisine göre) yıllık üretim miktarı ve değişimi 2020, 2021 (TÜİK).

Peynir (süt kategorisine göre)	Miktar (ton)		Değişim oranı (%)
	2020 yılı	2021 yılı	
İnek peyniri	729 539	728 777	-0,1
Koyun peyniri	1 050	1 016	-3,2
Keçi peyniri	385	236	-38,5

Tablo 2.1 Süt ve süt ürünleri (süt kategorisine göre) yıllık üretim miktarı ve değişimi 2020, 2021 (TÜİK) (devamı).

Manda peyniri	132	159	20,4
Karışık sütten elde edilen peynir	25 541	24 642	-3,5

Tablo 2.2 Süt ve süt ürünleri (sertlik derecesine göre) üretimi, 2021 (TÜİK).

	Miktar (ton)		Değişim (%)
Peynir (sertlik derecesine göre)	2020 yılı	2021 yılı	
Yumuşak peynirler	125 556	94 527	-24,7
Orta yumuşaklıkta peynirler	228 026	246 577	8,1
Sert peynirler	159 819	146 534	-8,3
Orta sertlikte peynirler	232 419	252 391	8,6
Çok sert peynirler	9 573	9 030	-5,7
Kesilmiş sütten elde edilen peynirler	1 252	5 772	360,9

Tablo 2.3 Toplanan inek sütü ile üretilen süt ürünleri miktarı (ton).

	Ocak 2021	Ocak 2022	Değişim (%)
Toplanan inek sütü	887 275	836 959	-5,7
İçme sütü	144 928	132 726	-8,4
Yoğurt	95 289	86 025	-9,7
İnek peyniri	61 323	54 242	-11,5
Ayran	42 148	54 191	28,6
Tereyağ	5 949	9 260	55,7

Tablo 2.4 Dünyada peynir üretiminde lider ülkeler.

Ülke	2019 (Milyon ton)	2018-2019 değişimi
AB-28	9,6	+ %1,2
ABD	6,0	+ %0,8

Tablo 2.4 Dünyada peynir üretiminde lider ülkeler (devamı).

Brezilya	1,0	+ %2,4
Türkiye	0,7	- %0,6
Meksika	0,5	+ %13,9
Arjantin	0,6	+ %0,2
Mısır	0,4	+ %11,0

Süt ve süt ürünleri tüketimi verileri her yıl uluslararası birçok kuruluş tarafından paylaşılmaktadır. Dünya çapında önemli miktarda süt ve süt ürünü resmi istatistiklere dahil edilmeksizin kontrolüz pazarlanmakta ve tüketim verileri farklılık göstermektedir. IDF süt ve süt ürünleri tüketimi, ticaret ve stok miktarı göz önüne alınarak sadece üretilen süt ve süt ürünleri bazında hesaplanmaktadır. IDF'nin yapmış olduğu açıklamada yıllık kişi başı içme sütü tüketiminin en yüksek olduğu ülkeler Avustralya ve Yeni Zelanda'dır. Ülkemizde 2019 yılında yıllık kişi başı süt tüketiminin 276 kg/kişi süt eşdeğeri olduğu açıklanmıştır. Kişi başı peynir tüketiminde ise Avrupa, Kuzey Amerika ve İsrail ilk sırada yer alırken pek çok Avrupa ülkesinde kişi başı yıllık tüketim 20 kg'ın üzerindedir.

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 *Clostridium* Türlerinin İzolasyonu İçin Kullanılan Numuneler

Bu çalışmada Kayseri ilinden geç şişme görülen 1 tane eritme kaşar peyniri, Çanakkale ilinden geç şişme görülen 1 tane Ezine beyaz peyniri, Bayburt ve İstanbul'da tüketime sunulan 8 tane Kars kaşarı, 3 tane Ezine peyniri, 1 tane Trakya eski kaşarı, 3 tane Mihaliç peyniri, 1 tane beyaz peynir, büyükbaş hayvan beslenmesinde kullanılan 1 tane besi yemi, 1 tane buzağı yemi ve 1 tane, süt yemi olmak üzere toplam 21 adet örnek toplanmıştır. Toplanan örneklerle ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 3.1'de ve numunelere ait görseller Şekil 3.1'de verilmiştir. Peynir numuneleri analiz sürecince steril numune torbalarında soğuk zincir korunarak laboratuvara transfer edilmiş ve buzdolabı şartlarında muhafaza edilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler, geç şişmeye sebep olan *Clostridium* türlerinin izolasyonu amacıyla analiz edilmiştir.

Tablo 3.1 Tez kapsamında toplanılan örneklere ait bilgiler.

Sıralama	Örnek kodları	Tez kapsamında çalışılan örnekler
1	KK-1	Kars Kaşarı
2	KK-2	Kars Kaşarı
3	KK-3	Kars Kaşarı
4	KK-4	Kars Kaşarı
5	KK-5	Kars Kaşarı
6	KK-6	Kars Kaşarı
7	KK-7	Kars Kaşarı

Tablo 3.1 Tez kapsamında toplanılan örneklere ait bilgiler (devamı).

8	EP-1	Ezine Beyaz Peynir
9	EP-2	Edirne Ezine Peynir
10	TEK-1	Trakya Eski Kaşarı
11	MP-1	Mihaliç Peyniri
12	MP-2	Mihaliç Peyniri
13	MP-3	Mihaliç Peyniri
14	EK-1	Eski Kaşar
15	ÇEK-1	Çanakkale Ezine Klasik Peynir
16	YP-1	Yağlı Peynir
17	KP-1	Eritme Kaşar Peynir
18	EB-1	Ezine Beyaz Peynir (Tam Yağlı Olgunlaştırılmış)
19	Y-1	Buzağı Yemi
20	Y-2	Süt Yemi
21	Y-3	Besi Yemi



Şekil 3.1 Tez kapsamında toplanılan peynir ve yem örnekleri.

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

Bu çalışmada; Nutrient Agar (NA, Merck - 105450), Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (WCA, Merck - W1761), Tryptic Soy Agar (TSA - Merck - 105458), Clostridial Nutrient Medium (CNM, Merck - 27546), Brain Heart Infusion Agar (BHI, Merck - 70138), Plate Count Skim Milk Agar (PCSA - Merck, 155338), Reinforced Clostridial Medium (RCM - Merck, 105411), M17 Broth (Merck - 115029), M17 Agar (Merck - 115108), MRS Broth (Merck - 110661), MRS Agar (Merck - 110660), Luria-Bertani Broth (LB, Merck - 110285), Luria-Bertani Agar, (LBA,

Merck - 110283), Potato Dextrose Agar (PDA, Merck - 1.10130) ve Bryant Burkey with Resazurin and Lactate Broth (BB - Merck, 101617) besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.3 PCR Aşamasında Kullanılan Sarflar

Tez kapsamında DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μL) enzimi kullanılmıştır. AMP-F GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG ve AMP-R AAGGAGGTGATCCARCCGCA, primerleri bakterilerin tanımlanmasında (Baker vd., 2003) kullanılırken, GTG5 GTGGTGGTGGTGGTG primerinden ise bakterilerin profillerinin (Oguntoyinbo vd., 2010) açığa çıkarılmasında faydalanılmıştır.

3.1.4 Peynir Üretiminde Kullanılan Bileşenler

3.1.4.1 Çiğ Süt

Kaşar peynir ve beyaz peynir üretiminde kullanılab tam yağlı çiğ inek sütü Bakır Helke (İstanbul) süt işletmesinden temin edilmiştir.

Çiğ inek sütüne uygulanan fizikokimyasal analizlerin sonucu Tablo 3.2'de verilmiştir. Çiğ inek sütüne uygulanan analizlerin hesaplamaları inek sütleri ile benzer bileşime sahip olup, Türk Gıda Kodeksinde verilen değerlere çok yakındır ve kabul edilebilir aralıklarda bulunmuştur.

Tablo 3.2 Kaşar ve beyaz peynir üretiminde kullanılan çiğ sütün bazı fizikokimyasal özellikleri.

Özelliği	Ortalama±SS
pH	6,67±0,01
Titrasyon asitliği (LA%)	0,16±0,02
Kuru madde (%)	11,16±0,77
Yağ (%)	3,59±0,01
Kül miktarı	0,73±0,35

3.1.4.2 Peynir Mayası

Peynir üretiminde kullanılan Trakya peynir mayası, mikrobiyal kaynaklı sıvı enzim çözeltisi (kimozin), Chr Hansen, Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.1.4.3 Kalsiyum klorür

Peynir üretiminde kullanılan kalsiyum klorür Aromel Kimya'dan temin edilmiştir.

3.1.4.4 Tuz

Peynirlerin salamurasında kullanılmak üzere yerel marketlerden temin edilen iyotsuz tuz kullanılmıştır.

3.1.4.5 Koruyucu Kültür Olarak Kullanılan Laktik Asit Bakterileri

Tez kapsamında kullanılan LAB'ler daha önce yapılan bir çalışma kapsamında peynir ve yoğurttan izole edilmiş olup Bayburt Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Doç. Dr. Enes Dertli'nin kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (İspirli vd., 2017; İspirli ve Dertli, 2018). Bakterilerin tür adı ve kod numaraları Tablo 3.3'de verilmiştir. Bölüm 3.2.7 ve 3.2.8'de verilen antiklostridial ve antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesi denemelerinde en iyi özellik gösterdiği belirlenen *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) suşları kullanılmıştır.

Tablo 3.3 Çalışma kapsamında kullanılan LAB'leri.

L. plantarum	*Leu. mesenteroides*	*St. thermophilus*	*Lc. lactis* subsp. *lactis*
Y32 (B, K, B1)	Y35 (B, K, Ş)	Y89	PY80 (B, K)
Y43 (B, K)	Y54 (B, K)	Y92	PY81 (B, K)
Y48 (B)		Y98	PY82 (B, K)
Y48		Y127 (B, K)	PY83 (B, K)
Y51 (B, K)		Y122	PY91 (B, K)

Tablo 3.3 Çalışma kapsamında kullanılan LAB'leri.(devamı).

	Y125	PY142 (B, K)
	Y128 (B, K)	
	PY49 (B, K)	

3.2 Metot

3.2.1 *Clostridium* spp. Varlığının Belirlenmesi

Clostridium spp. varlığının belirlenmesi için cam tüplere, 9 mL Bryant Burkey Broth with Resazurine and Lactate besiyerinin üzerine 1 g numune (peynir ve yem örnekleri) eklenmiştir. Tüplerin üzerine steril edilen katı parafinden yaklaşık 4 mL (2 cm yüksekliğinde) ilave edilmiştir. Cam tüpler 75°C'de 10 dakika su banyosunda bekletilerek refakatçi mikroorganizmaların vejetatif hücrelerin inhibisyonu sağlanmıştır ve akabinde 37°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gaz oluşumu gözlemlenen 12 adet peynirden *Clostridium* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 *Clostridium* Türlerinin İzole Edilmesi

Mikrobiyolojik analizler için gaz oluşumu gözlemlenen 12 adet peynir örneğinden 10 g alınarak 90 mL %2 sodyum sitrat ile stomacherde homojenize edilmiş ve akabinde 75°C'de 10 dk su banyosunda bekletilerek refakatçi florada bulunan vejetatiflerin inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. Seri dilüsyonları %0,85 NaCl içeren FTS içerisinde 1/10'luk dilüsyonlar olarak hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan NA, WCA, TSA, CNM, BHI ve RCM besiyerlerine uygun metot ile ekimleri gerçekleştirilmiştir (Harrigan, 1998). 37°C'de inkübe edilen petrilerden koloni seçilerek, seçilen kolonilerin fenotipik karakterizasyonu belirlenmiştir. İzolatlar, %40 gliserol ile cryo viallerde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 En Muhtemel Sayı (EMS) Metodu

En Muhtemel Sayı; sıvı besiyeri kullanılarak yapılan sayım yöntemidir. Yöntemin temeli, ardışık 3 dilüsyondan 3'er adet Bryant Burkey with Resazurin Brotha 1 mL

ekim, inkübasyonu takiben pozitif ya da negatif tüplerin değerlendirilmesi ile elde edilen verinin, istatistiksel yöntemlerle hazırlanmış ve C bölümünde verilen tablodan gram veya mililitredeki canlılık sayısını ifade etmede kullanılan yöntemdir (Halkman ve Doğan, 2000; Morandi vd., 2021).

3.2.4 Fenotipik Karakterizasyon

3.2.4.1 Gram Boyama

Gram boyama yapılması için izolatlar uygun besin ortamında 18-24 saat inkübe edilmiştir. Katı besiyerinde gelişen izolatlar öze yardımıyla lam üzerine yayılarak bunzen beki alevinde fikse edilmiştir. Preparata sırasıyla Gram boyama protokolü uygulanmıştır. Kristal viyole boyasıyla 1 dk bekletilmiş, Kristal viyole lamdan uzaklaştırılmış ve üzerine lügol damlatılarak 1 dk süre tutulmuştur. Lügol çözeltisi lamdan uzaklaştırılmış, preparat dekolorizatör ile renk açılana kadar muamele edilmiştir. Preparat sulu füksin ile 30 sn bekletilmiştir ve sulu fükisinin uzaklaştırılması akabinde lam su ile iyice yıkanmış ve kuruması için beklenmiştir. Işık mikroskobunda immersiyon yağı ile x100'lük objektifinde incelenmiştir. Koyu mavi-mor renginde görüntülenenler Gram pozitif bakteriler, pembe renginde görüntülenenler ise Gram negatif olarak kabul edilmiştir (Sert, 2002).

3.2.4.2 Katalaz Testi

Bir gecelik taze kültürlerden öze yardımı ile lama alınarak üzerlerine %3 Bactident Catalase (Merck 1.11351) çözeltisinden 20 μL damlatılmıştır. Pozitif olarak değerlendirilmesi için gaz çıkışının oluşumu takip edilmiştir (Pichhardt, 2004).

3.2.4.3 Spor Boyama

Prosedüre uygun preparat hazırlanarak kurutulmuştur. Preparat %5 malaşit yeşili solüsyonu ile 5 dk boyanmıştır. Boyama esnasında lama ısı uygulanmış ve soğuduktan sonra saf su ile yıkanmıştır. Ardından %0,5 safraninle 30 sn boyanarak tekrar saf su ile yıkanmış ve lamlar kurutulduktan sonra ışık mikroskobunun x100 objektifinde immersiyon yağı damlatılarak incelenmiştir. Preperatta yeşil renk görünen hücreler spor, kırmızı renk görünen hücreler ise vejetatif hücreler olarak değerlendirilmiştir (Sert, 2002).

3.2.5 Kültür Stoklarının Oluşturulması ve İzolatların Saklanması

Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturan 83 izolat %40 gliserol ortamında Bryant Burkey Broth and lactate with resazurin Broth besiyerinde cryo vialleri hazırlanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6 Genotipik Özelliklerin Belirlenmesi

3.2.6.1 Genomik DNA İzolasyonu

İzolatların tanımlanması için genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla -80°C'de stokta bulunan bakteri kültürleri BB Brothda aktifleştirilmiştir. Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit protokolü uygulanarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar -18°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6.2 *Clostridium* İzolatlarının 16S rRNA Gen Sekansı ile Tanımlanması

Tanımlama amacıyla 16S gen bölgesi ile ilgili primerlerden AMP-F (GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG), AMP-R (AAGGAGGTGATCCARCCGCA) kullanılarak hedef gen bölgesi çoğaltılmıştır (Baker vd., 2003). PCR işlemi için; ilgili bakterinin genomik DNA'sından 1 µL alınarak Tablo 3.4'te verilen PCR bileşenleri hazırlanmış ve Tablo 3.5'de verilen PCR şartlarına göre işlem gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4 16S rRNA geninin amplifikasyon PCR karışımı.

PCR karışımı bileşenleri	PCR bileşenlerinin miktarı
H_2O	25 μL için
Buffer solutions	2.5 μL
dNTP miks	2 μL
P1 (AMP-F)	0,50 μL
P2 (AMP-R)	0,50 μL
Taq polimeraz enzimi	0,0625 μL
DNA	1 μL

Tablo 3.5 16S rRNA geninin amplifikasyonu için PCR şartları.

PCR aşamaları	PCR çalışma koşulları	
Ön Denatürasyon	95°C 2 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C 0,30 s	
Bağlanma	55°C 1 dk	20 döngü
Uzama	72°C 0,30 s	
Son uzama	72°C 5 dk	
Bekleme	4°C	

3.2.6.3 Agaroz Jel Elektroforezinde PCR Ürünlerinin Kontrolü

PCR ürünlerinin kontrolü amacıyla 0,5X Tris borat EDTA (TBE) tamponuyla %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu tamamlanan ürünlerden 5 µL alınıp yükleme boyası ile karıştırılarak jel elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforez işleminin ardından jel, 30 dk süreyle 1 mg L^{-1}'lik etidyum bromid çözeltisinde tutularak DNA boyanmıştır. Akabinde UV Transilluminatör (Cleaver) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.6.4 Dizi Analizi

Bakterilerin tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen 16S rRNA dizi analizi, Medsantek Laboratuvar Malzemeleri San. ve Tic. Ltd Şti'nden hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5 İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik Analizinin Yapılması

Tez çalışması kapsamında izole edilen bakteriler için MEGA-X programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında neighbour-joining (NJ) metodu kullanılmıştır (Saitou ve Nei, 1987).

3.2.6.6 RAPD-PCR ile suşların ayrımı

Genomik DNA izolasyonu 3.2.5.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Morfolojik açıdan farklı kolonilerden seçilerek geliştirilen ve ardından saflaştırılan kolonileri ayırt

etmek amacıyla gerçekleştirilen RAPD-PCR (Rastgele Amplifiye edilmiş Polimorfik DNA) analizi için PCR karışımları Tablo 3.6'daki gibi yapılmıştır. RAPD-PCR analizinde GTG5 (GTGGTGGTGGTGGTG) primeri kullanılmıştır (Oguntoyinbo vd., 2010). PCR koşulları Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.6 RAPD-PCR karışımı.

Bileşen adı	Miktar
H_2O	50 μL için
Buffer	5 μL
dNTP miks	4 μL
P1 (GTG5)	1,50 μL
Taq polimeraz	0,125 μL
DNA	1 μL

Tablo 3.7 RAPD-PCR koşulları.

Ön Denatürasyon	95°C 10 dk	1 döngü
Denatürasyon	94°C 1 dk	
Bağlanma	40°C 1 dk	35 döngü
Uzama	65°C 8 dk	
Son uzama	65°C 8 dk	
Bekleme	4°C	

3.2.7 Tanımlanan *Clostridium* Türlerinin En Muhtemel Sayı Yöntemi ile Sayımlarının Yapılması

Clostridium spp. olduğu açığa çıkarılan kültürler pipet yardımı ile 1000 μL, 100 μL ve 10 μL'lik dilüsyonlar şeklinde BB Brotha inoküle edilmiştir. Her bir dilüsyondan 3'er adet inoküle edilmiştir. İnoküle edilmiş tüpler, 37°C'de 48 sa süreyle %5 CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonucunda gaz oluşumu olan tüpler pozitif (+), gözlenmeyen tüpler ise negatif (-) sonuç olarak değerlendirilmiştir (Esteban vd., 2020). C bölümündeki EMS tablosundan yararlanılarak bakteri sayısı tespit edilmiştir (ISO, 2015).

3.2.8 LAB Şuşlarının Antiklostridial Aktivitesinin Belirlenmesi

LAB kültürleri ilgili MRS ve M17 Brotha inoküle edilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir. LAB'nin hücrelerini uzaklaştırmak için santrifüj koşulları; 4°C'de, 4000 × g'de 10 dk'dır. Süpernatantlar, 0,22 µm membran filtrelerden filtre edilmiştir. İndikatörlerin hazırlanması için *Clostridium* izolatları BHI Brotha inoküle edilmiş ve anaerobik olarak 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. Aktifleşen *Clostridium* kültürlerinden BHI Agara inoküle edilerek dökme ekim yapılmıştır. Petrilere çapı 10 mm'lik kuyucuklar açılmış, 100 µL LAB süpernatantı, her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. 37°C'de 72 sa anaerobik koşullarda petriler inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72 saatin sonunda kuyuların etrafındaki inhibisyon bölgelerinin (zon) çapları ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiştir (Christiansen vd., 2005).

3.2.9 LAB Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Patojen mikroorganizmalar TSB (Tryptic Soy Broth) besin ortamına %1 inoküle edilerek 37°C'de aktifleştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi İspirli vd., (2015) çalışmalarında yapmış olduğu gibi agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan patojen bakterilerle ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 3.8'de verilmiştir. Antimikrobiyal etkinliği belirlemek için, bakteriler 5 mL MRS Broth ve M17 Broth besin ortamınına %1 inoküle edilmiş ve 37°C'de bir gece boyunca aktifleştirilmiştir. Bakteriler, 2000 × g'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant 0,22 µm membtan filtre kullanılarak filtre edilmiştir. Süpernatantın pH'ı nötrlenmiştir. 25°C'de katalaz (Merck) ile 30 dk boyunca muamele edilmiştir. Hedef patojen suşları TSA'ya dökme ekim yapılmıştır, petriler yaklaşık 1 sa

bekletildikten sonra 10 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklar %0,7 agar içeren TSA ile kaplanmıştır. Kuyucuklara ilgili süpernatantlardan 100 µL ilave edilmiştir. 37°C'de bir gece inkübe edilen petrilerde kuyucuk etrafında oluşan zon çapları mm cinsinden kaydedilmiştir.

Tablo 3.8 Çalışma kapsamında kullanılan patojen mikroorganizmalar.

Patojen mikroorganizmalara ait kodlar	Suş adı
P12	*E. coli* BC 1402
P60	*B. cereus* BC 6830
P78	*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium RSSK 95091
P94	*S. aureus* ATCC 25923

3.2.10 LAB Suşlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

LAB izolatlarının, *M. luteus* DSM1790'a karşı bakteriyosin ve benzeri maddelerinin üretmesine bağlı antimikrobiyal etkinliği agar kuyucuk ve disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.10.1 LAB İzolatlarının Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerinin Agar Kuyucuk Yöntemi ile Belirlenmesi

LAB izolatlarının, *M. luteus* DSM1790'a karşı bakteriyosin ve benzeri maddelerinin üretmesine bağlı etkinliği agar kuyucuk yöntemi ile tespit edilmiştir (Tagg ve McGiven, 1971). LAB, MRS ve M17 Broth besiyerinde aktifleştirilmiş, 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. LAB'leri, 6000 × g 15 dk santrüfüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant, pH'ı 6'ya ayarlanmış ve 30 dk 25°C'de katalaz (Merck) ile muamele edilmiştir. İşlemlerin sonunda 0,22 µm membran kullanılarak filtre edilmiştir. LB Broth ortamında geliştirilen indikatör bakteriden 100 µl alınarak, 20 mL LB Agara dökme ekim yapılmıştır. Agar katılaştıktan sonra 10 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklar %0,7 agar içeren LBA ile kaplanmıştır. Kuyucuklara ilgili süpernatantlardan 100 µL ilave edilmiştir. Aynı zamanda LAB türlerinden elde edilen süpernatanlar; işlem uygulanmadan sadece 0,22 µm

membran filtre kullanılarak filte edilmiş ve 100 µL eklenmiştir. 37°C'de bir gece inkübe edilen petrilerde kuyucuk etrafında oluşan zon çapları mm cinsinden kaydedilmiştir.

3.2.10.2 LAB İzolatlarının Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

M. luteus DSM1790, LB (Luria-Bertani Broth) besiyerinde %1 inoküle edilerek 37°C'de aktifleştirilmiştir ve disk difüzyon yöntemi İspirli vd., (2015) belirlediği metoda göre yapılmıştır. Bakterilerin bakteriyosin ve benzeri maddelerden kaynaklı etkinliğinin saptanması için, kültürler 10 mL MRS (laktobasiller için) ve M17 (laktokoklar için) Brothda %1 inoküle edilerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Bakteriler 5 dk 2000 × g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0,22 µm membran filtrelerden filtre edilmiştir. Filtre edilen süpernatantın pH'ı 6,0'ya ayarlanmış, 30 dk 25°C'de katalaz ile muamele edilmiştir. Ardından süpernatant 0,22 µm filtre kullanılarak filtre edilmiştir. Süpernatantlar liyofilize edilmiş ve steril saf suda dört farklı konsantrasyonda çözündürülmüştür (1:1, 1:2, 1:4 ve 1:6 g mL^{-1}). *M. luteus* DSM1790 LBA (Luria-Bertani Agar) besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Petriler yaklaşık 1 sa bekletildikten sonra diskler yerleştirilmiştir. Disklere ilgili süpernatantlardan 40 µL eklenmiştir. 37°C'de bir gece inkübasyonu takiben inhibisyon bölgesinin zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür.

3.2.11 LAB'de Belirlenen Bakteriyosin veya Bakteriyosin Benzeri Maddelerin Ön Karakterizasyonu

Bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddelerin yapısını tespit etmek amacıyla farklı pH, farklı enzim, farklı sıcaklık ve sürelerde etkileri belirlenmiştir.

3.2.11.1 Proteinaz-K ve Tripsin Enziminin Etkisinin Belirlenmesi

Nötralize edilen süpernatantlara iki farklı enzim uygulanmıştır. 0,22 µm'lik membran filtreden filtre edilmiştir. Bakteri süpernatantına; proteinaz K (1 mg mL^{-1}) ve tripsin (1 mg mL^{-1}), enzimleri eklendikten sonra 37°C'de 1 sa inkübe edilmiş, enzimin inaktivasyonu için 100°C'de 5 dk bekletilmiştir. Süpernatantlar liyofilize edilmiş ve steril saf suda bire bir konsantrasyonda çözündürülmüştür (1:1 g mL^{-1}) ve disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Zon çapları kaydedilmiştir (Strompfová vd., 2003).

3.2.11.2 pH'nın Etkisinin Belirlenmesi

pH'nın etkisini belirlemek amacıyla; bakteri süpernatantları pH 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12 olmak üzere farklı pH'lara ayarlanmıştır. Hazırlanan süpernatantlar 4°C'de 24 sa bekletilmiştir. Süpernatantlar liyofilize edilmiş ve steril saf suda iki farklı konsantrasyonda çözündürülmüştür (1:1, 1:2, g mL^{-1}).disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir ve zon çapları ölçülmüştür (Strompfová vd., 2003).

3.2.11.3 Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi

Bakteri süpernatantının pH'ı nötralize edilmiştir. Nötralize edilen süpernatantın bakteriyosin aktivitesi, sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 40, 60, 80 ve 100°C'de 10 dk ve 30 dk sıcak su banyosunda geçen süreye takiben disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda zon çapları ölçülmüştür (Strompfová vd., 2003).

3.2.12 Çiğ Sütte Uygulanan Analizler

Peynire işlenen sütün kompozisyonel analizleri (kuru madde, yağ, TTA ve kül) yapılmıştır. Sütlerin pH'ı pH metre (Mettler Toledo, Seven Compact pH/Ion S220, İsviçre) ile tespit edilmiş olup asitlik değerleri TS 1018/T1'e göre belirlenmiştir (Kurt vd., 2007).

3.2.12.1 pH Analizi

Sütün pH değeri Mettler Toledo ile belirlenmiştir. Homojenize edilmiş sütlerin pH'ları 25°C'de ölçümleri alınarak sonuçlar kaydedilmiştir.

3.2.12.2 Titrasyon Asitliği Analizi

Çiğ sütte alkali titrasyon metoduyla asitlik tayini yapılmıştır. Bu amaçla süt örneklerinden homojen şekilde erlene 25 mL alınmış (m) ve bir kaç damla fenol fitalein eklenmesinin ardından 0,1 N NaOH aracılığıyla titre edilmiştir. Harcanan miktar (v) formül 3.1'de yerine konulmuş ve laktik asit miktarı hesaplanmıştır (Kurt vd., 2007).

$$\%\text{laktik asit} = [v\ (mL) \times \text{NaOH faktörü} \times 0{,}009/m\ (mL)] \times 100 \qquad (3.1)$$

3.2.12.3 Kuru Madde Tayini

Tartım kapları 105±2ºC'de bekletilmiştir. 30 dk desikatörde bekletilerek darası alındıktan sonra 3-5 mL homojenleştirlmiş süt örneği tartılmıştır. 105±2ºC'de etüvde 3 sa bekletilmiştir. Sonrasında 15-30 dk desikatörde soğutularak tartım yapılmıştır. Örneklerin kuru maddesi formül 3.2 ile hesaplamaları yapılmıştır (AOAC, 2000).

$$\% \text{ KM} = [(M2 - M1)/(M3 - M1)]x\,100 \qquad (3.2)$$

M1=Kurutma kabının ağırlığı (g)

M2=Kurutma kabının ve kurutulmuş örneklerin ağırlığı (g)

M3=Örnek ve kurutma kabının ağırlığı (g)

3.2.12.4 Kül Tayini

Porselen krozeler 105±2ºC'de etüvde bekletilmiş ve ardından 15-30 dk süreyle desikatörde tutularak sabit tartıma getirilmiştir. Daha sonra krozelerin daraları alınarak homojen süt örneğinden 3-5 g hassas terazide tartılmıştır. Krozedeki sütteki fazla suyun uzaklaşması için 105±2ºC'de 1-2 sa bekletilmiştir. Kül fırınında sıcaklık aşamalı olarak yükseltilmiş, beyaz renkli kül oluşana kadar 550ºC'de yakmaya devam edilmiştir. Yakma bittikten sonra 105ºC'lik etüvde örnekler sabit tartıma geldiğinde, %kül miktarı formül 3.3 ile hesaplamaları yapılmıştır (AOAC, 2000).

$$\% \text{ Kül} = [(M3 - M2)/M1] \text{ x } 100 \qquad (3.3)$$

M1: ürün miktarı (g)

M3: yakma işlemi sonrası kroze + kül ağırlığı, g

M2: sabit tartıma gelen krozenin ağırlığı, g

3.2.12.5 Yağ Analizi

Gerber yöntemi ile süt örneklerinin yağ miktarları belirlenmiştir. Gerber santrüfüjü 1100 devir/dk hızda, 70ºC'de, 5 dk santrüfüj sonrası %yağ miktarı belirlenmiştir (Kurt vd., 2007).

3.2.13 Peynire İnoküle Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Hazırlanması

L. plantarum (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) kültürleri bir kez aktifleştirilmiş, daha sonra peynir üretiminde kullanılmak üzere daha yüksek hacimde tekrar aktiflşetirilmiştir. *L. plantarum* MRS sıvı besin ortamına %2 oranında inokülasyon sonrası 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. *Lc. lactis* subsp. *lactis* ise M17 Brotha %2 oranında inoküle edilerek 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. Her iki kültür, inkübasyondan sonra 6000 × g'de 10 dk 24°C'de santrifüjlenerek pellet toplanmış ve elde edilen pellet steril ringer çözeltisi ile iki defa aynı santrifüj koşullarında yıkanmıştır. *Lc. lactis* subsp. *lactis* 8 log kob mL^{-1}, *L. plantarum* 9 log kob mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. Elde edilen pellet ringer çözeltisinde süspanse edilmiş, peynir üretim aşamasında çiğ süte uygulanan ısıl işlemin akabinde sıcaklık yaklaşık 37°C iken kaşar peynire 10^7 kob g^{-1}, beyaz peynir üretiminde 10^8 kob g^{-1} süte inoküle edilmiştir.

3.2.14 Peynire İnoküle Edilen *Cl. sporogenes* Sporlarının Hazırlanması

Cl. sporogenes (ZMP-1-4) Bryant Burkey Broth besi ortamına %1 inoküle edilerek anaerobik koşullarda 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen kültürden spor oluşumu için Cooked Meat Medium besin ortamına inoküle edilmiş, 37°C'de 72 sa inkübe edilmiştir. 8000 × g'de 10 dk santrifüjlenerek pellet toplanmış ve elde edilen pellet steril saf su ile iki defa aynı santrifüj koşullarında yıkanmıştır. Elde edilen pellet ringer çözeltisinde süspanse edilmiş 4°C de muhafaza edilmiştir. Her denemede kullanılan sporlar, peynire inokülasyon öncesinde 80°C'de 10 dk ısıl işlem uygulanmıştır. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları 5 log kob mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. Peynir yapımında 10^4 kob mL^{-1} olacak şekilde peynir üretim aşamasında ısıl işlemin akabinde sıcaklık yaklaşık 35-37°C'ye ulaştığında 10^4 kob g^{-1} inoküle edilmiştir (Carminati vd., 2001).

3.2.15 Kaşar Peyniri Üretimi

Deneysel tasarım ile belirlenen deneme desenine göre Kontrol (K), Laktik Asit Bakterisi, *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli (LAB), *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları - Laktik Asit Bakterisi ilaveli, *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) (CL-LAB), *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları (CL) ilaveli olmak üzere dört farklı kaşar peyniri üretilmiştir.

Çiğ süte 72°C'de, 2 dk ısıl işlem uygulanmıştır. Sütün sıcaklığı 37°C iken *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) koruyucu kültürlerden 10^7 kob g^{-1} inoküle edilmiştir. 35°C'de *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları 10^4 kob g^{-1} ilave edilmiştir. %0,015 $CaCl_2$, pH yaklaşık 6,40 iken peynir mayası ilave edilmiştir. Yaklaşık 90 dk sonra pıhtı pH'ı yaklaşık 6,30 iken pıhtı kesme işlemi gerçekleştirilmiştir. Pıhtı oluşumu sonrası pH 5,90 iken kesim olgunluğuna gelen pıhtı 1 cm^3 ebatlarda kesilmiş ve 10 dk boyunca pıhtının çökmesi beklenilmiştir. Pıhtı kırma işlemi gerçekleştikten sonra teleme toplanmıştır. Yaklaşık 1/3'ü kadar peynir suyu uzaklaştırılarak pıhtı 40°C'de 5 dk ısıtılmış pH'nın 5,40 gelmesi beklenilmiştir. Telemeden suyun uzaklaşması için preslenmiştir. Teleme 24 sa boyunca inkübe edilmiştir. Akabinde teleme rendelenmiştir. %5 tuzlu su ile teleme 60°C de 5 dk haşlanmıştır. Haşlama işlemi sonrasında peynir hamur kitlesinde hava kalmaması için iyice yoğurulmuştur. Kalıplanan peynir hamurları 12-24 sa dinlendirilerek soğumaya bırakılmıştır. Kalıplamanın ardından kalıplar ters çevrilmiştir. Kalıptan çıktıktan sonra yaklaşık 1 gün süre ile bekletilen peynirler 7x7 cm^2 boyutunda kesilerek vakum ambalaj yapılmış ve 4°C ve 25°C'de depolanmıştır. Üretimi gerçekleştirilen kaşar peynirlerinin 0., 10., 20., 30. ve 40. günlerinde mikrobiyolojik ve kimyasal analizler yapılmıştır. Kaşar peyniri üretimi akış şeması Şekil 3.2'de, kaşar peyniri üretim aşamasındaki görseller Şekil 3.3'de verilmiştir.

Çiğ süt

↓

Pastörizasyon (72±2°C'de, 2 dk)

↓

Soğutma (37°C)

↓

Koruyucu starter kültür *L. plantarum* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (10^7 kob g^{-1}) ve kalsiyum klorür ilavesi (10-15 g/100 L süt), *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarının ilavesi (10^4 kob g^{-1})

↓

Peynir Mayası ilavesi (Chy-Max, Chr. Hansen)

↓

Pıhtının kesimi (1 cm^3) ve pıhtının dinlendirilmesi (10 dk)

↓

Pıhtının ısıtılması (40°C)

↓

Peynir suyunun 1/3'ünün uzaklaştırılması

↓

Ön fermentasyon (pH 5,40–5,45'e kadar)

↓

Pıhtının süzülmesi

↓

Fermentasyon

↓

Telemenin parçalara bölünmesi (0,5cm-5cm)

↓

Teleme haşlama (60°C'de 5 dk)

↓

Kalıplama

↓

Olgunlaştırma (25±2°C'de 12–24 sa)

↓

Vakum ambalaj

Şekil 3.2 Kaşar peyniri üretimi.

Deneme üretimlerinde yukarıda verilen akım şeması izlenmiş, sadece kullanılan koruyucu kültür *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ve *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları inoküle edilerek üretim gerçekleştirilmiştir. Üretimdeki farklılıklar aşağıda belirtilmiştir.

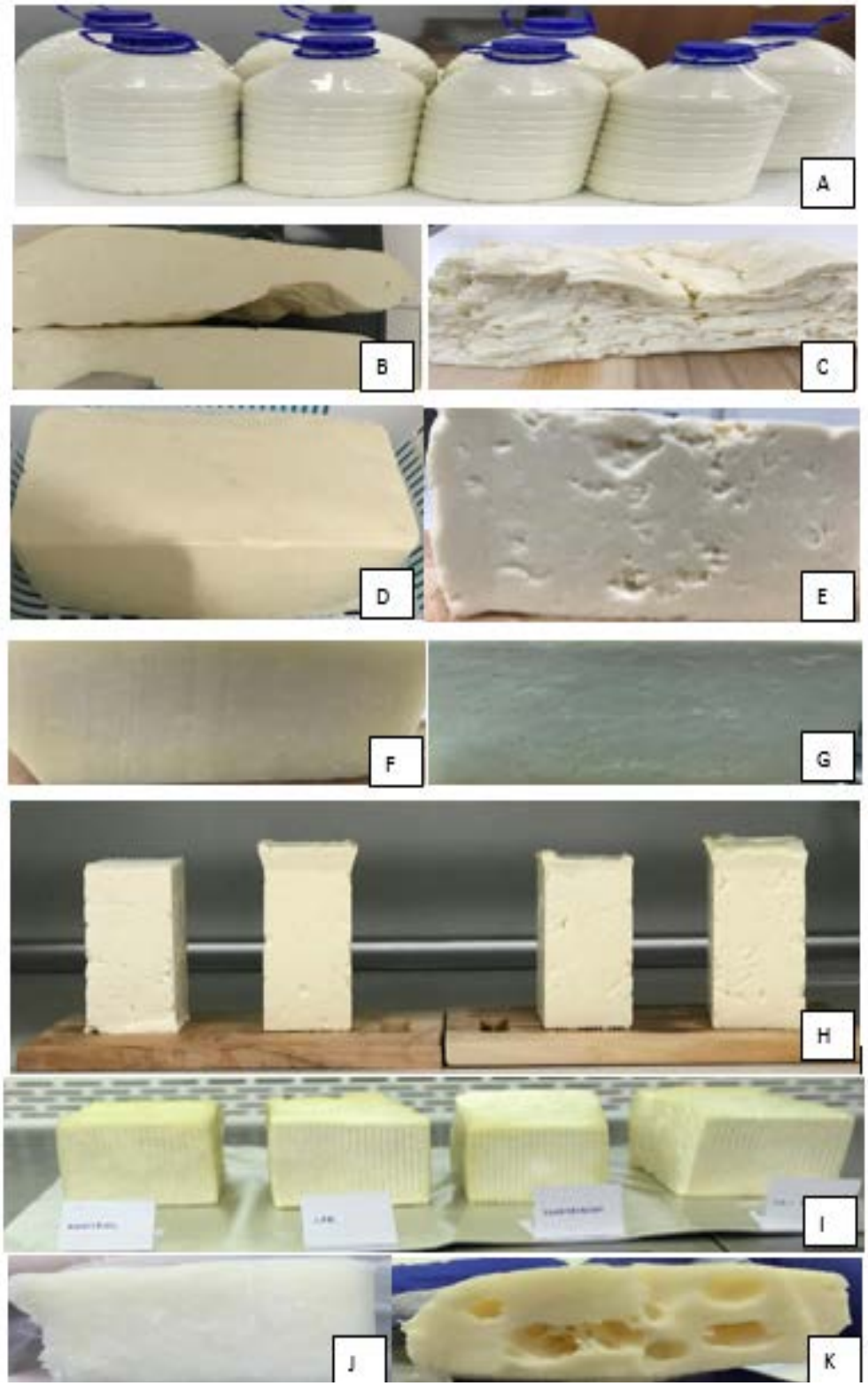
K: Kontrol (starter/koruyucu kültürsüz)

LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli

CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli

CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

Clostridium'ların toksin üretimi ve gelişimi 25°C'de depolama yapıldığı zaman en uygun düzeydedir (Ter Steeg ve Cuppers, 1995). Bu yüzden üretilen peynirler 4°C ve 25°C'de depolanmıştır.



Şekil 3.3 Kaşar peyniri ile ilgili görseller çiğ süt (A), kontrol grubu (B), LAB ilaveli (D, F, J), *Cl.*- LAB ilaveli (E, G, H), CL ilaveli (C, K).

Üretimin akabinde peynir örnekleri vakum ambalajlanarak 4 ve 25°C'de depolanmıştır. Aksi belirtilmedikçe, tüm analizler iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.16 Beyaz Peynir Üretimi

Deneysel tasarım ile belirlenen deneme desenine göre Kontrol (K), Laktik Asit Bakterisi (LAB) *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları - Laktik Asit Bakterisi *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli (CL-LAB) ilaveli*, Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları (CL) ilaveli olmak üzere dört farklı beyaz peynir üretilmiştir.

Çiğ süte 65°C'de, 30 dk ısıl işlem uygulanmıştır. Sütün sıcaklığı 32°C'ye ulaştığında *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) koruyucu kültürlerden 10^8 kob g^{-1} inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. 35°C'de *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları 10^4 kob g^{-1} ilave edilmiştir. %0,02 $CaCl_2$, pH yaklaşık 6,40 iken peynir mayası ilave edilmiştir. Yaklaşık 90 dk sonra pıhtı pH'ı yaklaşık 6,30 iken pıhtı kesme işlemi gerçekleştirilmiştir. Pıhtı oluşumu sonrası pH 5,90 iken kesim olgunluğuna gelen pıhtı 1 cm^3 ebatlarda kesilerek ve 30 dk boyunca pıhtının çökmesi beklenilmiştir. Pıhtı kırma işlemi gerçekleştikten sonra pıhtı toplanmış ve preslenmiştir. 25°C'de %16 NaCl tuzlu su çözeltisinde (12 sa) bekletilmiştir. Peynirler 7x7 cm^2 boyutunda kesilerek vakum ambalaj yapılmış ve 4°C'de depolanmıştır. Üretimi gerçekleştirilen beyaz peynirlerin 0., 30., 60. ve 90. günleri takiben mikrobiyolojik ve kimyasal analizleri yapılmıştır. Beyaz peynir üretim akış şeması Şekil 3.4'te, beyaz peynir üretim aşamasındaki görseller Şekil 3.5'de verilmiştir.

Çiğ süt

↓

Pastörizasyon (65±2°C, 30 dk)

↓

Soğutma (32°C)

↓

Koruyucu starter kültür *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilavesi (10^8 kob g^{-1}) ve kalsiyum klorür ilavesi (%0,2), *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarının ilavesi (10^4 kob g^{-1})

↓

Peynir mayası ilavesi (Chy-Max, Chr. Hansen)

↓

Pıhtı oluşumu (90 dk)

↓

Pıhtı kesimi (1 cm^3x 1 cm^3) ve dinlendirilmesi (30 dk)

↓

Pıhtının preslenmesi (4 sa)

↓

Tuzlu su çözeltisi (12 sa)

↓

Peynirin bloklar halinde bölünmesi

↓

Vakum ambalaj yapılması

↓

4°C'de muhafaza edilmesi

Şekil 3.4 Beyaz peynir üretimi.



Şekil 3.5 Beyaz peynir ile ilgili görseller.

Not: (Kontrol grubu, LAB *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4). Sporları - Laktik Asit Bakterisi *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli)

3.2.17 Peynire Uygulanan Mikrobiyolojik Analizler

Kaşar ve beyaz peynir örnekleri 10 g tartılmış, 90 mL %2'lik sodyum sitrat çözeltisiyle stomacherde homojen hale getirilmiştir ve 1/10'luk seri dilüsyonlarda seyreltme işlemi yapılmıştır. 9 mL ringer bulunan tüpe, homojen örneklerden 1 mL alınmış ve seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Mikroorganizmanın sayımı (Toplam Mezofil Aerob Bakteri, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, anaerob sporlu bakteri, maya ve küf) için belirlenen dilüsyonlardan uygun besiyerlerine yayma ekim yapılmıştır (Harrigan, 1998).

3.2.17.1 Laktobasil Sayımı

Laktobasillerin sayımı ISO 15214:1998'e göre belirlenmiştir. Laktobasil sayımı de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar) ile yapılmıştır. Belirlenen dilüsyonlardan paralelli olarak ekimleri yapılmıştır. Petriler 37°C'de 48-72 sa inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonrası koloniler hesaplanarak log kob g^{-1} cinsinden sonuçlar verilmiştir (ISO, 1998).

3.2.17.2 Laktokok Sayımı

Laktokok sayımı M17 Agar kullanılarak yapılmıştır. Belirlenen dilüsyonlardan paralelli olarak ekimleri yapılmıştır. Petriler 37°C'de 48-72 sa inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrası koloniler hesaplanarak log kob g^{-1} cinsinden sonuçlar verilmiştir (Speck, 1984).

3.2.17.3 Anaerobik Sporların Sayımı

Anaerobik sporların sayımında Reinforced Clostridial Medium Agar (RCM) kullanılmıştır. Belirlenen dilüsyonlardan paralelli olarak ekimleri yapılmıştır ve petriler 37°C'de 72 sa inkübe edilmiş, *Clostridium* sporlarının sayımları gerçekleştirilmiştir. Spor sayısı log kob g^{-1} olarak verilmiştir (Carminati vd., 2001).

3.2.17.4 Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayımı

Toplam aerobik ve/veya fakültatif anaerobik mezofilik sayısı mikroorganizmalar 4833-1 (2013)'e göre belirlenmiştir. Plate Count Skim Milk Agar (PCSA) besiyerine paralelli ekimler yapılmış ve petriler 30°C'de 48 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben tüm koloniler "toplam bakteri" olarak sayılarak,

toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı log kob g^{-1} cinsinden verilmiştir (ISO, 2013).

3.2.17.5 Küf ve Maya Sayımı

Maya ve/veya küf sayısı ISO 6611:2004'e göre belirlemiştir. Potato Dextrose Agar (PDA) hazırlanması aşamasında otoklav sonrası %10'luk tartarik asit ilave edilmiştir. PDA besiyerine paralelli ekimler yapılmıştır ve petriler 25°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben maya ve küf sayısı log kob g^{-1} cinsinden verilmiştir (ISO, 2004).

3.2.18 Peynire Uygulanan Fizikokimyasal Analizler

3.2.18.1 pH Tayini

Peynir örneklerinden 10 g tartılmış, 20 mL saf suyla homojenize edilmiş ve pH metre (Mettler Toledo Seven Compact S220) kullanılarak paralelli ölçümler alınmıştır (Savello vd., 1989).

3.2.18.2 Titre Edilebilir Asitliğin Belirlenmesi

Peynir örneklerinden 10 g tartılmış, 40°C'deki 105 mL saf su yavaş yavaş eklenmiş peynir havanda ezilmiştir. Filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Süzüntüden erlene 25 mL alınmıştır. %1'lik fenolftalein indikatöründen 2-3 damla eklenmiş ve 0,1 N NaOH ile titre edilmiştir. Titre edilebilir asitlik derecesi peynir örneklerinin %laktik asit olarak formülden hesaplanmıştır (Kurt vd., 2007).

$$\%\text{Laktik asit} = (\text{Vx } 0{,}009 \text{ x}100)/\text{m} \qquad (3.4)$$

V: Titrasyonda harcanan 0,1 N NaOH çözeltisi (mL)

m: Peynir (g)

3.2.18.3 Su Aktivitesinin Belirlenmesi

Peynirlerin su aktivitesi (a_w) depolama boyunca su aktivitesi tayin cihazı (Novasina, Labtouch-a_w, İsviçre) ile tayin edilmiştir (Havlíková vd., 2018).

3.2.18.4 Redox Potansiyelinin Belirlenmesi

Peynirlerin E_h değerleri, Hanna 2211 pH/orp meter cihazı ile pH metreye bağlanan bir platin redoks elektrot ile belirlenmiştir. Elektrot, 20°C sıcaklıkta

+250±5 mV potansiyelde 3 Molar KCL çözeltisi ile kalibre edilmiştir. Cihazın iki elektrotu peynir matrisinin içinde bırakılmış, redoks potansiyeli sabitlendikten sonra ölçüm yapılmıştır (Topçu vd, 2008). E_h, peynir numunelerinde elektrotu tamamen kapatacak şekilde ölçüm alınmıştır cihazın gösterdiği değer (mV) kaydedilmiştir (Carminati vd., 2001).

3.2.18.5 Kuru Madde Tayini

Peynir örneklerinden 3-5 g tartılarak, 3.2.11.3 başlığında yapıldığı gibi analiz gerçekleştirilmiştir (Kurt vd., 2007).

3.2.18.6 Renk Ölçümü

Peynir örneklerinin renk ölçümleri için CR-400 kolorimetre (Konica Minolta Inc., Japan) kullanılmıştır. Sonuçlar L*, a* ve b* olarak belirtilmiştir. L* değeri koyuluk/parlaklık (100-beyaz), a*; kırmızı (+a) /yeşile (–a), b* ise sarı (+b) /mavi (–b) olarak verilmiştir (Gómez-Torres vd., 2014).

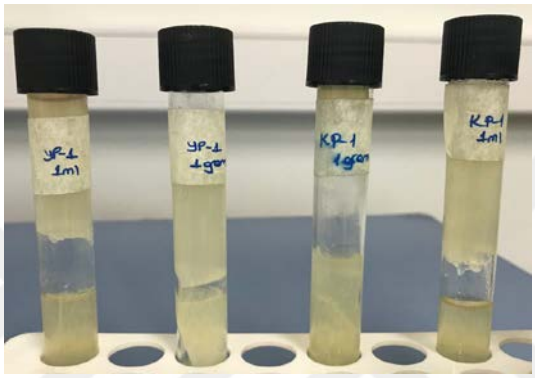
3.2.19 İstatistiksel Analiz

Bütün analizler en az iki paralel şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin analizi ve değerlendirilmesi yapılmak üzere JMP6 yazılım programı kullanılmıştır. Verilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları tablo ve grafik şeklinde verilmiştir. Farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Student's t testi kullanarak belirlenmiştir ($p<0,05$).

4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 *Clostridium* spp. Varlığı

Toplanan 18 peynir ve 3 yem örneğinden gaz çıkışı 15 örnekte gözlemlenmiştir. Şekil 4.1'de gaz oluşumu gözlemlenen muhtemel *Clostridium* içerdiği kabul edilen örneklere ait görüntü, Şekil 4.2'de gaz oluşumu gözlemlenmeyen *Clostridium* içermediği kabul edilen örneklere ait görüntüye yer verilmiştir.



Şekil 4.1 Gaz oluşumu gözlemlenen muhtemel *Clostridium* içerdiği kabul edilen örnekler.



Şekil 4.2 Gaz oluşumu gözlemlenmeyen *Clostridium* içermediği kabul edilen örnekler.

4.2 Peynir ve Yem Örneklerinden *Clostridium* İzolasyonu

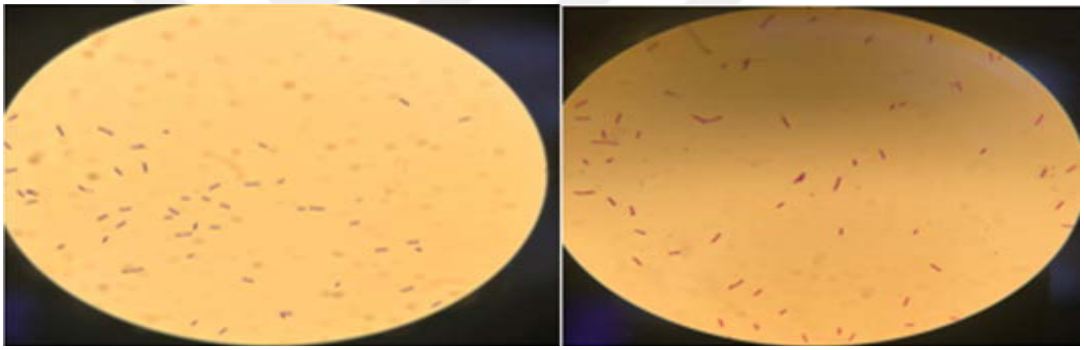
Bölüm 4.1'de yapılan analiz sonucu gaz çıkışı olduğu gözlemlenen peynir ve yem örnekleri CNM, NA, WCA, TSA, BHI ve Bryant Burkey with Resazurin and Lactate Agar besiyerlerine ekim yapılarak farklı olabileceği ön görülen toplam 350 koloni

izolatı elde edilmiştir. RCM Agar besiyerinde vejetatif *Clostridium* izolasyonu gerçekleştirilememiş olup RCM Agarda *Clostridium* sporlarının sayımı yapılmıştır.

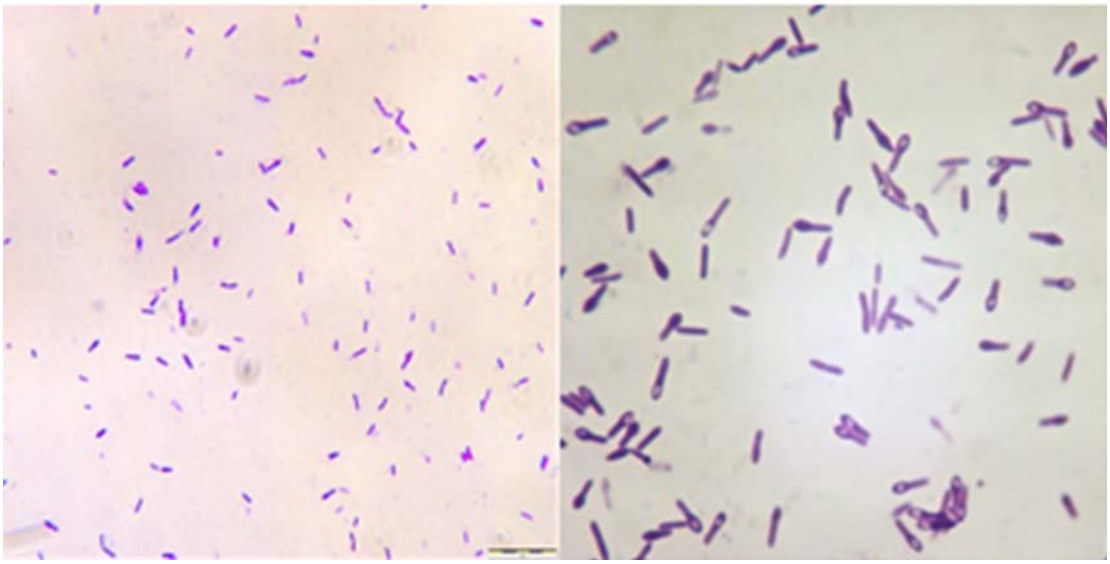
4.3 İzolatlarının Tanımlanması

4.3.1 Bakterilerin Fenotipik Tanımlanması

Biyokimyasal ve morfolojik analizler değerlendirildiğinde Gram pozitif ve katalaz negatif suşlara genotipik karakterizasyon testleri uygulanmıştır. Şekil 4.3'de Gram pozitif ve Gram negatif suşlara ait görüntü, Şekil 4.4 muhtemel *Clostridium*'ların spor keselerinin görüntüsü, Şekil 4.5 katalaz pozitif, katalaz negatif bakterilerin katalaz testinin görüntüsü, Şekil 4.6'da muhtemel *Clostridium*'ların spor boyama görüntüsü yer almaktadır. Bu izolatlar arasından 83 tanesinin Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturduğu tespit edilerek 53 tanesinin muhtemel *Clostridium* olduğu düşünülmektedir.



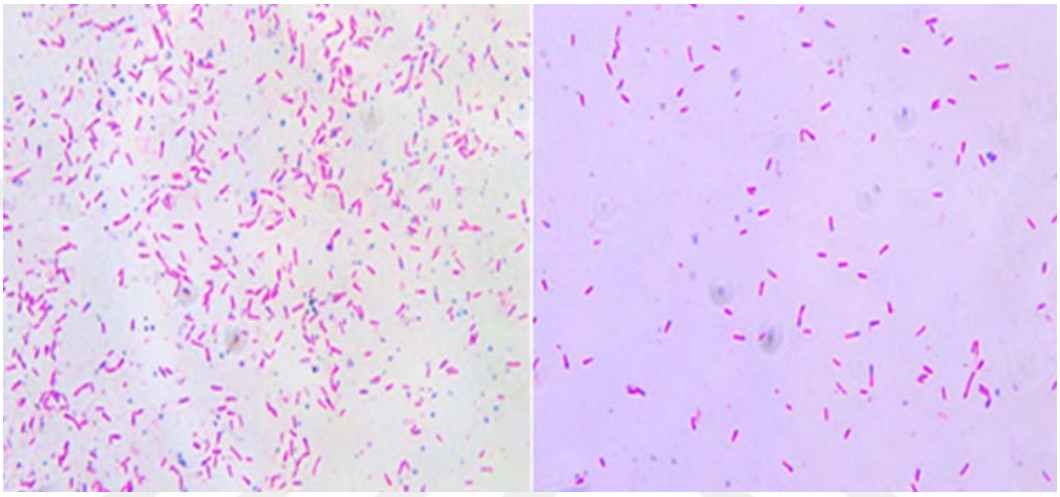
Şekil 4.3 İzole edilen bakterilerin Gram boyama görüntüsü.



Şekil 4.4 Muhtemel *Clostridium*'ların spor keselerinin görüntüsü.



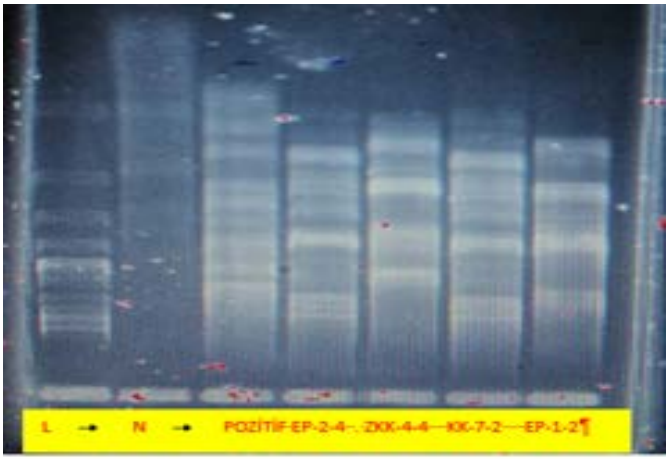
Şekil 4.5 Katalaz pozitif ve katalaz negatif bakterilerinin katalaz testinin görüntüsü.



Şekil 4.6 Muhtemel *Clostridium*'ların spor boyama görüntüsü.

4.3.2 RAPD PCR Analizi ile Genotipik Karakterizasyon

Clostridium türlerine ait GTG5 profili Şekil 4.7'de verilmiştir. Birbirinden farklı olduğu tespit edilen *Clostridium* türleri sekanslama analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.7 *Clostridium* türlerinin GTG5 profili.

4.3.3 *Clostridium* Türlerinin 16S rRNA Gen Sekansı Sonuçları

Farklı fenotipik özelliklere sahip en iyi gaz üreticisi 15 suş, sekanslama işlemi için MEDSANTEK firmasına gönderilmiş 16S rRNA gen dizileme analizi ile identifiye edilmişitir. Şekil 4.8'de 16S geninin PCR amplifikasyonu sonucundaki jel görüntüsüne aittir. Bulgularımız peynir örneklerinde sunulan muhtemel *Clostridium* türlerinin *Cl. sporogenes* ve *Cl. tepidium* suşlarına ait olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.8 16S geninin amplifikasyonuna ait agaroz jel (%1) görüntüsü.

Sekans sonuçları https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi sayfasından BLAST veribankasında olan türler ile kıyaslanarak ilgili izolatların tanımlanma işlemi tamamlanmıştır. Tablo 4.1'de sekanslanan bakterilerin blast sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.1 Sekanslanan bakterilerin BLAST sonuçları.

İzolatlar	İzolasyon kaynağı	16S rRNA sonucu	Erişim numarası
EK-1-10	Kaşar peyniri	*Cl. sporogenes* strain DSM 795	NR_118630.1
EK-1-13	Kaşar peyniri	*Cl. sporogenes* strain DSM 795	NR_118630.1
EP-2-4	Ezine peyniri	*Cl. sporogenes* strain DSM 795	NR_118630.1
KK-7-2	Kars kaşar peyniri	*Cl. botulinum* strain ELTDK 103	NR_036786.1

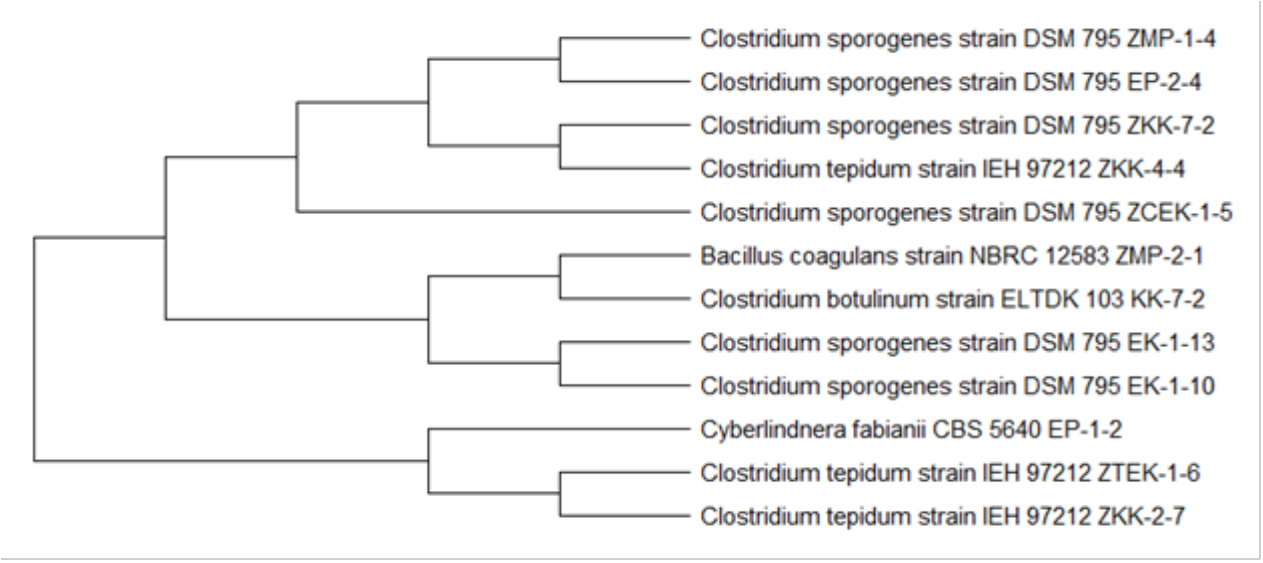
Tablo 4.1 Sekanslanan bakterilerin BLAST sonuçları (devamı).

ZÇEK-1-5	Eski kaşar peyniri	*Cl. sporogenes* strain DSM 795	NR_118630.1
ZKK-2-7	Kars kaşar peyniri	*Cl. tepidium* strain IEH 97212	NR_157639.1
ZKK-4-4	Kars kaşar peyniri	*Cl. tepidium* strain IEH 97212	NR_157639.1
ZTEK-1-6	Trakya eski kaşar peyniri	*Cl. tepidium* strain IEH 97212	NR_157639.1
ZMP-2-1	Mihaliç peyniri	*Bacillus coagulans* strain NBRC 12583	NR_041523.1
ZMP-1-4	Mihaliç peyniri	*Cl. sporogenes* strain DSM 795	NR_118630.1
ZKK-7-2	Kars kaşar peyniri	*Cl. sporogenes* strain DSM 795	NR_118630.1

Peynir örneklerinde *Cl. tyrobutyricum*'un hakim olduğu yönünde çalışmalar mevcut iken (Bassi vd., 2015; Morandi vd., 2021), önceki çalışmalardan farklı olarak, kaşar peyniri örneklerinde *Cl. sporogenes* baskın *Clostridium* türleri arasında iken, takiben *Cl. tepidium* suşları izlemiştir. Geç şişmiş sert peynirlerde yapılan bir çalışmada da *Bacillus coagulans* izole edilmesi peynir mikrobiyotasında *B. coagulans*'ın var olabileceğini doğrulamıştır (Bassi vd., 2015).

4.3.4 İzole Edilen Bakterilerin Filogenetik İlişkisi

Şekil 4.9, izole edilmiş *Clostridium* türleri ve diğer türlerin dendrogram analizini göstermektedir, filogenetik analiz Mega-X programı ile belirlenmiştir. Beklendiği gibi *Cl. sporogenes* ve *Cl. tepidum* suşları tarafından grup oluşturulmuştur. *Cl. tepidum* yakın zamanda tanımlanmıştır, literatürde peynirle ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. *Cl. sporogenes* ile akrabadır, ancak bozulma mikroorganizması olarak peynir üzerindeki etkilerini anlamak için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

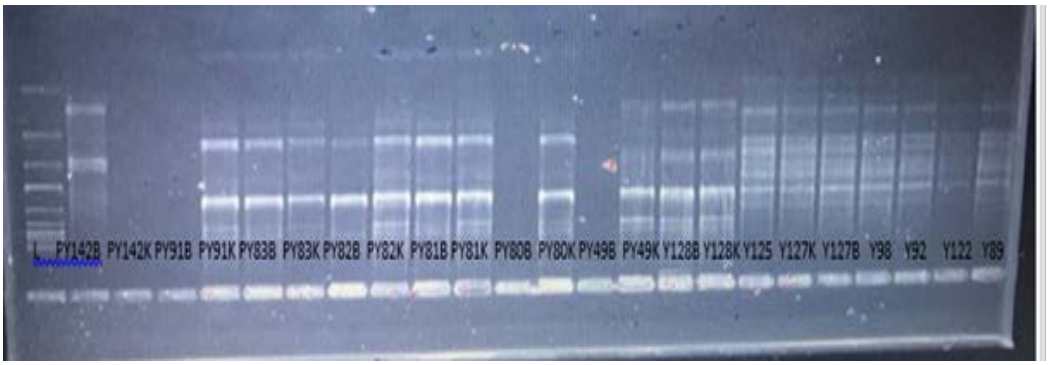


Şekil 4.9 Peynir izolatlarının 16S rRNA sekanslarına ait filogenetik Neighbour-Joining metoduyla elde edilen dendogram.

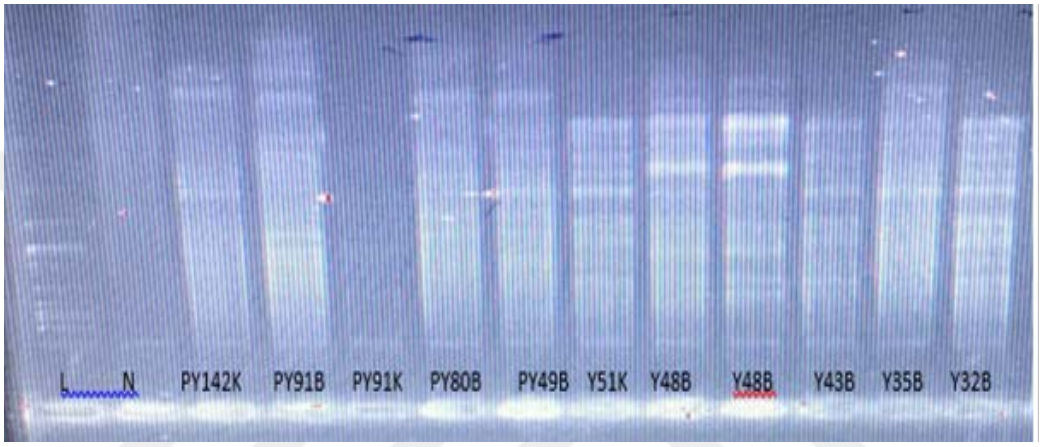
Kaşar peynirindeki gözlemimize benzer olarak, daha önce Manchego peynirlerinde *Cl. sporogenes*'in baskın olduğu rapor edilmiş ve bu, çiğ süt ve süt ürünlerinde *Cl. sporogenes*'in potansiyel olarak varlığının veya *Clostridium*'un olduğu gerçeğinin bir sonucu olarak ileri sürülmüştür. *Cl. sporogenes* lizozime dirençli olabileceğinden (Garde vd., 2011) kaşar peynir örneklerinde *Cl. sporogenes*'in varlığının baskın olmasının nedeni olarak açıklanmaktadır.

4.3.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları

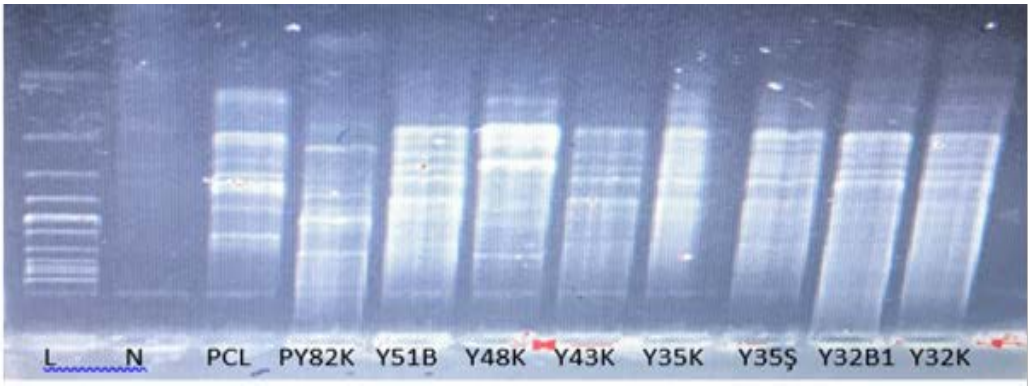
LAB türlerinin genotipik olarak tanımlanmasında RAPD-PCR analizi kullanılmıştır. Genomik ayrım gerçekleştirebilmek için GTG5 primerleri ile reaksiyon hazırlanmış ve PCR ürünleri %1 agaroz jel, 90V'da 1,5 sa yürütülmüştür. Jelden genotipik profili aynı ve farklı olanlar tespit edilmiştir. *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *St. thermophilus, Lc. lactis subsp. lactis* arasından benzer olanlar belirlenerek gruplandırma yapılmıştır. Şekil 4.10, 4.11, 4.12'de LAB'nin GTG5 profilini ait agaroz jel (%1) görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.10 LAB'nin GTG5 profilini gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.



Şekil 4.11 LAB'nin GTG5 profilini gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.



Şekil 4.12 LAB'nin GTG5 profilini gösteren agaroz jel (%1) görüntüsü.

4.4 En Muhtemel Sayı Yöntemi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bakterilerin EMS mL^{-1} cinsinden C bölümünde verilen tabloya göre hesaplanması sonucunda canlılık ile ilgili veriler Tablo 4.2'de verilmiştir. Genellikle süt ürünlerine uygulanan EMS yöntemi ile *Clostridium* varlığı 0,36 ile 3,00 EMS g^{-1} aralığında olması gerektiği daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Garde vd.,

2012; Burtscher vd., 2020). Yapılan ön deneme sonuçları ile peynir üretiminde *Cl. sporogenes* ZMP-1-4'ün kullanılması karar verilmiştir.

Tablo 4.2 *Cl. sporogenes'lerin* EMS mL^{-1} cinsinden sonuçları.

Cl. sporogenes	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	adet mL^{-1}
EK-1-10	3	2	3	29,00
EK-1-13	1	2	0	1,10
ZÇEK-1-5	1	1	0	0,74
ZMP-1-4	1	1	0	0,74
ZKK-7-2	1	0	0	0,36

4.5 LAB Şuşlarının Antiklostridial Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Antiklostridial aktivitesi olan koruyucu kültür kullanılması, *Clostridium* türlerini inhibe edilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle *Cl. tyrobutyricum* (pozitif kontrol), *Cl. sporogenes* (ZÇEK-1-5, ZMP-1-4, ZKK-4-4), *Cl. tepidium* (ZKK-2-7) üzerindeki inhibisyon etkileri belirlenmiştir. LAB izolatları *L. plantarum* (Y48), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY80B, PY91B, PY91K, PY82K, PY83K) bakterilerinin süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiş ve ölçülen inhbisyon zon çapları Tablo 4.3'te verilmiştir.

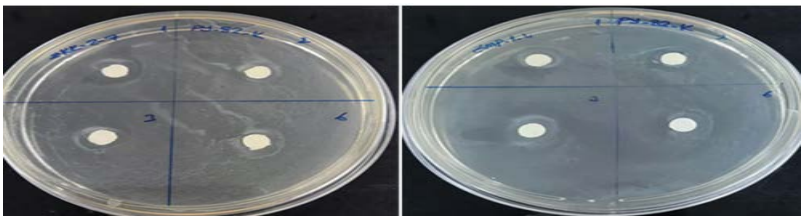
LAB suşlarının antiklostridial aktivitesini belirleyen ana faktör türe özgü olmasıdır (Christiansen vd., 2005) ve LAB'nin inhibisyon etkisi *Clostridium* kültürlerine karşı farklı olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.13'de *Cl. sporogenes*'e ve *Cl. tepidium*'a karşı antiklostridial etkileri gösteren petrilere ait görseller verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; türlerin inhibisyon etkisi *Clostridium* kültürlerine karşı farklı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY80B dışındaki tüm suşlar antiklostridial aktivite göstermiştir ve *Cl. sporogenes*'lere karşı en yüksek inhibisyon etkisi gösteren zon çapı 8±1,73 mm olan *L. plantarum* (Y48)

ve zon çapı 9±1,90 mm olan *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), peynir üretiminde koruyucu starter olarak seçilmiştir. Tez kapsamında peynirde *Clostridium* spp. türlerini, inhibe etmek için seçilen *L. plantarum* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* benzer şekilde önceki çalışmalarda da hem *L. plantarum* hem de *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarının potansiyel olarak bu suşların bakteriyosin üretiminden kaynaklanan antiklostridial aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Rilla vd., 2003; González ve Zárate, 2015; Ávila vd., 2020).

Tablo 4.3 Antiklostridial aktivite gösteren LAB'nin oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm).

	L. plantarum Y48	*Lc. lactis* PY80B	*Lc. lactis* PY91B	*Lc. Lactis* PY91K	*Lc. lactis* PY82K	*Lc. lactis* PY83K
Cl. sporogenes ZÇEK1-5	-	-	-	9±0	-	-
Cl. sporogenes ZMP-1-4	8±1,73			9±1,90	9±0,5	
Cl. tepidium ZKK-4-4		-	-	-		9±0,57
Cl. tepidium ZKK-2-7	7±1,15			7±0	10±1,25	7±0,50
Cl. tyrobuytricum Pozitif kontrol	7±0	-	7±0	-	-	

Not: —, Zon yok. Veriler üç farklı ölçüm alınarak ortalamasının ± standart sapmasıdır.



Şekil 4.13 LAB'nin *Cl. sporogenes*'e karşı antiklostridial etkileri.

4.6 LAB Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Peynir yapımında koruyucu kültür olarak kullanılacak mikroorganizmaların patojen mikroorganizmaları inhibe edebilmesi en önemli özelliklerdendir. Bağırsak patojeni olarak bilinen *E. coli* BC 1402 (P12), *B. cereus* BC 6830 (P60), *S.* Typhimurium RSSK 95091 (P78), ve *S. aureus* ATCC 25923 (P94)'e karşı *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K)'nin inhibisyonları incelenmiştir. Araştırmada, bakterilerin birbirlerine olan etkisi agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiş ve inhbisyon zon çapları Tablo 4.4'te verilmiştir. Denemelerde kullanılan indikatör mikroorganzimalara karşı 15±0,5 ile 20±0,5 mm arasında değişen çaplarda antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda LAB'nin antimikrobiyel aktivitesi incelenmiştir (Fernández vd., 2018; Zhang vd., 2018). İnhibisyon etkisi olup zon oluşumu gözlenen LAB'nin antimikrobiyel etkinin sebebi; organik asit, H_2O_2 veya protein tabiatındaki antimikrobiyel maddelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Flórez ve Mayo, 2018). *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K)'de olduğu belirlenmiş ve peynir yapımında bu kültürler seçilmiştir.

Tablo 4.4 LAB'nin patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi sonucunda oluşan inhibisyon zon çapları (mm).

İnidikatör mikroorganizmalar	*L. plantarum* Y48	*Lc. Lactis* PY91K
E. coli BC 1402 (P12)	17±0,5	15±0,5
B. cereus BC 6830 (P60)	18±0,5	19±0,5
S. Typhimurium RSSK 95091 (P78)	15±0,5	15±0,5
S. aureus ATCC 25923 (P94)	20±0,5	16±0,5

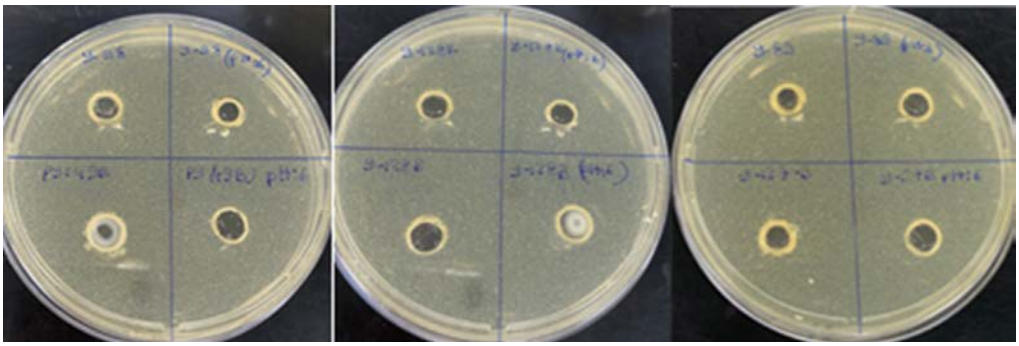
Not: Veriler üç ölçümün ortalaması ± standart sapmadır.

4.7 LAB Suşlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bakteriyosin üreticisi olan suşların tespit edilmesinde indikatör bakterilere karşı zon oluşturan suşların belirlenmesi ilk aşamadır. Bakteriyosin üreticisi suşların tespit edilmesinde inhibisyon zonu belirlenmesi esasına daynamaktadır. Disk veya kuyu çevresinde berrak ve keskin inhibisyon zonu tespit edilmesi bakterinin muhtemel bakteriyosin üreticisi olarak değerlendirilmektedir (Deegan vd., 2006). Araştırmada, *M. luteus* DSM1790'a karşı Tablo 3.3'de verilen LAB'nin antagonistik etkileri incelenmiştir. Bakterilerin birbirlerine olan etkisi öncelikle agar kuyucuk metodu denenmiş ancak zonların belirginliği az olduğu için disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında 37 adet LAB'nin bakteriyosin üreticisi olup olmadığı ve aktivite kontrollerinin belirlenmesi sonucu indikatör bakteriye karşı aktivite gösterdiği tespit edilen 15 LAB'nin muhtemel bakteriyosin üreticisi olabileceği düşünülmüştür. Bakteriyosinin geniş inhibitör spektrumu, gıda veya ilgili endüstrilerde biyokoruyucu olarak potansiyel bir uygulamaya sahip olabileceği nedeniyle çalışmalar önem arzetmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda farklı izolasyon kaynaklarıLAB'nin bakteriyosin üreticisi olarak tanımlanmıştır (Alvarez-Sieiro vd., 2016; Vieco-Saiz vd., 2019).

4.7.1 LAB İzolatlarının Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerinin Agar Kuyucuk Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Agar kuyucuk yöntemiyle zon oluşumu gözlemlenemediği için disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Demir ve Basbülbül (2017) ve Alegría vd., (2010) yapmış olduğu çalışmada benzer şekilde agar kuyucuk yöntemi ile inhibisyon gözlemleyememiş ve disk difüzyon yöntemini kullanmıştır. Agar kuyucuk yöntemi ile ilgili görseller Şekil 4.14'tedir.



Şekil 4.14 LAB izolatlarının bakteriyosin ve benzeri maddelerinin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmesi ile ilgili görseller.

4.7.2 LAB İzolatlarının Bakteriyosin ve Benzeri Maddelerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Araştırmada; Tablo 3.3'de verilen LAB'nin *M. luteus* DSM1790'a karşı bakteriyosin aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve test sonucunda oluşan inhibisyon zon çapları Tablo 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Şekil 4.15'de LAB izolatlarının bakteriyosin ve benzeri maddelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller verilmiştir. Zon oluşumu gözlemlenemeyen bakterileri için etki yok (-) olarak belirtilmiştir. Zon çapları ölçülenler ise mm cinsinden tabloda verilmiştir. Katalaz ile muamae edilen süpernatanların ve direkt bakteri süpernatanların aktivitesi arasında fark olduğu belirlenmiştir. İşlem uygulanmış tamponlanmış süpernatantların 15 tanesinde inhibisyon etki gözlemlenmiştir. Etki gözlenen bakteriler; *L. plantarum*; (Y32K, Y43B, Y43K, Y48B, Y48, Y51B, Y51K), *Leu. mesenteroides*; (Y35K, Y54K) *St. thermophilus*; (Y127K), *Lc. lactis*; (PY81K, PY82B, PY83K, PY91B, PY91K)'dır. İşlem uygulanmamış süpernatantların düşük pH, organik asit ve H_2O_2 üretiminden dolayı antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir. LAB'nin ürettiği laktik asit sayesinde pH düşüşü gözlemlenmektedir. Spor oluşturan bakterilere karşı pH 5'de iyi bir inhibitör olmasına ilaveten maya ve küflere karşı pH 5'de etkisinin olmadığı bilinmektedir (Çon ve Gökalp, 2000). H_2O_2 hücreler üzerinde güçlü oksitleyici özelliğe sahip olması açısından etkili bir antimikrobiyaldir. Hücre proteinleri ve membran lipitleri sülfidril grupları okside edebilirler. H_2O_2 üretiminden kaynaklı bazı LAB'nin antimikrobiyal özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir. Birçok laktobasil ve streptokok türü aerobik koşullarda H_2O_2 dikkate değer miktarlarda oluşmaktadır

(Evren vd., 2006). Ren vd., (2018) yapmış olduğu çalışma ile *L. plantarum*, *L. paraplantarum* ve *L. carnosus* suşlarının antimikrobiyel etkilerinin bakteriyosin ve benzeri maddelerden kaynaklanmadığını, asitlik ve hidrojenperoksit kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu tezde 23 bakteride direkt uygulama sonucunda etki tespit etmemiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

M. luteus DSM1790 inhibitör maddelere karşı çok hassas olduğu bilinmektedir. Bakteriyosin aktivite spektrumu belirlenmiş ve çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *M. luteus* DSM1790 üzerinde inhibisyon aktivitesine sahip 15 adet bakterinin muhtemel bakteriyosin üreticisi olduğu ön görülerek tez çalışmasında 15 adet LAB çalışma materyali olarak seçilmiş ve çalışmalara devam edilmiştir. İnhibison etkisi olan bakterilerin bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddelerin ön karakterizasyonu için testler yapılmıştır.

Tablo 4.5 *L. plantarum*'un oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm).

		Süpernatant seyreltme oranı (g mL^{-1})			
L. plantarum	**Uygulama şekli**	**1:1**	**1:2**	**1:4**	**1:6**
Y32B	D	21	16	-	-
Y32B	pH-6	-	-	-	-
Y32K	D	20	16	-	-
Y32K	pH-6	12	11	-	-
Y32B1	D	-	-	-	-
Y32B1	pH-6	-	-	-	-

Tablo 4.5 *L. plantarum*'un oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm) (devamı).

Y43B	D	20	-	-	-
Y43B	pH-6	16	15	14	-
Y43K	D	25	20	-	-
Y43K	pH-6	24	19	17	16
Y48B	D	20	16	-	-
Y48B	pH-6	15	-	-	-
Y48	D	27	21	-	-
Y48	pH-6	25	20	-	-
Y51B	D	20	-	-	-
Y51B	pH-6	15	-	-	-
Y51K	D	20	-	-	-
Y51K	pH-6	20	-	-	-

Not: —, Zon yok, D: Direkt bakteri süpernatantı.

Yapılan birçok çalışmada *L. plantarum* kaynaklı bakteriyosinin *Clostridium* spp., *E. fecalis*, *E. coli* ve *S. aureus* dahil olmak üzere patojenik bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Fricourt vd., 1994; Hernandez vd., 2005). İnhibisyon etkisi en yüksek olan Y48 ve Y43K'dır. Plantarisin A, plantarisin B, plantarisin C gibi *L. plantarum* tarafından üretilen çeşitli bakteriyosinlerin olduğu bilinmektedir

(Gülgör ve Özçelik, 2014). Asidofilin ve laktosidin üreten *L. acidophilus*, laktolin üreten *L. plantarum*, nisin üreten *Lc.* lactis'in yanı sıra laktobasillerin ürettikleri plantarisin A, plantarisin B, laktosin 27, laktasin B ve helvetisin J vb. bakteriyosinler *Cl. perfringens, Bacillus cereus, Listeria* spp. *Staphylococcus aureus,* vb. çoğu patojenleri inhibe ettiği bilinmektedir (Dündar, 2006).

Tablo 4.6 *Leu. mesenteroides*'in inhibisyon zon çapları (mm).

		Süpernatant seyreltme oranı (g mL^{-1})			
Leu. mesenteroides	Uygulama şekli	1:1	1:2	1:4	1:6
Y35B	D	-	-	-	-
Y35B	pH-6	-	-	-	-
Y35K	D	17	-	-	-
Y35K	pH-6	20	15	-	-
Y35Ş	D	-	-	-	-
Y35Ş	pH-6	-	-	-	-
Y54K	D	20	16	15	
Y54K	pH-6	20	-	-	-

Not: —, Zon yok, D: Direkt bakteri süpernatantı.

Leuconostoc spp. ait bir çok türün bakteriyosin ürettiği bilinmektedir (And ve Hoover, 2003). *Leu. mesenteroides* ürettiği bakteriyosinin saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Xiraphi vd., 2008; Mokdad vd., 2020). *M. luteus* DSM1790'a karşı 17-20 mm zon oluşturduğu tespit edilmiştir. Hem direkt hemde pH 6'da katalaz ile muamele edilen bakteri süpernatantının inhibisyon etkisi en yüksek olan *Leu. mesenteroides* suşları Y35K ve Y54K olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.7 *St. thermophilus*'un inhibisyon zon çapları (mm).

		Süpernatant seyreltme oranı (g mL^{-1})			
St. thermophilus	Uygulama şekli	1:1	1:2	1:4	1:6
Y89	D	-	-	-	-
Y89	pH-6	-	-	-	-
Y92	D	24	-	-	-
Y92	pH-6	-	-	-	-
Y98	D	33	28	15	-
Y98	pH-6	-	-	-	-
Y127B	D	-	-	-	-
Y127B	pH-6	-	-	-	-
Y127K	D	15	-	-	-
Y127K	pH-6	20	-	-	-
Y122	D	-	-	-	-
Y122	pH-6	-	-	-	-
Y128B	D	20	-	-	-
Y128B	pH-6	-	-	-	-
Y128K	D	15	-	-	-
Y128K	pH-6	-	-	-	-
PY49B	D	19	25	-	-
PY49B	pH-6	-	-	-	-
PY49K	D	-	-	-	-
PY49K	pH-6	-	-	-	-

Not: —, zon yok, D: direkt bakteri süpernatantı.

Yoğurt mikrobiyotasında öneme sahip olan *St. thermophilus* gıda endüstrisi için önemli olan termophilin olarak bilinen bakteriyosin üretirler ve gıdaların bozulmasına sebep olan *Cl. sporogenes*'e karşı antmikrobiyal etkiye sahiptir (Mezaini vd., 2009). Mathot vd., (2003) yapmış olduğu çalışma ile *St. thermophilus* 580'in, *Cl. tyrobutyricum* tarafından bozulmayı önlemek için peynir yapımında kullanım için iyi bir potansiyele sahip yeni bir bakteriyosin ürettiğini belirlemiştir. Bu iki çalışma ile *St. thermophilus*'un ürettiği bakteriyosin ile *Clostridium* türlerinin inhibe edilebileceği görülmektedir. Bu yüzden *St. thermophilus*'un bakteriyosin aktivitesinin incelenemesi bu tez için önem arzetmektedir. İnhibisyon etkisi en yüksek olan Y98 ve Y92 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8 *Lc. lactis*'in inhibisyon zon çapları (mm).

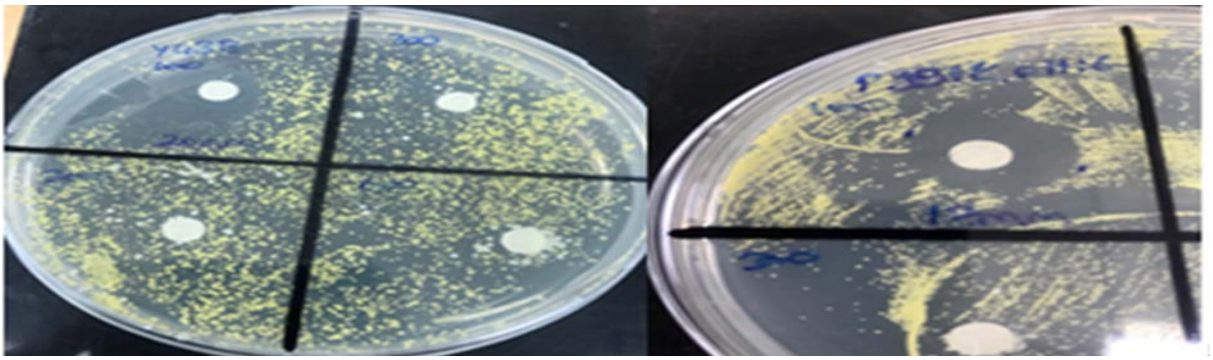
		Süpernatant seyreltme oranı (g mL^{-1})			
Lc. lactis	Uygulama şekli	1:1	1:2	1:4	1:6
PY80B	D	15	-	-	-
PY80B	pH-6	-	-	-	-
PY81B	D	20	20	20	-
PY81B	pH-6	-	-	-	-
PY81K	D	15	-	-	-
PY81K	pH-6	15	-	-	-
PY82B	D	15	-	-	-
PY82B	pH-6	15	-	-	-
PY82K	D	-	-	-	-
PY82K	pH-6	-	-	-	-
PY83B	D	-	-	-	-

Tablo 4.8 *Lc. lactis*'in inhibisyon zon çapları (mm) (devamı).

PY83B	pH-6	-	-	-	-
PY83K	D	20	15	-	-
PY83K	pH-6	14		-	-
PY91B	D	20	16	-	-
PY91B	pH-6	16	12	-	-
PY91K	D	20	-	-	-
PY91K	pH-6	23	-	-	-
PY142K	D	-	-	-	-
PY142K	pH-6	-	-	-	-

Not: —, Zon yok, D: Direkt bakteri süpernatantı.

İnhibisyon etkisi en yüksek olan PY91K'dır. Nisin (E234); üzerinde birçok çalışma yapılmış ve karakterizasyon çalışmalarına dahil olan bakteriyosindir ve *Lc. lactis* tarafından üretildiği bilinmektedir ve gıdalarda biyo-koruyucu olarak lisans alan tek bakteriyosin olmakla birlikte (Gálvez vd., 2007), *Cl. sporogenes* üzerine inhibe edici etkiye sahiptir. *Cl. tyrobutyricum*'un gelişimini engelleyen nisin bakteriyosini ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Biyokoruyucu teknolojilerle alakalı bakteriyosin üzerine detaylı çalışmalar vardır (Settanni ve Corsetti, 2008; de Arauz vd., 2009).



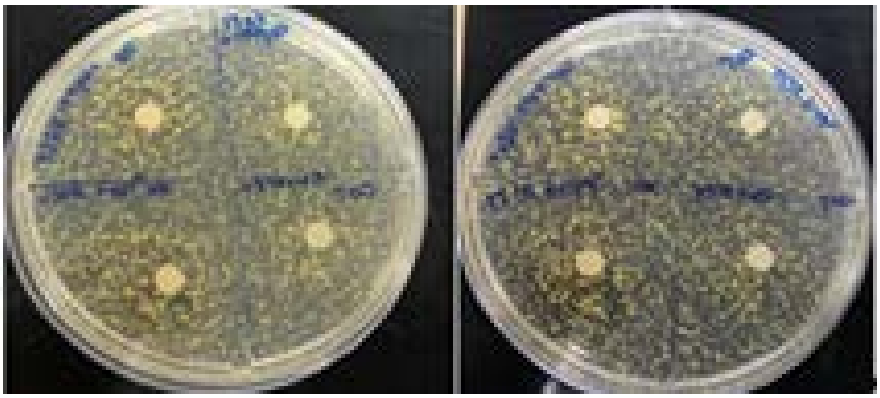
Şekil 4.15 LAB izolatlarının bakteriyosin ve benzeri maddelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.

4.8 LAB'nin Bakteriyosin ve/veya Bakteriyosin Benzeri Maddelerin Ön Karakterizasyonu

4.8.1 Enzimin Etkisinin Değerlendirilmesi

Bakteriyosin etkisinin belirlendiği 15 bakterinin bakteriyosin karakterizasyonu için enzim etkisi tripsin ve proteinaz-K ile muamele edilmiş *M. luteus* DSM1790'a karşı inhibisyon etkisi incelenmiş olup aktivite kaybına uğradığı, katalaz enziminden ise etkilenmediği tespit edilmiştir. Etki gözlemlenemedği için tablo oluşturulmamıştır. Görseller Şekil 4.16'da verilmiştir. Bakterilerin süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesinin, enzimlerle muamele edildiğinde kaybolduğu görülmüştür. MRS Broth kontrol grubu olarak kullanılmış olup herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Kozan'ın (2022) yapmış olduğu tez çalışmasında proteinaz K, tripsin, α-kemotripsin ve pepsin enzimleriyle muamele etmiş ve aktivite kaybı olduğu tespit edilmiş ve bu sonuçlar yapmış olduğumuz tezdeki verilerle benzerlik göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada da enzim uygulaması sonucu LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin proteinaz K ve tripsin, uygulaması sonucu aktivitelerini tamamen kaybettiği belirlenmiş ve bakteriyosin ve benzeri maddeler üzerine katalaz enzimlerinin etkili olmadığı belirlenmiştir. Yakıt (2019) yaptığı çalışmada proteinaz-K ve proteinaz K / katalaz uygulamaları inhibisyon etkisinin olmaması, antimikrobiyel özellik gösteren maddenin protein doğasında olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Tezde proteinaz K / katalaz uygulamaları sonucunda da inibisyon etkisinin görülmemesi benzerlik göstermektedir. Enzimlerle muamele edildikten sonra aktivite etkinliğinin devam

etmesi, bakteriyosinlerin lipid ya da karbonhidrat gruplarını ihtiva etmediğin göstermektedir. Yapılan diğer çalışmalarda da LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin katalaz enzimi ile muamale sonucu aktivasyon kaybı olmadığı ancak proteinaz K, tripsin, α-kemotripsin ve pepsin gibi proteolitik enzimler ile aktivitelerini kısmen ya da tamamen yitirdikleri tespit edilmiştir (Furlaneto-Maia vd., 2020; Daba vd., 2022). Xiraphi vd., (2008) yapmış olduğu çalışma ile *St. thermophilus*'un tripsin, a-kimotripsin, a-amilaz, proteaz, proteinaz K ve pepsin gibi proteolitik enzimler ile 1 saatlik inkübasyondan sonra bile hem ham hem de saflaştırılmış bakteriyosini inaktive ettiğini gözlemlemişlerdir. Zhang vd., (2018) yapmış olduğu çalışma ile *L. plantarum*'un tripsin ve proteinaz K gibi proteolitik enzimler ile aktivitenin tamamen kaybolduğunu gözlemlemişlerdir Grosu-Tudor vd., (2014) yaptığı çalışmada, farklı izolasyon kaynaklarından izole edilen LAB'nin patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. 6 adet LAB'sinin muhtemel bakteriyosin ürettiği ve. 6 suşun ürettiği antimikrobiyal bileşiğin protein doğasının belirlenmesi amacıyla tripsin, pronaz E, proteinaz K ve pepsin proteolitik enzimleri ile muamele sonunda 6 suşun inhibisyon aktivitesinin proteinaz K ve pronaz E ile inaktive olduğu açığa çıkarılmıştır. Proteinaz-K enzimi ile muamelenin antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi için önemli olmakla birlikte, antimikrobiyal etki gösteren maddenin protein formunda olduğu noktasında bilgi vermektedir. Metabolitlerin peptit ya da protein tabiatında olduğuna yönelik bilgi elde edilememiştir. Aktivitenin kaybolduğuna yönelik çalışmalarla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.16 Seçilen bakterilerin enzim ile muamele edilmesi sonucunda inhibisyon zon çaplarının (mm) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.

4.8.2 pH'nın Etkisinin Değerlendirilmesi

İncelenen bakterilerin süpernatantında antimikrobiyal etkinin pH'nın düşüşü ile paralel olarak arttığı tespit edilmiştir. MRS Broth kontrol grubu olarak kullanılmış olup sadece pH 4,0'da etki gözlemlenmiş olup diğer pH'larda herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Bakterilerin süpernatantında antimikrobiyal metabolitin pH düştükçe çözünürlüğünün ve stabilitesinin yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerden nisin, pediyosin ve plantarisinin aktivitelerinin ve stabilitenin düşük pH şartlarında daha iyi üretici olduğu ortaya çıkarılmıştır (Jozala vd., 2005).

Bakteriyosin etkisinin belirlendiği 15 bakterinin bakteriyosin karakterizasyonu için pH'nın etkisini incelemek için farklı pH'lara ayarlanmış süpernatantların *M. luteus* DSM1790'a karşı inhibisyon etkisi incelenmiş olup sonuçlar Tablo 4.9, 4.10, 4.11'de görseller Şekil 4.17'de verilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde LAB'nin bakteriyosin aktivitesinin pH 2,0-6,0 arasında aktivitesini korurken, bazik pH'larda (8,0-12,0) aktivite kaybına uğradığı, asidik pH'larda ise LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitelerinin tamamen arttığı diğer LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin ise aktivitelerini koruduğu tespit edilmiştir. Ribeiro vd., (2017) yapmış oldukları çalışmada bakteriyosin aktivitesi geniş bir pH aralığında (2,0-12,0) korunduğunu bildirmişlerdir. Wen vd., (2016), yapmış olduğu çalışmada plantarisin K25'in pH 2,0-7,0 aralığında bir gece inkübasyon sonunda aktivitesinin sabit kaldığı ve bazik koşullarda ise aktivitesinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. *L. lactis* tarafından üretilen nisin Koral ve Tuncer (2014) ve *Enterococcus* türlerinin ürettiği bazı enterosinlerde asidik pH'larda bakteriyosinin çözünürlüğündeki artışa bağlı olarak aktivitenin arttığı ve bazik pH'larda ise aktivitenin azaldığını tespit etmişleridir. Benzer şekilde Gök Charyyev vd., (2019) asidik pH'larda bakteriyosinin çözünürlüğündeki artışa bağlı olarak aktivitenin arttığı ve bazik pH'larda ise aktivitenin azaldığı açığa çıkarılmıştır. Xiraphi vd., (2008) yapmış olduğu çalışma ile *St. thermophilus*'un pH 4-9'da 30°C'de 1 hafta sonra tam aktiviteyi korumadığı, pH>6'da, 30°C'de 4 saat sonra %80 aktivitesin koruduğu ve 24 saat sonra tam inaktivasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada peynirden izole edilen LAB'lerin bakteriyosin aktivitesi geniş pH aralığında (3,0-11,0)

incelenmiş, en yüksek aktvitenin pH 4,0-6,0 arasında olduğu tespit edilmiş ve *St. thermophilus*'un bakteriyosin ve benzeri madde ürettiği tespit edilmiştir (Afrin vd., 2021). pH'nın etkisiyle aktivitesi en yüksek Y48, Y35K, Y54K ve PY81K olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.9 *L. plantarum*'un farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çapları (mm).

	pH 2		pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10		pH 12	
L. plantarum	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**
Y32K	32	25	22	15	12	11	-	-	-	-	-	-	-	-
Y43B	30	22	10	-	16	15	-	-	-	-	-	-	-	-
Y43K	33	18	17	-	24	19	-	-	-	-	-	-	-	-
Y48B	30	25	15	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y48	40	30	40	20	25	20	-	-	-	-	-	-	-	-
Y51B	28	17	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y51K	30	24	13	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Not: —, Zon yok. Süpernatantot seyreltme oranı;1:1, 1:2 (g mL^{-1})

Tablo 4.10 *Lc. lactis*'in farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çapları (mm).

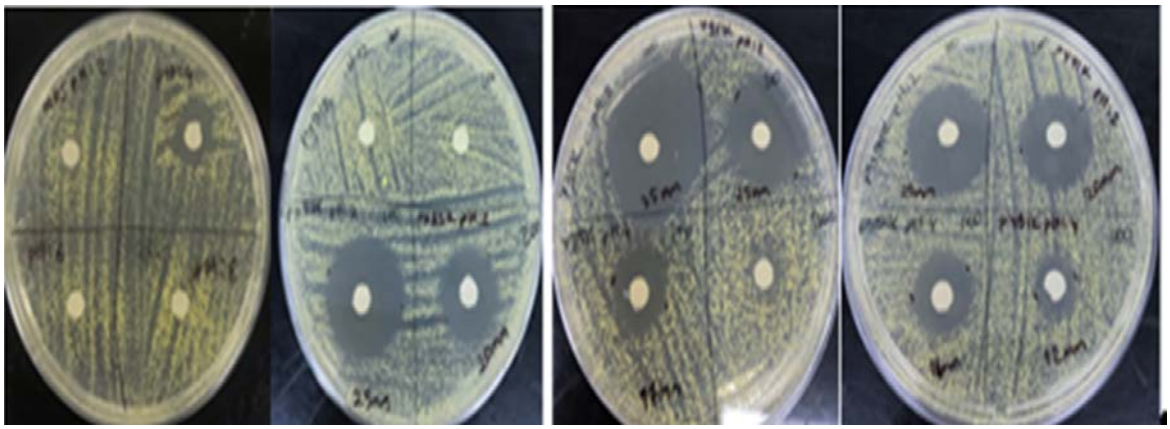
	pH 2		pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10		pH 12	
Lc. lactis	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
PY81K	25	18	10	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY82B	22	16			15									
PY83K	25	20	12	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY91B	21	16	16	-	16	12	-	-	-	-	-	-	-	-
PY91K	25	20	20	12	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Not: —, Zon yok. Süpernatant seyreltme oranı;1:1, 1:2 (g mL^{-1})

Tablo 4.11 *Leu. mesenteroides, St. thermophilus ve* MRS Broth kontrol grubunun farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çapları (mm).

	pH 2		pH 4		pH 6		pH 7		pH 8		pH 10		pH 12	
Leu. mesenteroides	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**
Y35K	35	25	17	10	20	15	-	-	-	-	-	-	-	-
Y54K	35	30	15	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St. thermophilus	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**	**1:1**	**1:2**
Y127K	25	20	15	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Not: —, Zon yok. Süpernatant seyreltme oranı;1:1, 1:2 (g mL^{-1})



Şekil 4.17 Seçilen bakterilerin farklı pH değerlerinde inhibisyon zon çaplarının (mm) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.

4.8.3 Sıcaklık Etkisinin Değerlendirilmesi

Bakteriyosin etkisinin belirlendiği 15 bakterinin bakteriyosin karakterizasyonu için sıcaklığın etkisini incelemek için süpernatantlara farklı sıcaklık ve süre etkisinin *M. luteus* DSM1790'a karşı inhibisyon etkisi incelenmiş olup sonuçlar *Leu. mesenteroides*'e ait zon çapları Tablo 4.12, *L. plantarum'a* ait zon çapları Tablo 4.13, *St. thermophilus* ve *L. lactis*'e ait zon çapları Tablo 4.14 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde LAB'nin sadece 3 tanesinin (Y54K, Y48B ve PY83K), 40ºC'de ve 60ºC 10 dk ısıl işleme dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Süpernatanttaki antimikrobiyal metabolitler; 40, 60, 80 ve 100°C'de 30 dk ısıl işlem kombinasyonları sonunda aktivite gözlemlenememiş ve aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir. Sıcaklık parametreleri 80°C ve 100°C'de 10 dk süre uygulaması ile antimikrobiyal metabolitlerin etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. MRS Broth kontrol grubu olarak kullanılmış olup her iki süre parametresinde herhangi bir etki gözlemlenmemiştir. Y48B, ve Y54K ve PY83K bakterilerinde 40°C'de 10 dk ısı uygulaması ile saptanabilir bir aktivite kaybı olmamıştır. Ribeiro vd.'nin (2017) yapmış olduğu çalışma ile bakteriyosin aktivitesi yüksek ısıl işlem sıcaklıklarıyla (100°C/1 sa) korunduğunu saptamıştır. Başka bir çalışmada *St. thermophilus*'un 90 ve 100°C'de inkübasyondan sonra bakteriyosininin aktivite kaybı (%40) olduğu

tespit edilmiştir (Xiraphi vd., 2008). Bu tezde 100°C inhibisyon etkisi gözlemlenemediği için LAB bakteriyosin üreticisi olarak değerlendirilememiştir.

Tablo 4.12 *Leu. mesenteroides*'in farklı sıcaklık ve süre uygulandığında inhibisyon zon çapları (mm).

Bakteri	40°C 10dk	60°C 10dk	80°C 10dk	100°C 10dk
Y35K	-	-	-	-
Y54K	16			

Not: —, zon yok.

Tablo 4.13 *L. plantarum* farklı sıcaklık ve süre uygulandığında inhibisyon zon çapları (mm).

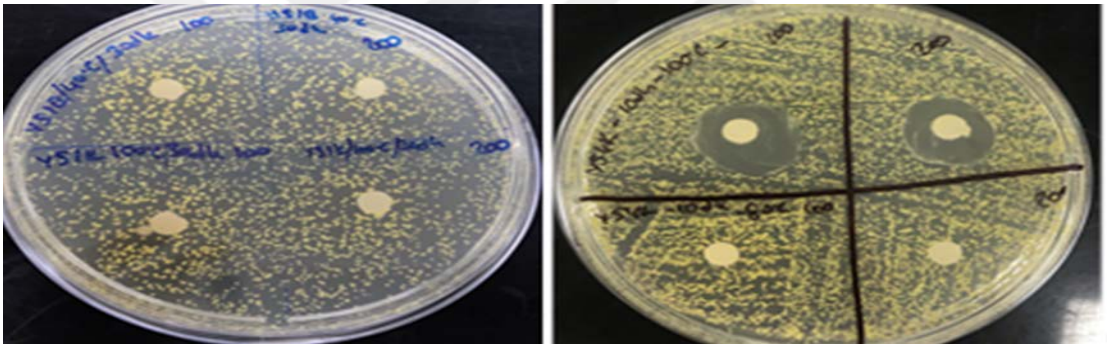
Bakteri	40°C 10dk	60°C 10dk	80°C 10dk	100°C 10dk
Y32K	-	-	-	-
Y43B	-	-	-	-
Y43K	-	-	-	-
Y48B	24	15	-	-
Y48	-	-	-	-
Y51B	-	-	-	-
Y51K	-	-	-	-

Not: —, zon yok.

Tablo 4.14 *St. thermophilus* ve *L. lactis'in* farklı sıcaklık ve süre uygulandığında inhibisyon zon çapları (mm).

Bakteri	40°C 10dk	60°C 10dk	80°C 10dk	100°C 10dk
Y127K	-	-	-	-
PY81K	-	-	-	-
PY82B	-	-	-	-
PY83K	15			

Not: —, zon yok.



Şekil 4.18 Seçilen bakterilerin farklı sıcaklık ve süreye ait inhibisyon zon çaplarının (mm) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesine ait görseller.

4.9 Peynir Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Özellikleri

Cl. sporogenes'in (ZMP-1-4) peynir matrisinde depolama boyunca mikrobiyal ve fizikokimyasal özellikleri nasıl etkilediği ve LAB ile inhibisyonun incelenmesi için hem kaşar peyniri hem beyaz peynir üretimi yapılmıştır.

4.9.1 Laktobasillerin Sayısı

Kaşar peynirlerinde belirlenen laktobasil sayıları Tablo 4.15 ve Tablo 4.16'da verilmiştir. pH değerinin yüksek olmasından dolayı mikroorganizmaların gelişimi de artmaktadır. Kontrol grubu peynirde depolamanın 10. ve 20. günlerinde örnekler arasında istatistiksel bir fark olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür. Depolama boyunca

kontrol, CL-LAB ve CL peynir grubunda laktobasil sayımında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görülmüştür ($p<0,05$). Ancak LAB ilaveli kaşar peynir grubu 4°C'de depolama boyunca arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Mezofilik laktobasiller çiğ sütte ve süt işletmelerinin çevresel şartlarında kuşkusuz doğal olarak bulunmasına rağmen, *Lactococcus* cinsine ait kuvvetli asit oluşturan türler vasıtasıyla çiğ sütün asitlenmesi durumunda sıklıkla aşırı gelişim gösterirler. Bununla birlikte peynir üretim sürecine de girerler çünkü bunlar farklı peynir çeşitlerinin olgunlaştırılmasında ikincil mikrobiyota olarak sıklıkla bulunurlar. Bu durum özellikle çiğ süt peynirleri için geçerlidir. Ancak mezofilik laktobasil, modern teknoloji ile üretilmiş peynirlerde de yaygın olarak bulunabilir. Starter olmayan yani süt ve çevresel kaynaklı laktobasil, sonradan çok hızlı gelişerek starter kültürlerden bile daha yüksek seviyelere ulaşabilir (Wouters vd., 2002). Starter olarak kullanmayan mezofilik laktobasil, peynir olgunlaştırması sırasında birçok peynir çeşidinde mikrobiyotanın önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Beresford vd., 2001; Beresford, 2007). Bu bilgiler doğrultusunda 25°C'de depolama süresince laktobasil sayısında logaritmik artış doğrulanmaktadır ($p>0,05$). Kontrol grubunda 25°C depolama boyunca laktobasillerin sayısındaki artış, sonradan çok hızlı gelişerek starter kültürden bile daha yüksek seviyelere ulaşabileceği belirlenmiştir. 25°C'de depolanan CL grubu kaşar peyniri örneklerinde 4°C'de depolanan CL grubu kaşar peynir örneklerinde laktobasil sayılarında 1 logaritmik birim azalma gözlenmiştir. Formülasyon-zaman, zaman-sıcaklık interaksiyon etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ürünün depolama sıcaklığının laktobasil sayısını önemli derecede etkilediği bulunmuştur ($p<0,05$). Peynir matrisinde *Clostridium* spp. LAB sayısını potansiyel olarak rekabetçi bir şekilde azalttığı için bu etkinin aynı zamanda suşa spesifik olabileceği *Lc. lactis* subsp. *lactis* INIA 415'in antiklostridial aktivitesini test eden yakın tarihli bir çalışmada LAB sayılarında azalma gözlemlenmiştir (Ávila vd., 2020).

Kaşar peynirleri 4°C ve 25°C'de depolama süresince laktobasil sayısı sırasıyla 5,7–8,4 log kob g^{-1} ile 6,5–8,4 log kob g^{-1} arasında olduğu tespit edilmiştir ve önceki yapılan çalışmalar ile uyumludur (Matijašić vd., 2007; Ávila vd., 2020). Son olarak, kontrol peynir örneklerinde benzer mikrobiyal sayıların varlığının,

pastörizasyon sürecinde LAB suşlarının potansiyel hayatta kalma olasılığının yanı sıra daha önce tartışıldığı gibi kaşar peynir üretimi sırasında LAB suşlarının kontaminasyonunu önlediği belirtilmiştir (González ve Zárate, 2015).

Tablo 4.15 Kaşar peynir örneklerinde 4°C'de depolama süresinde laktobasil sayısında meydana gelen değişim (log kob^{-1}).

	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
KONTROL	$7,0\pm0,03^{Ac}$	$6,9\pm0,02^{ABb}$	$6,9\pm0,04^{ABb}$	$6,8\pm0,12^{Bb}$	$6,3\pm0,09^{Cb}$
LAB	$8,4\pm0,08^{Aa}$	$8,2\pm0,12^{Ba}$	$7,9\pm0,04^{Ca}$	$7,8\pm0,05^{Ca}$	$7,6\pm0,02^{Da}$
CL-LAB	$8,0\pm0,08^{Bb}$	$8,2\pm0,14^{Aa}$	$7,8\pm0,06^{Ca}$	$7,7\pm0,02^{CDa}$	$7,6\pm0,02^{Da}$
CL	$6,5\pm0,02^{Ad}$	$6,5\pm0,11^{Ac}$	$6,3\pm0,06^{Ac}$	$6,2\pm0,11^{Ac}$	$5,7\pm0,00^{Bc}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Tablo 4.16 Kaşar peynir örneklerinde 25°C'de depolama süresinde laktobasil sayısında meydana gelen değişim (log kob^{-1}).

	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
KONTROL	$7,0\pm0,07^{Ec}$	$7,2\pm0,02^{Cc}$	$7,1\pm0,07^{Dc}$	$7,3\pm0,02^{Bc}$	$7,4\pm0,01^{Ac}$
LAB	$8,4\pm0,03^{Aa}$	$8,3\pm0,01^{ABa}$	$8,3\pm0,13^{Ba}$	$8,0\pm0,03^{Ca}$	$8,0\pm0,02^{Ca}$
CL-LAB	$8,0\pm0,07^{Bb}$	$7,8\pm0,10^{Cb}$	$8,1\pm0,12^{Ab}$	$7,8\pm0,03^{Cb}$	$7,8\pm0,02^{Cb}$
CL	$6,5\pm0,05^{Cd}$	$6,8\pm0,03^{Bd}$	$6,5\pm0,05^{Cd}$	$6,8\pm0,03^{Bd}$	$7,1\pm0,035^{Ad}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Beyaz peynirlerinde belirlenen laktobasil sayıları Tablo 4.17'de verilmiştir. 4°C'de depolanan beyaz peynirlerinde laktobasil sayısının LAB ve CL-LAB ilaveli beyaz peynir örneklerinde başlangıç laktobasil sayısı 8 log kob g^{-1} olduğu, bununla birlikte, kontrol ve CL ilaveli beyaz peynir örneklerinde başlangıç laktobasil bakteri sayısı 7 log kob g^{-1} olduğu tespit edilmiştir. Depolama boyunca laktobasil sayısında azalma tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte LAB ve CL-LAB ilaveli peynir grubunda depolamanın 60. gün analizine kadar örnekler arasında istatistiksel bir fark olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür Her peynir grubu kendi içinde sonuçları paralellik göstermektedir ($p<0,05$). Sonuçlar, çedar peyniri ve beyaz

peynirinde yapılan önceki çalışmalarla uyumludur (Öner vd., 2006; Lazárková vd., 2021).

Tablo 4.17 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinde laktobasil sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).

	0. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
KONTROL	$7,4\pm0,15^{Cb}$	$7,7\pm0,02^{BCb}$	$8,0\pm0,04^{Ab}$	$7,7\pm0,01^{ABc}$
LAB	$8,6\pm0,09^{Ba}$	$8,6\pm0,03^{Ba}$	$8,8\pm0,01^{Ba}$	$9,2\pm0,02^{Aa}$
CL-LAB	$8,8\pm0,06^{Aa}$	$8,7\pm0,05^{Aa}$	$8,8\pm0,00^{Aa}$	$8,7\pm0,00^{Ab}$
CL	$7,6\pm0,08^{Ab}$	$7,4\pm0,02^{Ac}$	$7,4\pm0,03^{Ac}$	$7,4\pm0,15^{Ad}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

4.9.2 Laktokokların Sayısı

Kaşar peynirlerinde belirlenen laktokok sayıları Tablo 4.18 ve 4.19'da verilmiştir. 4°C ve 25°C'de depolanan kaşar peynirlerinde laktokok sayısı sırasıyla 6,8–7,8 log kob g^{-1} ile 7,1–8,5 log kob g^{-1} arasında olduğu tespit edilmiştir 4°C depolama ile laktokok sayısında önemli düzeyde olmayan bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,05$). LAB'nin asitliği arttırmaları sonucunda depolama süresinde canlılığın azaldığı belirlenmiştir. Laktokok sayıları 4°C depolama esnasında CL ilaveli peynir grubunda ilk günden itibaren 40. güne kadar azalma göstermesine rağmen depolama sonuna kadar oldukça yüksek bulunmuştur. Depolamanın sadece 20. gününde örnekler arası fark istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) iken diğer depolama günlerindeki fark önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. pH değişimleri ile canlılık arasındaki ilişkinin önemi tekrar vurgulanmıştır. 25°C depolama ile laktokok sayısında dikkate değer bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Laktokok sayıları 25°C depolama esnasında LAB ilaveli peynir grubunda ilk 20 güne kadar artış sağlarken 30. günden itibaren azalış göstermiş olup depolama sonuna kadar oldukça yüksek bulunmuştur. Depolamanın sadece 20. gününde örnekler arası fark istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) iken diğer depolama günlerindeki fark önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Formülasyon-zaman, zaman-sıcaklık interaksiyon etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ürünün depolama sıcaklığının laktokok

sayısını önemli derecede etkilediği bulunmuştur ($p<0,05$). Mezofilik laktokokların genel olarak süte çevresel kontaminasyonla dahil olduğu düşünülmektedir. Uygun olmayan depolama sıcaklığında laktokok sayımındaki artışın sebebinin süte çevresel kontaminasyonla bulaşan mikroorganizmalar olduğu düşünülmektedir. Yüksek derecede ısıl işlem uygulanamadığı için başlangıçta var olan mikrobiyal yük uygun olmayan depolama sıcaklığı ile artış göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Laktokok sayıları açısından kontrol, LAB ve CL-LAB grupları için benzer bir profil gözlenmiştir ancak CL grubundaki laktokok sayıları 4°C depolama sırasında 1 logaritmik birim azalmıştır ($p<0,05$). Depolama süresince laktokok sayıları önceki yapılan çalışmalar ile uyumludur (Sert vd., 2007).

Tablo 4.18 Kaşar peynir örneklerinde 4°C'de depolama süresinde laktokok sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).

	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
KONTROL	$7,1\pm0,20^{CDd}$	$7,8\pm0,00^{Aa}$	$7,6\pm0,18^{ABa}$	$7,1\pm0,08^{CDc}$	$7,4\pm0,01^{BCb}$
LAB	$7,4\pm0,04^{Bc}$	$7,4\pm0,07^{Bb}$	$7,7\pm0,12^{Aa}$	$7,4\pm0,01^{Bb}$	$7,5\pm0,02^{ABb}$
CL-LAB	$7,5\pm0,02^{Bb}$	$7,5\pm0,18^{Ba}$	$7,1\pm0,27^{Cb}$	$7,8\pm0,00^{Aa}$	$7,7\pm0,03^{Aa}$
CL	$7,7\pm0,11^{Aa}$	$7,4\pm0,00^{ABb}$	$7,3\pm0,25^{Bb}$	$6,8\pm0,11^{Cc}$	$6,8\pm0,11^{Cc}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Tablo 4.19 Kaşar peynir örneklerinde 25°C'de depolama süresinde laktokok sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).

	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
KONTROL	$7,1\pm0,01^{Bd}$	$7,2\pm0,03^{ABd}$	$7,1\pm0,03^{Bb}$	$7,3\pm0,11^{ABb}$	$7,4\pm0,07^{Ac}$
LAB	$7,4\pm0,34^{Bc}$	$8,4\pm0,03^{Ab}$	$8,3\pm0,21^{Ac}$	$7,6\pm0,06^{Bb}$	$7,6\pm0,02^{Bb}$
CL-LAB	$7,5\pm0,35^{Cb}$	$8,5\pm0,15^{Aa}$	$7,9\pm0,01^{Ba}$	$8,1\pm0,30^{Ba}$	$7,2\pm0,05^{Cc}$
CL	$7,7\pm0,09^{Ba}$	$8,0\pm0,17^{Ac}$	$7,5\pm0,03^{Cb}$	$7,5\pm0,12^{Cb}$	$7,8\pm0,03^{Ba}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Beyaz peynirlerde belirlenen laktokok sayıları tablo 4.20'de verilmiştir. LAB ve CL-LAB ilaveli beyaz peynir örneklerinde başlangıç laktokok sayısı 9 log kob g^{-1}'dir.

Depolama boyunca LAB ilaveli peynir grubunda laktokok sayısında dikkate değer bir azalma tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, kontrol beyaz peynir örneklerinde başlangıç laktokok bakteri sayısı 8 log kob g^{-1}'dir ($p<0,05$). CL ilaveli beyaz peynir örneklerinde başlangıç laktokok bakteri sayısı 7 log kob g^{-1}'dir ($p<0,05$). Depolama boyunca her peynir grubu kendi içinde sonuçları paralellik göstermektedir ($p<0,05$). 0. günde tüm peynirler arasında ticari starterden itibaren laktokok sayılarında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Bununla birlikte, CL-LAB inoküle edilmiş peynirlerde depolamanın 30. gününde, kontrol peynirlerine göre daha yüksek starter laktokok canlılığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Bu canlılık, peynirdeki *Cl. sporogenes* suşlarının metabolizmasının olumlu bir etkisi olduğunu ve laktokok dayanıklılığı için elverişli bir ortam oluşturduğunu göstermektedir. Karbonhidrat açığa çıkması ve enerji tükenmesi, laktokokların metabolizmalarını glikolizden amino asit katabolizmasına neden olur ve ek enerji kaynağı *Lc. lactis*'in canlı kalmasını artırır (Stuart vd., 1999). Sonuçlar, beyaz peynirinde yapılan önceki çalışmalarla da uyumludur (Öner vd., 2006). Ávila vd., (2020), Havlíková vd., (2018), Gómez-Torres vd., (2014) ve González ve Zárate (2015) yapmış oldukları çalışmalardaki laktokok sayıları mevcut çalışmadaki veriler ile benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.20 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinin laktokok sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).

	0. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
KONTROL	$8,5\pm0,07^{Ab}$	$8,3\pm0,00^{Bc}$	$8,0\pm0,02^{Cb}$	$8,3\pm0,02^{Bb}$
LAB	$9,3\pm0,05^{Aa}$	$9,3\pm0,08^{Aa}$	$9,3\pm0,01^{Aa}$	$9,0\pm0,07^{Ba}$
CL-LAB	$9,2\pm0,01^{Aa}$	$8,9\pm0,05^{Cb}$	$9,3\pm0,02^{Aa}$	$9,0\pm0,03^{Ba}$
CL	$7,7\pm0,01^{Cc}$	$8,2\pm0,05^{Ac}$	$8,1\pm0,13^{ABb}$	$7,9\pm0,03^{BCc}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

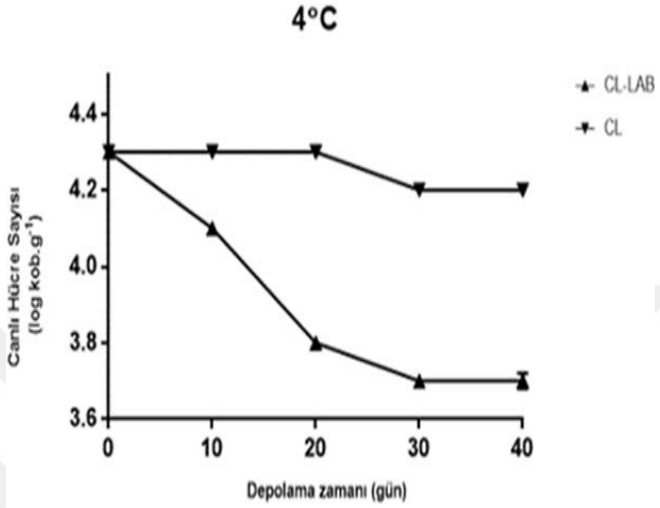
Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

4.9.3 Anaerobik Sporların Sayısı

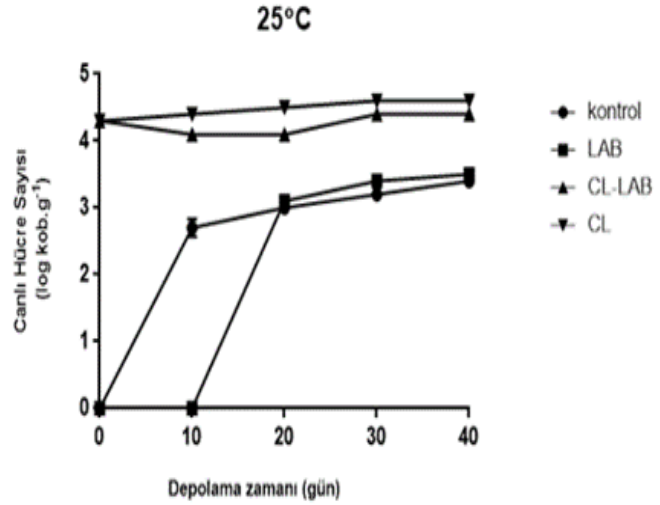
Kontrollü şartlarda üretimi gerçekleştirilen peynirler *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ile kontamine edilmiştir. Depolama boyunca *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporların sayısı takip edilmiştir. Kaşar peynirlerinin 4°C ve 25°C'de depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen mikrobiyal değişimi Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir. 4°C'de 40 günlük depolama boyunca kontrol ve *L. plantarum* (Y48) *ve Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli LAB peynir grubunda anaerobik spor tespit edilememiştir. Sporların tespit edilememiş olması kontrollü şartlarda üretimin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve *L. plantarum* (Y48) *ve Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli peynirde depolama boyunca anaerobik spor sayısında 20. günden itibaren azalma gerçekleşmiştir ($p<0,05$). Seçilen koruyucu kültürlerin spor oluşumunu 20. günden itibaren azaltıyor olması seçilen kültürlerin antiklostridial etkiye sahip olduğunu desteklemektedir. *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) uygulaması, 4°C'de 40 günlük depolama süresi boyunca *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarında yaklaşık 1 log kob g^{-1} azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). *Clostridium* türleri anaerobik koşullarda optimum gelişme sıcaklıkları 3-8°C'de uygun besin ortamında spor ürettikleri bilinmektedir, literatürde geçen bu bilgi çalışmamızla paralellik göstermektedir. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli CL peynir grubunda 4°C'de anaerobik sporların sayısı sabit kalmış, *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporların sayısı 0. günde 4,3 log kob g^{-1} iken 40. günde 4,2 log kob g^{-1} olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Peynir ortamında da 4°C'de depolamada *Clostridum* sporlarının canlılığını koruduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, kaşar peynir örnekleri 25°C'de depolandığında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarının sayısında azalma gözlenmemiş olup, sıcaklığın *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarının gelişmesi için önemli bir rolü olduğunu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol ve LAB ilaveli peynir grubunda 20. günden itibaren spor sayılarında artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 25°C'de Kaşar peynirinin 25°C'de depolamada CL ilaveli peynir grubunda anaerobik sporların sayısının dikkate değer bir değişim gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Kaşar peynirinin 25°C'de depolamada CL-LAB ilaveli peynir grubunda anaerobik sporların sayısı 20. güne kadar değişim

gözlenmezken ($p>0,05$) 30. ve 40. gün sayımlarında *Cl. sporogenes* spor sayılarında artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Formülasyon-zaman, zaman-sıcaklık interaksiyon etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ürünün depolama sıcaklığının anaerobik spor sayısını önemli derecede etkilediği bulunmuştur ($p<0,05$). Bu çalışma ile süt ve süt mamullerinin depolanması esnasında soğuk zincirin önemi tekrar ortaya konulmuştur. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sayılarının azalması üretim periyodunu takiben başlandığı ve 30 günlük depolamada *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sayısındaki azalmanın maksimum noktaya ulaştığı ve bu süre sonunda *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sayılarının değişmediği gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Önemli olarak, LAB inoküle edilen CL-LAB peynir grubunun, kontrol peynir örneğine kıyasla 25°C'de depolama sırasında *Clostridium* spp.'nin gelişmesini en az 10 gün geciktirmiştir ($p<0,05$). Bulgularımız, *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in (PY91K) 4°C depolama sıcaklığında kaşar peynirinde *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarını inhibe etmede başarılı olduğu tespit edilmiştir. Lazárková vd., (2021)'de yapmış oldukları çalışmada peynirin depolama sıcaklığını +6'den +22°C'ye yükseltildiğinde, 3 aylık depolamadan sonra spor oluşturan mikroorganizmaların sayısı yaklaşık bir logaritmik arttığını gözlemlemiştir ($p<0,05$). Spor sayılarındaki artışın sıcaklık parametresinden etkilendiği yapmış olduğumuz çalışma ile benzerlik göstermektedir. Cankurt (2015) yapmış olduğu çalışmada bitki aromatik sularının ve uçucu yağlarının blok tip eritme peynirinde geç şişmeye neden olan *Cl. tyrobutyricum*'un inhibisyonunu incelemiş ve eritme peynirlerinin depolama sırasında *Cl. tyrobutyricum* sayıları 3,07-3,12 log g^{-1} ile 4,27-6,09 log g^{-1} arasında olduğunu ve kekik ve nane uçucu yağları ile nisine göre daha fazla inhibisyon etkisi olduğunu saptamış olup *Clostridium* spp. inhibisyonu için önem arzetmektedir. Nisinin *Clostridium* türlerine karşı etkisinin türe göre değişiklik gösterdiğini düşündürmektedir. Daha önce hem *L. plantarum* hem de *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarının farklı peynir türlerinde *Clostridium* spp.'nin kontrolünde etkili olduğu gösterilmiş ve antiklostridial aktivitelerinin bakteriyosin üretim yetenekleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (González ve Zárate, 2015; Ávila vd., 2020) ve *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), bu suşların bakteriyosin ve benzeri maddeleri üretiminden de kaynaklanabileceği tespit edilmiştir. 4°C'de depolama süresince

CL ilaveli kaşar peynir örneklerinde *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısının sabit kaldığı tespit edilmiştir. González ve Zárate (2015), Garde vd., (2011) ve Le Bourhis vd., (2007) yaptıkları çalışmalar ile peynirlerin olgunlaşması boyunca *Cl. sporogenes* ve *Cl. beijerinckii* INIA 63 spor sayıları sabit kaldığını bildirmişlerdir, tezde elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.



Şekil 4.19 Kaşar peynirlerinin 4°C depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen değişim.

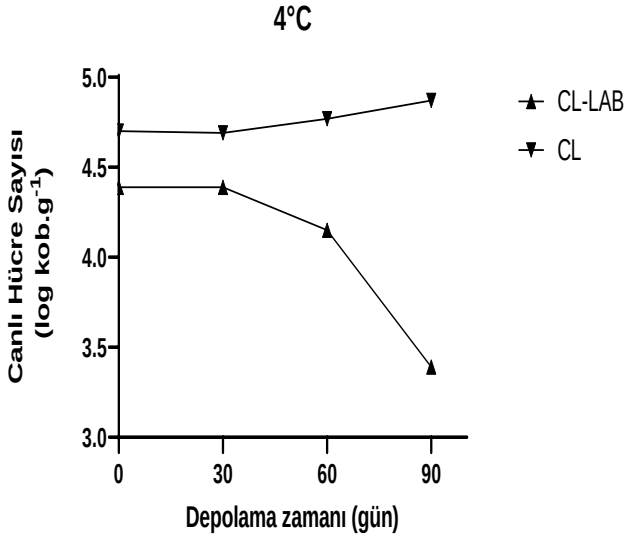


Şekil 4.20 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen değişim.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

Şekil 4.21'de 4°C beyaz peynirlerinin depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen mikrobiyal değişimi göstermektedir. Kontrol ve *L. plantarum ve Lc. lactis* subsp. *lactis* ilaveli peynir grubunda 4°C'de 90 günlük depolama boyunca *Clostridium* sporları tespit edilememiştir. Seçilen koruyucu kültürlerin spor oluşumunu 30. günden itibaren azalıyor olması seçilen kültürlerin antiklostridial etkiye sahip olduğunu desteklemektedir ($p<0,05$). *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) uygulaması, 4°C'de 90 günlük depolama süresi boyunca *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarında 1 log kob g^{-1} azalma ile sonuçlanmıştır ($p<0,05$). CL ilaveli peynir grubunda depolama boyunca spor sayısında ciddi bir değişim gözlemlenmemiştir ($p<0,05$). Vissers vd., (2006) yapmış olduğu çalışmada, geç şişmeyi önlemek için 3 ana seçenek önermiştir: (1) bütirik asidi en aza indirgemek çiğ sütte LAB ilavesi, (2) spor konsantrasyonlarını azaltmak için baktofügasyon yoluyla çiğ sütten sporlarının uzaklaştırılması ve (3) peynirde *Clostridium* sporlarının gelişmesinin engellenmesi için inhibitör ajanların eklenmesi (örneğin, lizozim ve nitrat) Birinci seçeneğin etkinliği iki farklı LAB'nin koruyucu starter olarak eklenmesi ile *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sayısında logaritmik azalma ile bu çalışmada doğrulanmıştır. Peynir yapımında *L. plantarum* ilave edilerek yapılan çalışmada *Cl. sporogenes* spor sayıları benzerlik göstermektedir (González ve Zárate, 2015).

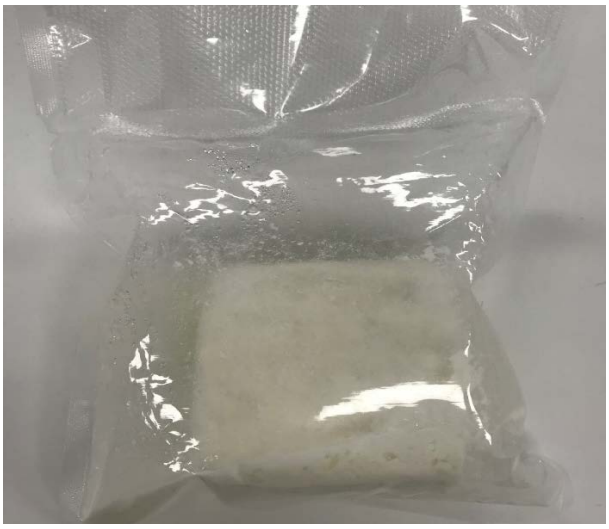
Cl. sporogenes sporları ile yapay olarak kontamine edilmiş peynirlerde, sporlar peynir altı suyu uzaklaştırılması sırasında kazein matriksinde tutulur ve süte göre pıhtıda yaklaşık 4 kat konsantre olur. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ile kontamine olmuş peynirlerde, sporların bütirik fermentasyonu gerçekleştiren vejetatif hücrelere çimlenmesi sonucu spor sayıları sabit kalmış ve 30. günde ilk geç şişme semptomlarının ortaya çıkmasıyla eş zamanlı olarak spor sayılarında artış meydana gelmiştir. Gómez-Torres vd., (2014) yapmış olduğu çalışma ile *Cl. beijerinckii* INIA 63 ve *Cl. sporogenes* INIA 71 ile inek sütünü kontamine edilmiştir, peynirde geç şişme ortaya çıktığında depolama ile spor sayılarındaki artış olmuş, tezde bulunan verilerle benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.21 Beyaz peynirin 4°C depolama sırasında *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) spor sayısında meydana gelen değişim.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

Depolama boyunca anaerobik sporların sayımı yanında görsel inceleme ile gaz oluşumunu ve ambalajın şişmesi takip edilmiştir. Şekil 4.22'de şişmiş penire ait görsel verilmiştir. Kontrol ve LAB ilaveli peynir grubunda vakum paket bozulmazken, CL-LAB ilaveli peynir grubunun vakum paketinde değişiklik olduğu, CL ilaveli peynir grubunun vakum paketinde ciddi bir değişiklik olduğu gözlemlenmiş, vakum ambalajları bozularak şişmiştir.



Şekil 4.22 Beyaz peynire ait depolama sırasında geç şişme olayına ait görseller.

4.9.4 Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayısı

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin belirlenmesinde önem arz etmektedir. Bu nedenle peynir üretiminde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı yapılarak peynirin mikrobiyolojik kalitesi ile ilgili genel fikir oluşması sağlanmaya çalışılmıştır. Kaşar peynirlerinde belirlenen TAMB sayıları tablo 4.21 ve 4.22'de verilmiştir. 4°C'de depolama boyunca canlılık 8,0–8,9 log kob g^{-1} arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. 25°C'de depolama esnasında 20. günden itibaren toplam aerobik mezofilik bakteri sayısında artış görülmüştür ($p<0,05$). 25°C'de depolama ile artan toplam canlı sayısına; peynirin üretim süresi, sütte var olan ve üretim esnasında kontamine eden mikroorganizmaların hızla çoğalması, depolama süresi, depolama sıcaklığının uygun olmamasından kaynaklı mikrobiyal canlının arttığı şeklinde yorumlanmıştır. Formülasyon-zaman, zaman-sıcaklık interaksiyon etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ürünün depolama sıcaklığının toplam aeorobik mezofilik bakteri sayısını önemli derecede etkilediği bulunmuştur ($p<0,05$). *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4)- *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli peynir örneklerinde 4°C'de depolanması ile toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının azalmasının fazla olmasının geç şişme sorunun engellendiğinin göstergesi olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda seçilen kültürlerin koruyucu kültür özellik taşıdığı doğrulanmıştır. Peynire inoküle edilen mikroorganizma çeşidinin değişmesi ile üretilen kaşar peynir örneklerinde benzer TAMB sayıları gözlemlenmiştir. 25°C'de depolanan peynir örneklerinde TAMB sayıları 8,4–9,0 log kob g^{-1} arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Toplam canlı sayısında artış olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P\leq0,05$). Genel olarak tüm peynir gruplarında TAMB sayısındaki artış ve azalış benzer bir değişim göstermiştir. Depolama esnasında sıcaklığının artması veya soğuk zincirin kırılması mikrobiyal gelişim için daha uygun ortam sağlamaktadır. Peynirler daha hijyenik ve daha dikkatli koşullarda üretilirse ve 4°C'de depolandığı sürece aerobik mezofilik bakteri sayısı azaltılabilir. Depolama süresince araştırmacıların sonuçları çalışmamızdaki bulgulara yakınlık göstermektedir (Cetinkaya ve Soyutemiz, 2006).

Tablo 4.21 Kaşar peyniri örneklerinde 4°C'de depolama süresinde TAMB sayısında meydana gelen değişim(log kob g^{-1}).

	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
KONTROL	$8,5\pm0,02^{Ac}$	$8,4\pm0,07^{Ad}$	$8,2\pm0,02^{Bc}$	$8,1\pm0,06^{BCc}$	$8,0\pm0,02^{Cd}$
LAB	$8,6\pm0,02^{Ab}$	$8,5\pm0,07^{ABc}$	$8,4\pm0,02^{BCb}$	$8,3\pm0,01^{CDb}$	$8,3\pm0,02^{Dc}$
CL-LAB	$8,9\pm0,02^{Aa}$	$8,8\pm0,04^{ABa}$	$8,6\pm0,07^{ABa}$	$8,6\pm0,03^{ABa}$	$8,6\pm0,04^{ABb}$
CL	$8,7\pm0,01^{Bb}$	$8,7\pm0,03^{Bb}$	$8,7\pm0,01^{Ba}$	$8,9\pm0,03^{Aa}$	$8,9\pm0,00^{Aa}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Tablo 4.22 Kaşar peyniri örneklerinde 25°C'de Depolama süresinde TAMB sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).

	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
KONTROL	$8,5\pm0,05^{Dc}$	$8,6\pm0,06^{Cb}$	$8,8\pm0,01^{Bb}$	$8,9\pm0,02^{Ab}$	$8,9\pm0,00^{Ab}$
LAB	$8,6\pm0,01^{ABb}$	$8,5\pm0,02^{BCc}$	$8,5\pm0,06^{Cc}$	$8,4\pm0,11^{Dc}$	$8,7\pm0,02^{Ac}$
CL-LAB	$8,9\pm0,02^{ABa}$	$8,7\pm0,02^{Cb}$	$8,8\pm0,02^{Bb}$	$8,9\pm0,00^{Ab}$	$8,9\pm0,01^{Ab}$
CL	$8,7\pm0,09^{Cb}$	$8,9\pm0,00^{Ba}$	$9,0\pm0,02^{Aa}$	$9,0\pm0,00^{Aa}$	$9,0\pm0,01^{Aa}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Beyaz peynirlerinde TAMB sayısında meydana gelen mikrobiyal değişim Tablo 4.23'de verilmiştir. Depolama boyunca canlılık 8,4-9,3 log kob g^{-1} olarak hesaplanmıştır. Peynir grubunda depolama boyunca canlı sayısında değişim olmasına rağmen *Clostridium* ilaveli peynir grubunda değişim gözlemlenmemiştir ve artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P\leq0,05$). Kahraman ve Bağdat (2022) yapmış oldukları çalışmada on beş adet ambalajsız beyaz peynir ile çalışmış olup, mikrobiyal canlılık, fizikokimyasal ve metataksonomik analizler sonucunda beyaz peynirlerinde TAMB sayısının minumum 4,60 log kob g^{-1}, maksiumum 8,67 log kob g^{-1} olduğunu bildirmişlerdir. Bu tezde üretilen kontrol grubu peynirlerde maksiumum 8,55 log kob g^{-1} olduğu, LAB ilaveli peynir grubunda maksiumum 9,30 log kob g^{-1} olduğu CL-LAB ilaveli peynir grubunda

maksiumum 9,16 log kob g^{-1}, CL ilaveli peynir grubunda maksiumum 8,60 log kob g^{-1} olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ve CL ilaveli peynir grubu TAMB sayısı Kahraman ve Bağdat (2022)'ın yapmış olduğu çalışma ile benzerlik göstermektedir. LAB ilaveli ve CL-LAB ilaveli peynir grubunun TAMB sayısının diğer iki gruptan yüksek olması koruyucu kültür *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilavesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.23 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinde TAMB sayısında meydana gelen değişim (log kob g^{-1}).

	0. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
KONTROL	$8,4\pm0,09^{Ab}$	$8,4\pm0,09^{Ab}$	$8,3\pm0,15^{Ab}$	$8,6\pm0,05^{Ab}$
LAB	$9,3\pm0,02^{Aa}$	$9,3\pm0,04^{ABa}$	$9,1\pm0,05^{BCa}$	$9,0\pm0,08^{Ca}$
CL-LAB	$9,0\pm0,15^{Aa}$	$8,9\pm0,31^{Aab}$	$9,1\pm0,11^{Aa}$	$9,2\pm0,06^{Aa}$
CL	$8,5\pm0,04^{Ab}$	$8,6\pm0,02^{Ab}$	$8,5\pm0,00^{Ab}$	$8,5\pm0,03^{Ab}$

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

4.9.5 Küf ve Maya Sayısı

Depolama boyunca beyaz ve kaşar peynir örneklerinde küf ve maya tespit edilmemiştir. Önceki yapılan çalışmalarda 6 aylık depolama boyunca peynirlerde maya ve/veya küf tespit edilememiş olup, Lazárková vd., (2021) yapmış olduğu çalışma sonuçları ile uyumludur. Maya ve küf gelişimine etki eden faktörlerden bazıları peynirlerin üretiminde hijyen kurallarına uyulması, kullanılan koruyucu starter kültürler, peynirlerin paketlenmesi ve muhafaza koşullarıdır. Araştırmacılar tarafından LAB'nin ürettikleri laktik asit, asetik asit, bakteriyosin, H_2O_2, formik asit, propiyonik asit, diasetil, reuterin gibi bileşenler ile antifungal özellik gösterdiği bildirilmiştir (Schnürer ve Magnusson, 2005; Hassan ve Bullerman, 2008). Aynı zamanda küfler obligat aerobdurlar (Gün vd., 2009). Peynirlerin vakum paketlenmiş olması peynirde küf gelişimini çok yavaşlattığı ve küf ve maya gelişiminin olmadığı tespit edilmiştir.

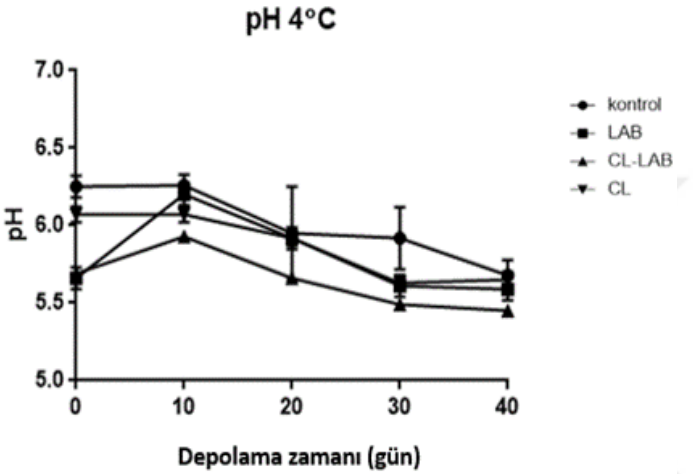
4.10 Peynir Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

4.10.1 Kaşar ve Beyaz Peynir Örneklerinin pH Değerleri

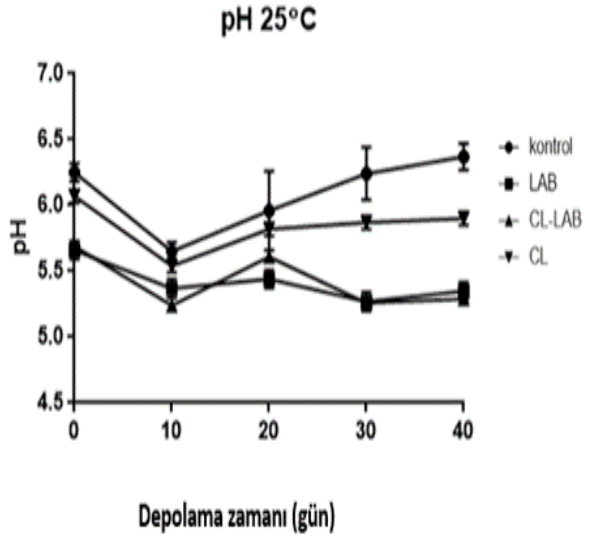
Peynirlerin pH değerleri mikrobiyal güvenliğin değerlendirilmesi amacıyla ölçülmüştür. Kaşar peynirine ait depolama boyunca pH değişimi Şekil 4.23 ve 4.24'te verilmiştir. Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında pH değişimi 5,45–6,25 arasındadır. 4°C'de depolanan kaşar peynir numunelerinde benzer bir pH ve pH düşüş profili gözlemlenmiştir, ancak 25°C'de depolama süresince LAB ve CL-LAB gruplarından farklı olarak kontrol ve CL grubu Kaşar peynir örneklerinde pH düşüşü gözlenmemiştir. Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında pH değişimi 5,24–6,37 arasındadır. *L. plantarum* (Y48) *ve Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları - *L. plantarum* (Y48) *ve Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), ilaveli peynir grubunda ise 10. günden sonra düşüş olmasının sebebi; LAB ilk on günde ortam adaptasyon sürecinde olduğu için gelişememiş olması, 10. günden sonra ise gelişmeye başlayarak asitliği arttırması sonucunda pH'da dikkate değer bir azalış söz konusu olmuştur ($p<0,05$).

Kaşar peynirlerinin 25°C depolama boyunca kontrol 20. güne kadar pH'da düşüş gözlemlenirken daha sonraki depolama boyunca pH değerlerinde artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). *L. plantarum* (Y48) *ve Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli peynirde 20. günden sonra pH'da düşüş gözlemlenmiştir. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli peynirin pH değerlerinde depolama boyunca artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kaşar peyniri örneklerinin pH değerleri önceki yapılan çalışmalara benzer bulunmuştur (Balkır ve Metin, 2011; Siçramaz vd., 2022). Sonuçlar değerlendirildiğinde peynir örnekleriyle *L. plantarum* (Y48) *ve Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), ilaveli kaşar peynirin benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Eritme tip peynirlerinin de yapısını, tadını ve raf ömrünü etkileyen faktörlerin başında pH gelmektedir. *Clostridium* türlerinin toksin üretimi ve gelişimini engellemek için gerekli olan su aktivitesi ve pH (a_w 0,95 ve pH 5,5) altındadır (Ter Steeg ve Cuppers, 1995). Araştırmacılar, 10^4 kob g^{-1} *Clostridium* sporlarının 30 gün içinde gelişebilmesi için ortam pH'nın minimum 4,65; optimum 5,8; maksimum 7,3 olması gerektiğini bildirmişlerdir (Bergère ve Hermier, 1970). Yapmış olduğumuz çalışma ile optimum pH aralığı benzerlik göstermektedir.

Belirtilen pH aralığında hem *Clostridium* sporların hemde vejetatif *Clostridium*'ların gelişimi için uygun olduğu belirlenmiştir. González ve Zárate (2015) yapmış olduğu çalışmada *Cl. sporogenes*'e karşı *L. plantarum*'u incelemiş, *Cl. sporogenes* sporları ile kontamine edilmiş peynirlerin pH değerleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ávila vd., (2020) *Cl. tyrobutyricum* sporları ile kontamine edilmiş peynirlerin pH değerleri ile CL-LAB ile yapılan peynir sonuçları benzerlik göstermektedir.



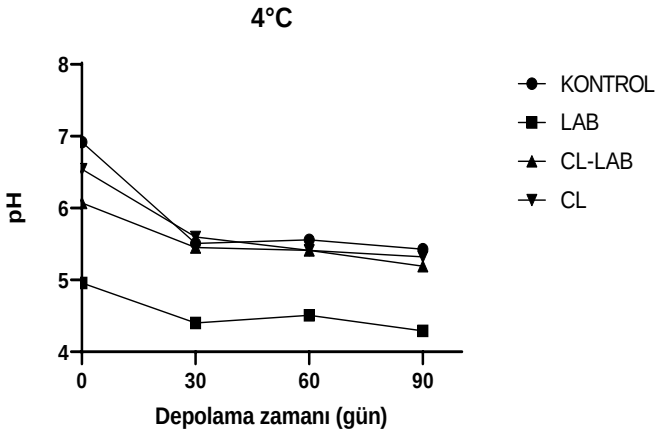
Şekil 4.23 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında pH değişimi.



Şekil 4.24 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında pH değişimi.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

Beyaz peynirlere ait depolama boyunca pH sonuçları Şekil 4.25'de verilmiştir. Beyaz peyniri depolama sırasında pH değişimi 4,29-6,92 arasındadır. Beyaz peynir örneklerin pH değerleri incelendiğinde tüm örneklerde depolama boyunca azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu artış istatistiksel olarak da önemli ($p<0,05$) düzeydedir. Kontrol grubu peynirlere kıyasla daha yüksek başlangıç pH'ı nedeniyle LAB, CL-LAB ve CL ilaveli peynirlerin etkisi ve doğal mikrobiyota veya SLAB'nin laktoz üzerindeki etkisi, depolama sırasında kontrol peynir grubunda hızlı bir düşüş görülmüştür. Peynir gruplarının arasındaki pH farkları LAB ilaveli ve kontrol peynir grubunda yapılan peynirde önemli farklılıklara neden olmuştur. Kontrol grubunun pH değerleri Hayaloglu vd., (2005) yapmış olduğu çalışmada startersiz üretmiş olduğu beyaz peynir ile benzerlik göstermektedir. Matijašić vd., (2007) yapmış olduğu çalışmada peynirlerde yüksek pH değerlerinin, *Cl. tyrobutyricum*'un metabolik aktivitesinden kaynaklandığını bildirmiştir. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli peynirlerde pH değerlerinin yüksek olmasını açıklaması olabilir. Ávila vd., (2020), Gómez-Torres vd., (2014)'te yapmış oldukları çalışmada *Cl. tyrobutyricum* sporları ile yapmış olduğu peynirin pH değerleri benzerlik göstermektedir. González ve Zárate (2015) yapmış olduğu çalışmada *Cl. sporogenes*'e karşı *L. plantarum*'u incelemiş, spor ilaveli peynirlerin pH değerleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.25 Beyaz peyniri depolama sırasında pH değişimi.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

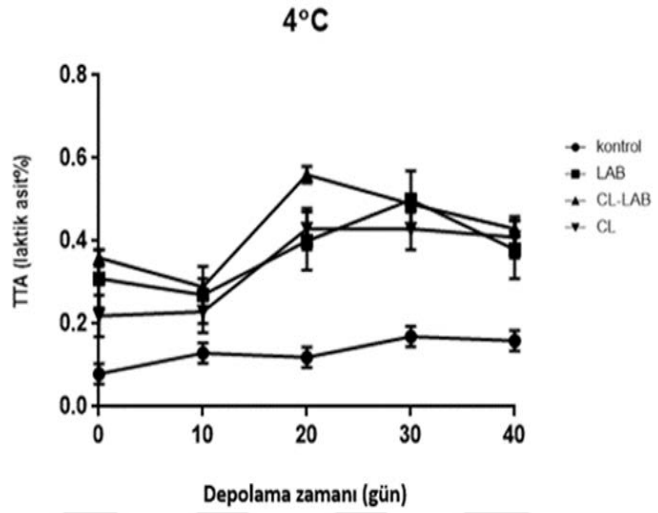
4.10.2 Kaşar ve Beyaz Peynir Örneklerinin Titre Edilebilir Asitlik Değerleri

Kaşar peynirinin depolama boyunca titrasyon asitliği Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de verilmiştir. Kaşar peynirlerinde depolama boyunca 4°C'de %TTA değerleri %0,16–%0,50 arasındadır. 4°C'de kontrol grubu kaşar peyniri örneklerinin asitlik derecesi artarken, diğer peynir gruplarında değişim olduğu gözlemlenmiştir. TTA değerleri için, kontrol kaşar peynir grubunun 4°C'deki TTA değerlerinin diğer gruplardan ayrılması, pastörizasyon koşulları altında canlılığı devam eden peynir mikrobiyotanın peynir matrisinde istenen organik asitleri üretemediğini düşündürmektedir. Ancak sıcaklığın etkisi bu mikrobiyotanın TTA değerlerindeki rolünü telafi ettiği ve kontrol grubunun TTA'sı 4°C'de depolanan kaşar peynir örnekleri için en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Depolama sıcaklığının titre edilebilirlik asitlik üzerine etkisinin dikkate değer etkisi olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Genel olarak 25°C'de depolanan kaşar peynir örneklerinin TTA değerleri depolama süresince birbirine yakın aralıklarda (%0,6-%0,99) bulunmuştur ($p>0,05$). Kaşar peyniri örneklerinin %TTA değerleri önceki yapılan çalışmalara benzer bulunmuştur (Balkır ve Metin, 2011) ve daha da önemlisi, bu değerlerin CL-LAB ilaveli gruplar arasındaki benzerliği, test edilen suşların antiklostridial aktivitesinin peynirden kaynaklandığı gerçeğini bakteriyosin üretim yeteneği gibi test edilen kültürlerin aktivitesi de desteklemektedir.

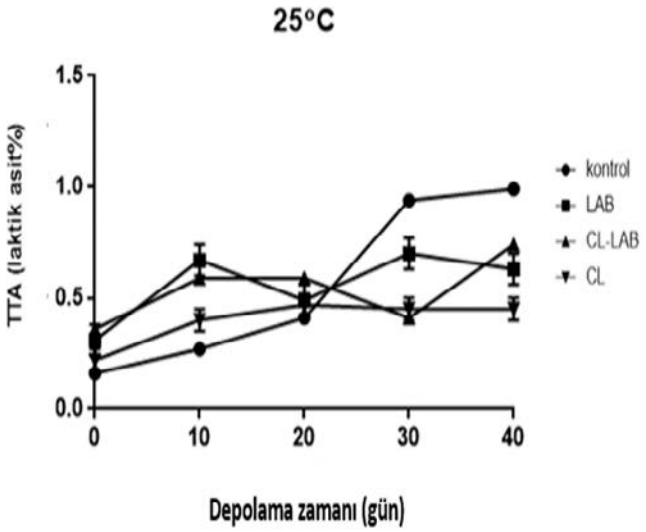
Peynirlerin üretim aşaması ve sonrasında depolama süresince titrasyon asitliği peynirin lezzet, tekstür ve kalitesi üzerinde önemlidir. Kaşar peynirlerinde 4°C'de yapılan çalışmalar ile %TTA benzerlik göstermektedir (Tunçtürk vd., 2010). Ancak sonuçlar değerlendirildiğinde, bu çalışmada 25°C'de depolamanın piyasadan toplanan kaşar peynir örneklerinin laktik asit sonuçlarının diğer araştırmacıların bulgularından bir miktar daha yüksek olduğu görülmüştür. Uygun olmayan sıcaklıklarda muhafaza edilen peynirlerde titrasyon asitliğinin artacağı görülmüş olup 4°C'de soğuk zincir kırılmadan muhafaza edilmesi gerektiği görülmüştür.

Hayaloglu (2009)'da geleneksel yollarla yapılan 12 adet kaşar peynirini incelemiştir. Peynirin titrasyon asitliği değerlerinin %0,47–%1,06 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Kaşar peyniriyle yapılan araştırmalarda da olgunlaşma boyunca titrasyon asitliği değerinin arttığı bildirilmiştir (Yaşar, 2007). Kaşar

peynirlerinin titre edilebilir asitlik değerleri genel olarak olgunlaştırma boyunca tüm peynirlerde artmıştır. Olgunlaştırma süresi boyunca kaşar peynirlerinde titre edilebilir asitlik değerinin arttığını bildiren çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Say, 2008).



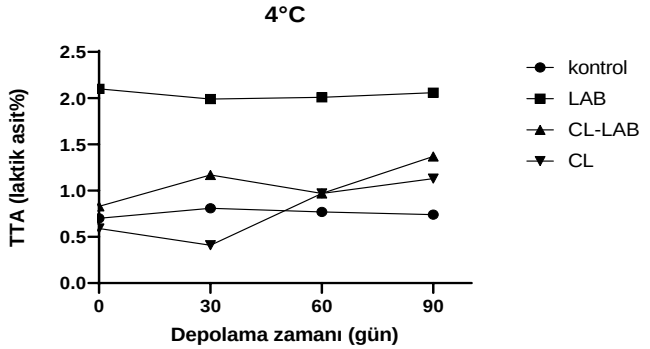
Şekil 4.26 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında titre edilebilir asitlik (%) değişimi.



Şekil 4.27 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında titre edilebilir asitlik (%) değişimi.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

Beyaz peynirlere ait depolama boyunca %TTA değişimi Şekil 4.28'de verilmiştir. Beyaz peynirlere ait depolama boyunca %TTA %0,41–%2,10 arasındadır. LAB ilaveli peynir grubunun %TTA değerleri Hayaloglu vd., (2005) yapmış olduğu çalışmada *Lc. lactis* ssp. *lactis* NCDO763 ve *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ilaveli ürettiği beyaz peynir ile sonuçlar benzerlik göstermektedir. Depolama boyunca %TTA değerlerinin düzen içinde değişiklik göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Depolama boyunca farklı zamanlarında beyaz peynir örnekleri arasında önemli değişiklik olmaması ilk gün ve son gün %TTA bakımından örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Yapılan bir çalışmada yumuşak peynirlerin olgunlaşması aşamasında fermentasyonu takiben laktozun laktik asite dönüşmesi ilk etapta hızlı, sonrasında laktozun azalışıyla yavaşladığı tespit edilmiştir (Topçu, 2004). Depolama analizlerinde titrasyon asitliğindeki değişiklikler depolama aşamasında proteoliz olayından kaynaklı bazik karakterli maddelerin oluşumundan ve kuru madde miktarındaki değişimlerden olduğu öngörülmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda taze beyaz peynirlerde %TTA değerlerinin %0,82 ve %1,31 arasında olduğu saptanmıştır (Gürsoy vd., 2001). Olgun beyaz peynirlerde ise bu değerler %0,86-%2,40 arasında saptanmıştır (Öner vd., 2006). Bu bilgiler çalışmamızda ürettiğimiz beyaz peynirlerin %TTA değerlerinin diğer araştırmacıların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.



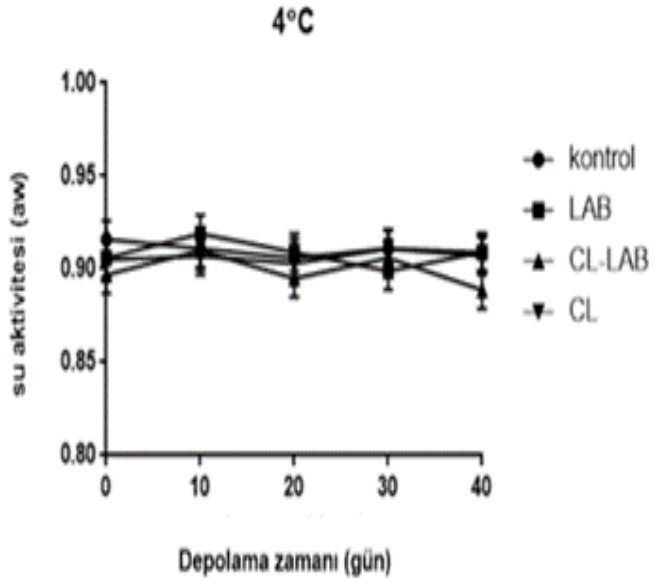
Şekil 4.28 Beyaz peynirlerin depolama sırasında titre edilebilir asitlik (%) değişimi.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

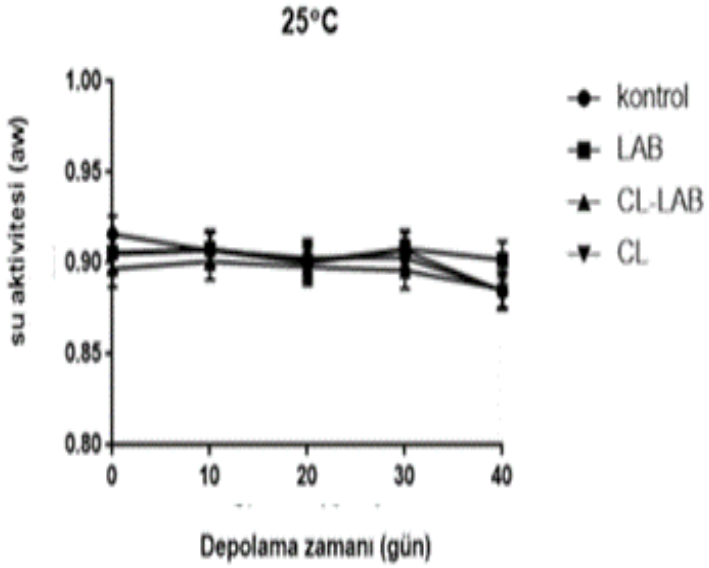
4.10.3 Kaşar ve Beyaz Peynir Örneklerinin Su Aktivitesi Değerleri

Kaşar peynirinin su aktivitesi (a_w) her iki depolama sıcaklığında da her grup için belirlenmiştir ve su aktivitesi değerlerinin değişimi Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da verilmiştir. Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında su aktivitesi değişimi 0,90-0,92 arasındadır. Farklı gruplardaki kaşar peynir örneklerinin depolama süresi boyunca a_w değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$). Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında su aktivitesi değişimi 0,89-0,92 arasındadır. Ancak 25°C depolama boyunca tüm peynir gruplarında su aktivitesi azaldığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). Depolamayla su aktivitesi değerinde azalma olduğu tespit edilmişir. Bulgularımız, kaşar peyniri örneklerinin a_w değerlerinin, daha önce diğer yarı-sert ve sert peynirler için tartışıldığı gibi *Clostridium* spp. sporlarının gelişimi için uygun koşullarda olduğunu ortaya koymuştur (Malacarne vd., 2009; Silvetti vd., 2018).

Todaro vd., (2018) yapmış olduğu çalışmada pasta filata peynirlerinde ambalaj materyallerinin değişmesinin mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve duyusal özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmalarında peynirlerin depolama esnasında su aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Su aktivitesindeki bu azalmayı (McSweeney ve Sousa, 2000), protein ağının parçalanmasıyla proteoliz olayının meydana geldiğini aynı zamanda serbest kalan karboksil ve amino gruplarının suyun bağlanmasına neden olduğu şeklinde açıklamıştır. Peynirde tuz konsantrasyonunun artması su kaybının azalmasına neden olacağı için su aktivitesinin azalacağı bilinmektedir. Su aktivitesinde oluşan bu düşüşün peynirlerin depolanmasında kuru madde artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. Gómez-Torres vd., (2014) yapmış olduğu çalışmada su aktivitesi değerleri tezdeki veriler ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.29 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında su aktivitesi değişimi.

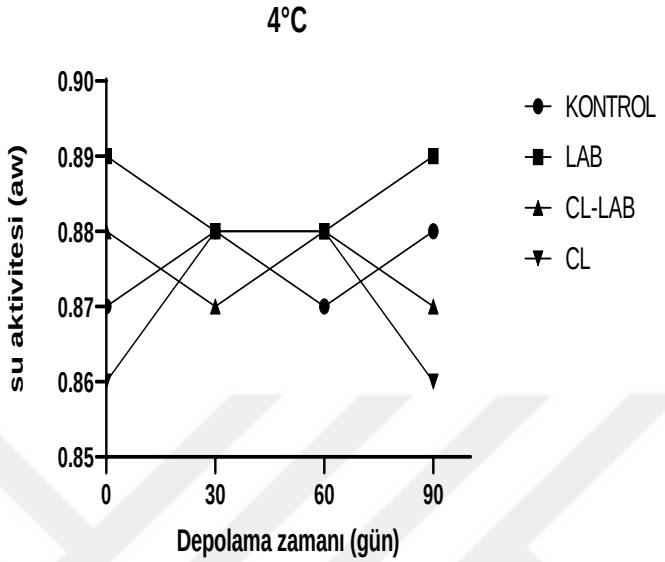


Şekil 4.30 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında su aktivitesi değişimi.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

Beyaz peynirinin su aktivitesi (a_w) değerlerinin değişimi Şekil 4.31'de verilmiştir. Genel olarak, düşük a_w değerleri mikrobiyal gelişmeyi engellediği bilinmektedir (Hickey vd., 2013). Beuchat (1981) yaptığı çalışma ile, çoğu gıda maddesinin su aktivitesinin 0,6'nın altında olduğu zaman, mikrobiyal gelişme için etkin kontrolü sağladığını bildirmiştir. Bu çalışmada, dört peynir grubunda da gözlemlenen a_w

değeri (0,86–0,91), bu tür gıdalar için literatürde bildirilen değerlerle tutarlıdır (Beuchat, 1981). Ancak, her grup içinde farklılıklar önemsizdir. Beyaz peynir örneklerinin su aktivitesi değerleri birbirine benzer bulunmuştur ($p>0,05$).



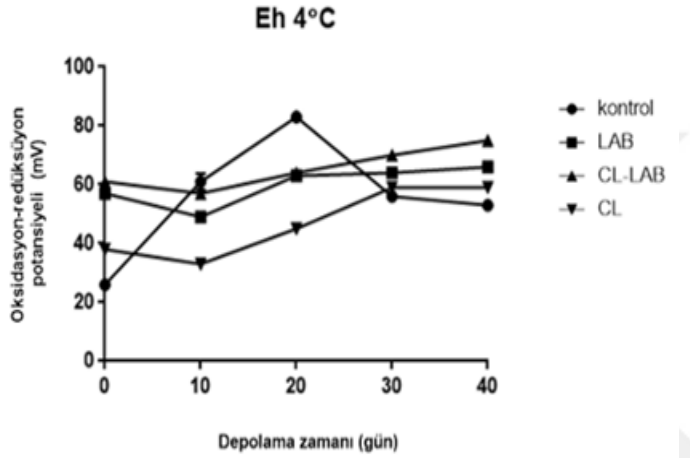
Şekil 4.31 Beyaz peynirlerinin depolama sırasında su aktivitesi değişimi.

Not:*Kontrol: (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

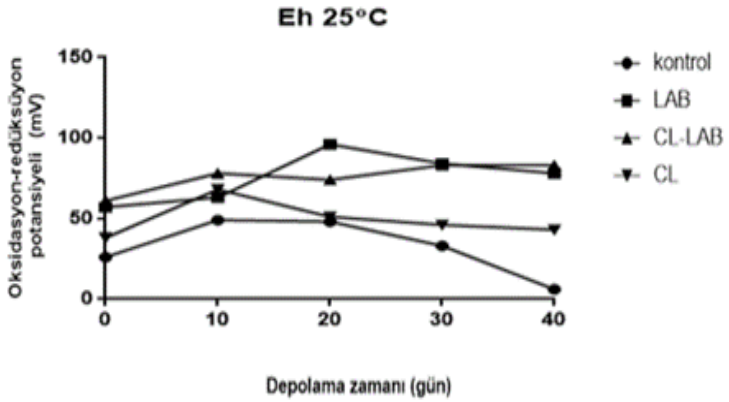
4.10.4 Kaşar Peynirinin Redoks Potansiyeli Değerleri

Kaşar peyniri örneklerinin depolama süresince oksidasyon-redüksiyon potansiyeli değerlerinin değişimi Şekil 4.32 ve 4.33'te verilmiştir. Sonuçlar oksidasyon-redüksiyon potansiyeli (ORP, mV) olarak verilmiştir. Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında oksidasyon redüksiyon arasında 26±0,07-83±0,28 değişmiştir. Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında oksidasyon redüksiyon 6±0,14-83±1,13 arasında değişmiştir Depolama boyunca tüm gruplarda redoks potansiyelinde artış gözlemlenirken, 25°C'de depolamada kontrol grubu peynirin redoks potansiyelinde düşüş gözlemlenmiştir. Peynirlerin E_h değerlerinin 4°C'de depolama süresiyle artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sonuçlar ile depolama sıcaklığının önemi bir kez daha vurgulanmıştır. LAB'nin redoks değerlerinin değişimine ve bu değişikliğinde ürün özelliklerinde değişikliklerin meydana gelebileceği başka çalışmalarda açıklanmıştır (Brasca vd.,

2007). Farklı gruplardaki kaşar peyniri örneklerinin depolama süresi boyunca E_h değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$). 25°C'de depolanan kontrol peynir örneği E_h için de önemli bir değişiklik gözlenmiştir($p<0,05$). Ancak 20 günlük depolamadan sonra kaşar peynirinin E_h değeri azalmaya başlamıştır ve 0 mV'a ulaşmıştır. Bulgularımız, kaşar peyniri örneklerinin E_h değerlerinin, daha önce diğer yarı-sert ve sert peynirler için tartışıldığı gibi *Clostridium* spp. sporlarının gelişimi için uygun koşullarda olduğunu ortaya koymuştur (Malacarne vd., 2009; Silvetti vd., 2018).



Şekil 4.32 Kaşar peynirlerinin 4°C'de depolama sırasında oksidasyon redüksiyon potansiyeli değişimi.

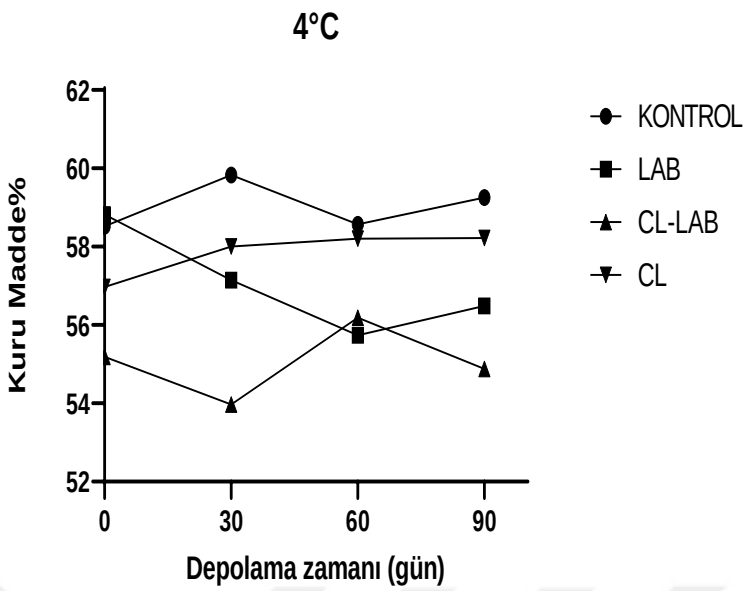


Şekil 4.33 Kaşar peynirlerinin 25°C'de depolama sırasında oksidasyon redüksiyon potansiyeli değişimi.

Not: *Kontrol (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

4.10.5 Beyaz Peynir Örneklerinin Kuru Madde Miktarı

Beyaz peynir örneklerinin depolama süresince kuru madde miktarları Şekil 4.34'te verilmiştir. Beyaz peynirin %kuru madde içeriği %51,49-%61,82 arasında değişmiştir. Depolama sırasında LAB ilaveli beyaz peynir grubu depolama boyunca %kuru madde içeriği azalmasına rağmen, depolama sırasında diğer peynir örneklerinin %kuru madde miktarında ciddi bir değişiklik gözlenememiştir Ancak kontrol, CL, CL-LAB ilaveli örnekler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Toplam kuru madde değerleri, örneklerin ilk günkü toplam kuru madde değerlerinin birbirlerine çok yakın olduğu görülmektedir. Depolama sürecince peynirde gözlemlenen nem içeriğindeki değişiklikler; peptit bağlarının kırılması, peptitlerin su bağlama kapasitelerinin artması veya çözünür nitrojenin proteoliz yoluyla tuzlu suya difüzyonu ve tuzlu suyun peynire difüzyonu ile nem içeriğindeki artıştan kaynaklanabileceği önceki çalışmalarda açıklanmıştır (Hayaloglu vd., 2002). Yaman vd., (2022)'de yapmış olduğu çalışmada beyaz peynirin en yüksek nem içeriği %60,03 olarak belirlenmiştir. Tezde yapılan çalışmada en yüksek nem içeriğinin %61,82 olduğu tespit edilmiştir yapılan iki çalışma değerlendirildiğinde sonuçlar benzerlik göstermektedir. Gómez-Torres vd., (2014); Havlíková vd., (2018) yapmış oldukları çalışmada %kuru madde miktarları tezdeki veriler ile benzerlik göstermektedir. Genel olarak, çoğu peynir çeşidi için tanımlanmış spesifikasyonlar vardır. %kuru madde gibi çeşitli bileşim parametreleri, optimum peynir kalitesini yansıtmaktadır. Pıhtı sineresi nedeniyle depolama sırasında LAB ilaveli peynir grubunda kuru madde içeriğinin azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte, peynirler arasında kuru madde değerleri arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$), farklılığın olmaması *Clostridium* metabolizmasının peynirin bu özelliğini etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.34 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinin kuru madde değerleri(%).

Not: *Kontrol (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

4.10.6 Renk Özellikleri

Gıdaların seçiminde renk parametreleri önemli özelliklerden biridir. Peynirlerin L*, a* ve b* renk parametre değerleri Tablo 4.24'te verilmiştir. L* değeri peynirlerin parlaklığı hakkında bilgi vermektedir. Peynir örneklerinin parlaklık (L*) değerleri 81,42 ile 89,87 arasında değişmiştir. Kontrol peynir grubuna göre *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) ilaveli ve *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4)- *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli peynirlerin parlaklık değerleri istatistiksel olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) ilaveli peynir örneklerinde parlaklık değerlerini kontrole göre azalttığı ve azalışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Sarılık (a*) değeri peynirlerin kırmızılık değerini göstermekte olup -1,94 ile-2,78 arasında değişim göstermiştir. Depolama sırasında kuru madde içeriğinin artması nedeniyle peynirlerin L* ve a* parametreleri (LAB ilaveli peynir hariç) sayısal olarak azalmıştır ve b* değerlerinin peynir depolama sırasında sayısal olarak arttığı belirlenmiştir. ($p<0,05$). Kırmızılık (b*) değeri peynir örneklerinin sarılık değerini

göstermekte olup bu değerler 10,28 ile 16,08 arasında değişkenlik göstermiştir.- Tüm peynirler b* parametresi için sarı yönde pozitif değerler göstermiştir, tüm peynirler için a* değerleri yeşilimsi yönde negatiftir. LAB ilaveli beyaz peynir numunesinde depolama ile a* değerinin artış göstermesi yeşilimsi rengin arttığı sonucuna varılmıştır. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarının ilavesinin peynirlerin sarılık değerleri üzerinde önemli bir etkisi olmuştur ($p<0,05$). Peynir örneklerinin 90 günlük depolama periyodu sonunda L*, a* ve b* değerleri farklılık göstermiş olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Depolamanın ilk gününde ve depolama sonunda örnekler arasında da L*, a* ve b* değeri açısından istatistiksel olarak değişiklik olduğu ($p<0,05$) anlaşılmıştır. Avila vd., (2008), Gómez-Torres vd., (2014) ve Garde vd., (2016), yapmış oldukları çalışma ile renk özellikleri benzerlik göstermiştir. Kontrol peynir grubu ve *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ile kontamine edilmiş peynirler arasında b* parametresi ve renk doygunluğu veya Chroma (C) için önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Peynirin fiziksel özellikleri (yani gövde/tekstür, erime/esneme ve renk) peynir sütünün ilk bileşiminden, üretim prosedürlerinden ve depolama şartlarından etkilenmektedir. Tüm bu özellikleri etkileyen peynirde var olan kazein partikülleri ve proteoliz derecesi (pH gelişimi, sıcaklık ve iyonik güç gibi çeşitli çevresel koşullar) en önemli iki faktördür (Singh vd., 2003). pH'nın özellikle peynir dokusundaki rolü önemlidir, çünkü pH'daki değişiklikler peynir pıhtısının kazein ağındaki kimyasal değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (Singh vd., 2003) ve peynir mikro yapısı da peynir rengini etkileyebilmekedir. *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilave edilmiş suşları ile yapılan peynirlerde kaydedilen yüksek pH değerleri, muhtemelen peynir protein ağının modifikasyonundan ve bu peynirlerin farklı renklerinden sorumludur. Marchesseau vd., (1997) yapmış olduğu çalışma ile peynir üretimi aşamasında pH 5,7'ye yükseltildiğinde, peynir mikro yapısının oldukça bozuk bir yapıdan homojen ve yoğun bir ağ yapısına dönüştüğü tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile daha yoğun kazein matriks mikro yapısına sahip peynirlerin daha düşük hafiflik ve artan Chroma gösterdiği doğrulanmıştır.

Tablo 4.24 Depolama süresinde beyaz peynir örneklerinin renk değerleri.

	L*	a*	b*
Peynir örnekleri		**0. Gün**	
KONTROL	89,25±0,34^{Aa}	-2,20±0,10^{Ab}	10,35±0,39^{Da}
LAB	89,87±0,49^{Aa}	-2,01±0,16^{Aab}	10,28±0,63^{Ba}
CL-LAB	87,46±0,13^{Ab}	-1,94±0,18^{Aa}	11,02±0,40^{Ca}
CL	87,58±0,34^{Ab}	-2,03±0,09^{Aab}	10,83±0,21^{Ba}
		30. Gün	
KONTROL	83,92±0,84^{Ba}	-2,33±0,09^{ABb}	13,52±0,70^{Bbc}
LAB	83,10±0,56^{Ba}	-2,21±0,14^{ABab}	13,95±0,44^{Aab}
CL-LAB	83,03±0,90^{Ba}	-2,03±0,17^{Aa}	14,77±0,52^{Ba}
CL	81,42±1,55^{Cb}	-2,22±0,15^{Aab}	12,98±0,38^{Ac}
		60. Gün	
KONTROL	82,10±1,03^{Cb}	-2,58±0,11^{Cbc}	14,71±0,75^{Ab}
LAB	83,01±0,58^{Bab}	-2,42±0,14^{Bb}	14,86±0,61^{Ab}
CL-LAB	83,13±1,36^{Bab}	-2,78±0,07^{Cc}	16,08±0,06^{Aa}
CL	84,17±0,13^{Ba}	-2,21±0,12^{Aa}	13,85±0,30^{Ac}
		90. Gün	
KONTROL	83,43±0,41^{Ba}	-2,48±0,13^{BCb}	12,47±0,45^{Cc}
LAB	82,61±0,43^{Bb}	-1,98±0,28^{Aa}	14,06±0,54^{Aab}
CL-LAB	82,88±0,48^{Bab}	2,38±0,25^{Bab}	15,09±0,53^{Ba}
CL	82,65±0,28^{Cb}	-2,18±0,31^{Aab}	13,73±1,12^{Abc}

Farklı büyük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı üründe depolamaya bağlı olarak istatistiksel bir farklılık olduğunu, farklı küçük harfle işaretlenmiş ortalamalar aynı günde ürünler arasında istatistiksel bir farklılık olduğunu gösterir ($p<0,05$).

Not: * Kontrol (starter/koruyucu kültürsüz), *LAB: Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL-LAB: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ve Laktik Asit Bakterileri *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) ilaveli, *CL: *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları ilaveli

.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında toplam 18 farklı peynir örnekleri izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Toplanan 18 peynir ve 3 yem örneğinden gaz çıkışı 15 örnekte gözlemlenmiştir. 350 farklı koloni morfolojisine sahip izolat seçilmiş ve saflaştırılmıştır. İzolatlara Gram boyama, katalaz testi ve spor boyama uygulanmıştır. Gram (+), katalaz (-) ve spor oluşturan 83 muhtemel *Clostridium* izolatının stok kültürleri alınmıştır. *Cl. sporogenes* (6 adet), *Cl. tepidium* (3 adet) ve *Cl. botulinum* (1 adet) izole edilmiştir. Tez kapsamında yerel peynirlerde geç şişme kusuruna neden olan *Cl. sporogenes* varlığının baskın olduğu takiben *Cl. tepidium* suşlarının var olduğu ortaya konulmuştur.

LAB'nin antiklostridial aktiviteleri *in vitro* olarak test edilmiştir. *Clostridium*'lara karşı en yüksek inhibisyon etkisi gösteren zon çapı 8±1,73 mm olan *L. plantarum* (Y48) ve zon çapı 9±1,90 mm olan *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K), peynir üretiminde koruyucu starter olarak seçilmiştir.

Bağırsak patojeni olarak bilinen *E. coli* BC 1402 (P12), *B. cereus* BC 6830 (P60), *S.* Typhimurium RSSK 95091 (P78), ve *S. aureus* ATCC 25923 (P94)'e karşı *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K)'nin inhibisyonları incelenmiştir. Denemelerde kullanılan indikatör mikroorganzimalara karşı 15±0,5 ile 20±0,5 mm arasında değişen çaplarda antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Peynir yapımında koruyucu kültür olarak kullanılacak mikroorganizmaların patojen mikroorganizmaları inhibe edebilmesi en önemli olması tez için önem arzetmekedir.

Bakteriyosin ve benzeri maddeleri tespit etmek amacıyla, *M. luteus* DSM1790'a karşı LAB'nin antagonistik etkileri incelenmiştir. Bakterilerin birbirlerine olan etkisi öncelikle agar kuyucuk metodu denenmiş ancak zonların belirginliği az olduğu için disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında 37 adet LAB'nin bakteriyosin üreticisi olup olmadığı ve aktivite kontrollerinin belirlenmesi sonucu indikatör bakteriye karşı aktivite gösterdiği tespit edilen 15 LAB'nin muhtemel bakteriyosin üreticisi olabileceği düşünülmüştür. 22 LAB'nin inhibisyonun diğer etkenlerden kaynaklandığı ve seçilen kültürler tarafından

bakteriyosin ve benzeri maddeler üretilmediği sonucuna ulaşılmıştır. *L. plantarum*; (Y32K, Y43B, Y43K, Y48B, Y48, Y51B, Y51K), *Leu. mesenteroides*; (Y35K, Y54K) *St. thermophilus*; (Y127K), *Lc. lactis*; (PY81K, PY82B, PY83K, PY91B, PY91K) inhibisyon etkisi olan bakterilerin bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddelerin ön karakterizasyonu için farklı pH, farklı sıcaklık ve farklı enzimlerle muamele edilmiştir. Enzimin etkisini belirlemek için tripsin ve proteinaz-K ile muamele edilmiş *M. luteus* DSM1790'a karşı inhibisyon etkisi incelenmiş olup aktivitesini yitirdiği, katalaz enziminden ise aktivitesinin kaybolmadığı tespit edilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde LAB'nin ürettiği bakteriyosinlerin pH 2,0-6,0 değerleri arasında aktivitesini korurken, bazik pH'larda (pH 8,0-12,0) aktivitesinin kaybolduğu, asidik pH'larda ise LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin aktivitelerinin tamamen arttığı diğer LAB'nin ürettiği bakteriyosinlerin ise aktivitelerini koruduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde LAB'nin sadece 3 tanesinin (Y54K, Y48B ve PY83K), 40°C'de ve 60°C 10 dk ısıl işleme dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Süpernatanttaki antimikrobiyal metabolitler; 40, 60, 80 ve 100°C'de 30 dk ısıl işlem kombinasyonları sonunda aktivite gözlemlenememiş ve aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir ve 100°C etki gözlemlenemediği için LAB bakteriyosin üreticisi olarak değerlendirilememiştir.

Seçilen koruyucu kültürlerle *L. plantarum* Y48 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K kaşar ve beyaz peyniri üretimi yapılmıştır. Kaşar peynir üretim aşamasında *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) koruyucu kültürlerden 10^7 kob g^{-1} inoküle edilmiş ve *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları 10^4 kob g^{-1} ilave edilmiştir. Beyaz peynir üretim aşamasında *L. plantarum* (Y48) ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) koruyucu kültürlerden 10^8 kob g^{-1} inoküle edilmiş ve *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporları 10^4 kob g^{-1} ilave edilmiştir. *Clostridium* spp.'nin inhibisyonu için *L. plantarum* Y48 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K'nın etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda Türkiye'de üretimi en fazla olan beyaz peynir ve kaşar peynirlerinde *Clostridium* spp.'yi kontrol etmek için koruyucu starter kültür kullanılmasının başarılı olduğu ortaya konulmuştur. Aynı zamanda, geç şişme

etmeni *Clostridium* türlerinin engellenmesi ve baskılanması açısından peynir yapımında koruyucu starter kültür kullanımının gerekli olduğuna yönelik sonuçlar elde edilmiştir. Koruyucu starter kültür olarak kullanılan LAB izolatlarının 4°C'de 40 günlük depolama süresi boyunca kaşar peynirinde *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) gelişimini kontrol altında tuttuğu, ancak benzer etkinin 25°C'de gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Bulgular, depolama sıcaklığının peynirin mikrobiyal kalitesi için önemli ve *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarının LAB'ler ile kontrolü üzerinde etkili olduğu göstermiştir. Kontrol ve diğer peynir gruplarında pH, TTA, a_w ve E_h açısından benzer fizikokimyasal profillere sahip olduğu belirlenmiştir ve *L. plantarum* Y48 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* PY91K'nın kaşar peyniri ve beyaz peynirde *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4)'i kontrol etmek için inhibitör etkisinin olduğu doğrulanmıştır. LAB ile üretilen kaşar peyniri örneklerinde *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 sporlarında yaklaşık 1 log kob g^{-1}'lik azalma tespit edilmiştir. Aynı şekilde LAB ile üretilen beyaz peynir örneklerinde *Cl. sporogenes* ZMP-1-4 sporlarında 1 log kob g^{-1}'lik azalma tespit edilmiştir.

Peynir üretiminde LAB bakteriyosinin daha geniş kullanımı için, gelecekteki araştırmalar multi-omik (genomik, transkriptomik, proteotomik, metabolomik) yaklaşıma dayanmalıdır. Başka bir deyişle, karmaşık peynir ekosistemini anlamak için bu çalışmalar, LAB ve peynir depolama süresince tek bir bütünleyici sistem olarak yer alan diğer mikrobiyal türlerin genomik ve post-genomik çalışmalarının genler, çevresel koşullar, biyokimyasal yollar, proteinler ve peynir üretimi ve depolanması sırasında meydana gelen metabolitler, mikrobiyal fonksiyonlar ve etkileşimler kombinasyonunu gözardı edilmemelidir.

LAB bakteriyosin ve benzeri maddelerin peynirin duyusal ve besinsel kalitesi üzerine etkisi peynirdeki istenmeyen mikrobiyal türlerin gelişmesinin kontrolünde bakteriyosin üreticisi suşların seçilmesinin önemi bu tezle tekrar vurgulanmıştır. Depolama süreci ve duyusal kalite üzerinde olumlu etkisi olan peynir veya mikrobiyal patojenlerin gelişmesini engelleyebilecek olan yeni bakteriyosinojenik LAB suşlarının seçilmesi ile mümkün olacaktır.

Bu çalışmanın sonuçları peynir üretiminde kullanılan koruyucu starter suşlarının *Cl. sporogenes* (ZMP-1-4) sporlarını önemli düzeyde elimine ettiği, Çalışma

sonucunda peynir kalite parametreleri, analiz sonuçları, göz önüne alındığında koruyucu starter kültür olarak *L. plantarum* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis'in* birlikte kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKÇA

Abgrall, B., Bourgeois, C., and Bourva, F., (1985). "Dénombrement des spores de *Clostridium tyrobutyricum* par filtration sur membrane et culture sur milieu gélosé". *Le Lait*, 65(647-648), 45-53.

Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A., and Sulakvelidze, A,. (2008). "Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7". *Applied and environmental microbiology*, 74(20), 6230-6238.

Adams, M. R., and Moss, M. O., (2008). "Food microbiology (3rd eds.)". Cambridge: *Royal Society of Switzerland*.

Adhikari, A., Yemmireddy, V. K., Costello, M. J., Gray, P. M., Salvadalena, R., Rasco, B., and Killinger, K., (2018). "Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese". *International journal of food microbiology*, 286, 148-154.

Afrin, S., Hoque, M. A., Sarker, A., Satter M. A., and Bhuiyan M., (2021). "Characterization and profiling of bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria from cheese samples". *Access Microbiology*, 3(6).

Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., and Siddiqui, M. U., (2017). "Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1-11.

Alegría, A., Delgado, S., Roces C., López B., and Mayo B., (2010). "Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk". *International journal of food microbiology*, 143(1-2), 61-66.

Alichanidis, E., (2007). "Cheeses ripened in brine". Cheese problems solved, 330-342.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., and Kuipers, O. P., (2016). "Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951.

Anastasiou, R., Aktypis, A., Georgalaki, M., Papadelli, M., De Vuyst, L., and Tsakalidou, E., (2009). "Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening". *International dairy journal,* 19(5), 330-335.

And, H. C., and Hoover, D. G., (2003). "Bacteriocins and their food applications". Comprehensive reviews in food science and food safety, 2(3), 82-100.

AOAC, H. W., (2000). "International A: Official Methods of Analysis of the AOAC International". *The Association: Arlington County*, VA, USA.

Aureli, P., Franciosa, G., and Scalfaro, C., (2011). *Clostridium* spp. V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4. Fuquay WJ, Fox FP, McSweeney LHP. In: *London, Academic Press*.

Avila, M., Garde, S., and Nuñez, M., (2008). "The influence of some manufacturing and ripening parameters on the colour of ewes' milk cheese". *Milchwissenschaft,* 63(2), 160-164.

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., and Garde, S., (2014). "Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species". *International journal of food microbiology*, 172, 70-75.

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Gaya, P., and Garde, S., (2020). "Effect of a nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*". *International Journal of Food Science & Technology*, 55(10), 3343-3349.

Aydemir, O., Harth, H., Weckx, S., Dervişoğlu, M., and De Vuyst, L., (2015). "Microbial communities involved in Kaşar cheese ripening". *Food microbiology*, 46, 587-595.

Babić, M., Pajić, M., Nikolić, A., Teodorović, V., Mirilović, M., Milojević, L., and Velebit, B., (2018). "Expression of toxic shock syndrome toxin-1 gene of *Staphylococcus aureus* in milk: Proof of concept". *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka,* 68(1), 12-20.

Baker, G.C., Smith, J. J., and Cowan, D. A., (2003). "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers". *Journal of microbiological methods,* 55(3), 541-555.

Balkır, P., and Metin, M., (2011). "Physicochemical and textural properties of imitation fresh kashar cheeses prepared from casein, caseinates and soy protein". *Gıda,* 36(1), 17-24.

Banks, J.M., (2007). "Ultrafiltration of cheesemilk". Cheese problems solved, 30e33.

Barbosa-Cánovas, G., and Bermúdez-Aguirre, D., (2010). Other novel milk preservation technologies: ultrasound, irradiation, microwave, radio frequency, ohmic heating, ultraviolet light and bacteriocins. In Improving the safety and quality of milk (pp. 420-450): *Elsevier*.

Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S., and Cocconcelli, P. S., (2013). "TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese". *International dairy journal,* 33(1), 75-82.

Bassi, D., Puglisi, E., and Cocconcelli, P.S., (2015). "Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect". *Food microbiology*, 52, 106-118.

Beresford. T., (2007). "55 What factors affect microbial growth in cheese?". Cheese problems solved, 119

Beresford T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L, and Cogan, T. M., (2001). "Recent advances in cheese microbiology". *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274.

Beresford T., and Williams, A., (2004). "The microbiology of cheese ripening". Cheese: chemistry, physics and microbiology, 1, 287-318.

Bergère, J. L., and Hermier, J., (1970). "Spore properties of Clostridia occurring in cheese". *Journal of Applied Bacteriology*, 33(1), 167-179.

Bergere, JL, and Lenoir, J., (2000). "Cheese manufacturing accidents and cheese defects". Cheesemaking: From science to quality assurance(Ed. 2), 477-508.

Bermúdez, J., González, M. J., Olivera, J. A., Burgueño, J. A, Juliano, P., Fox, E. M., and Reginensi, S. M., (2016). "Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants". *Journal of dairy science*, 99(5), 3358-3366.

Beuchat, L. R., (1981). "Microbial stability as affected by water activity [Bacteria, fungi, spoilage]". Cereal Foods World (USA).

Biolcati, F., Ferrocino, I., Bottero, M. T., and Dalmasso, A., (2020). "High-throughput sequencing approach to investigate Italian artisanal cheese production". *Journal of dairy science,* 103(11), 10015-10021.

Blom, H., and Mørtvedt, C., (1991). "Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms". *Biochemical Society Transactions*, 19(3), 694-698.

Bokulich, N. A., and Mills, D. A., (2013). "Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants". *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5214-5223.

Bottazzi, V., (1993). "I batteri lattici nella maturazione del formaggio grana". *L'Industria del latte*, 29(2), 73-88.

Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., and Tamburini, A., (2007). "Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria". *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1516-1524.

Briggiler-Marcó, M, Capra, M. L, Quiberoni, A, Vinderola, G., Reinheimer, J. A., and Hynes, E., (2007). "Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: *in vitro* characterization and performance in two model cheeses". *Journal of dairy science*, 90(10), 4532-4542.

Brovko, L. Y., Anany, H., and Griffiths, M. W., (2012). "Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment". *Advances in food and nutrition research*, 67, 241-288.

Brüggemann, H., and Gottschalk, G., (2009). "Clostridia: molecular biology in the post-genomic era": *Caister Academic Press.*

Burtscher, J., Hobl, L., Kneifel, W., and Domig, K. J., (2020). "Clostridial spore counts in vat milk of Alpine dairies". *Journal of dairy science*, 103(3), 2111-2116.

Cankurt, H., (2015). Bazı bitki aromatik su ve uçucu yağlarının blok tip eritme peyniri ve beyaz peynirin çeşitli özellikleri üzerine etkisi. "*Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü". Doktora Tezi*, Kayseri,

Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., and Loessner, M. J., (2005). "Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301-312.

Carminati, D., Perrone, A., and Neviani, E., (2001). "Inhibition of *Clostridium sporogenes* growth in mascarpone cheese by co-inoculation with *Streptococcus thermophilus* under conditions of temperature abuse". *Food microbiology*, 18(6), 571-579.

Carvalho, F., Duarte, A. P., and Ferreira, S., (2021). "Antimicrobial activity of Melissa officinalis and its potential use in food preservation". *Food Bioscience*, 44, 101437.

Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., and Vignolo, G. M., (2017). "Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments". *Microorganisms*, 5(3), 38.

Cetinkaya, F., and Soyutemiz, G., (2006). "Microbiological and chemical changes throughout the manufacture and ripening of Kashar: a traditional Turkish cheese". *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30(4), 397-404.

Champagne, C. P., Gagnon, D., St-Gelais, D., and Vuillemard, J. C., (2009). "Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions". *International dairy journal,* 19(11), 669-674.

Choi J., In Lee S., Rackerby, B., Frojen, R., Goddik, L., Ha, S.-D., and Park, S. H., (2020). "Assessment of overall microbial community shift during Cheddar cheese production from raw milk to aging". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6249-6260.

Choi K. H., Lee, H., Lee, S., Kim, S., and Yoon, Y., (2016). "Cheese microbial risk assessments-A review". *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(3), 307.

Choyam, S., Srivastava, A. K., Shin, J.-H., and Kammara, R., (2019). "Ocins for food safety". *Frontiers in Microbiology*, 10, 1736.

Christiansen, P., Petersen, M. H., Kask, S., Møller, P. L., Petersen, M., Nielsen, E.W., Ardö, Y., (2005). "Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses". *International dairy journal*, 15(6-9), 901-909.

Cıbık, R., Cetınkaya, F., Ersoy, M., and Yıbar, A., (2010). "Identification and technological characterization of *Lactococcus* isolated from traditional Turkish cheeses". *Revue de Medecine Veterinaire*, 161(11), 509-514.

Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., and Comi, G., (2004). "The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the

microbial ecology of the alteration process". *International journal of food microbiology*, 90(1), 83-91.

Cogan, T. M., and Beresford, T. P., (2002). "Microbiology of hard cheese". Dairy Microbiology Handbook: the microbiology of milk and milk products(Ed. 3), 515-560.

Cosentino C., Elshafie, H. S., Labella, C., D'Adamo, C., Pecora, G., Musto, M., . . . Freschi, P., (2018). "Study on the protective effect of an innovative cow milk-based product against some human skin-bacterial pathogens". *Journal of Biological Research-Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale,* 91(1).

Cosentino C., Paolino, R., Valentini, V., Musto, M., Ricciardi, A., Adduci, F., Freschi, P., (2015). "Effect of jenny milk addition on the inhibition of late blowing in semihard cheese". *Journal of dairy science*, 98(8), 5133-5142.

Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C., (2013). "Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?". *Nature Reviews Microbiology,* 11(2), 95-105.

Coultate, T. P., (2009). "Food: the chemistry of its components": *Royal Society of Chemistry*.

Çon, A. H., and Gökalp, H. Y., (2000). "Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri".

D'Incecco, P., Pellegrino, L., Hogenboom, J. A., Cocconcelli, P. S., and Bassi, D., (2018). "The late blowing defect of hard cheeses: Behaviour of cells and spores of *Clostridium tyrobutyricum* throughout the cheese manufacturing and ripening". *LWT,* 87, 134-141.

Daba, G. M., Mostafa, F. A., Saleh, S. A. A., Elkhateeb, W. A., Awad, G., Nomiyama, T., El-Dein, A. N., (2022). "Purification, amino acid sequence, and characterization of bacteriocin GA15, a novel class IIa bacteriocin secreted by *Lactiplantibacillus plantarum* GCNRC_GA15". *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 651-662.

Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., and Hill, C., (2012). "Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese". *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 58-65.

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(5), 2011-2020.

de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., and Penna, T. C. V., (2009). "Nisin biotechnological production and application: a review". *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4), 146-154.

De Carvalho, A. A. T., Mantovani, H. C., and Vanetti, M. C. D., (2007). "Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp". *Letters in applied microbiology*, 45(1), 68-74.

De Jong, P., (2008). "Thermal processing of milk". *Advanced dairy science and technology,* 1-34.

Deegan L. H.,, Cotter P. D., Hill C., and Ross P., (2006). "Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension". *International dairy journal,* 16(9), 1058-1071.

Delves-Broughton, J., Blackburn P., Evans, R. J., and Hugenholtz, J., (1996). "Applications of the bacteriocin, nisin". *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(2), 193-202.

Demir E., and Basbülbül.G., (2017). "Screening of bacteriocin production in lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products". *Biotechnol J Int*, 18, 1-9.

Demirel, N., and Karapınar, M., (2000). "Süt ürünlerinde *Staphylococcus aureus*". Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı,* Izmir, 78-85.

Driehuis, F., Hoolwerf, J., and Rademaker, J. L. W., (2016). "Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk". *International dairy journal*, 63, 70-77.

Dündar, H., (2006). "Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*".

EFSA, European Food Safety Authority., (2005). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Fluoride. EFSA journal, 3(3), 192.

EFSA, European Food Safety., (2017). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016". EFSA journal, 15(12).

Ercolini, D., (2013). "High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology". *Applied and environmental microbiology*, 79(10), 3148-3155.

Esteban, M., Marcos, P., Horna, C., Galan-Malo, P., Mata, L., Pérez, M. D., Sánchez, L., (2020). "Evaluation of methods for DNA extraction from *Clostridium tyrobutyricum* spores and its detection by qPCR". *Journal of microbiological methods*, 169, 105818.

Euzeby., (2013). UK Standards for Microbiology Investigations: *Inoculation of Culture Media for Bacteriology*. In: Crown London.

Evren, M., Albayram, C., and Apan, M., (2006). "Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler". Türkiye, 9, 24-26.

FAO, OECD., (2020). "Dairy and dairy products". OECD-FAO Agricultural Outlook, 2029, 174-183.

Fernández-Perez, R., Saenz Y.,-Rojo Bezares B., Zarazaga M., Rodríguez J. M., Torres C., Ruiz-Larrea F., (2018). "Production and antimicrobial activity of nisin under enological conditions". *Frontiers in Microbiology*, 9, 1918.

Finegold S. M., Song, Y., and Liu, C., (2002). "Taxonomy—general comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci". *Anaerobe*, 8(5), 283-285.

Flórez, A. B., and Mayo, B., (2018). "Genome analysis of *Lactobacillus plantarum* LL441 and genetic characterisation of the locus for the lantibiotic plantaricin C". *Frontiers in Microbiology*, 9, 1916.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., and Guinee, T. P., (2004). "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects": *Elsevier.*

Freier, D., Mothershed, C. P., and Wiegel, J., (1988). "Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20". *Applied and environmental microbiology*, 54(1), 204-211.

Fricourt, B. V., Barefoot, S. F., Testin, R. F., and Hayasaka, S. S., (1994). "Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish". *Journal of food protection,* 57(8), 698-702.

Furlaneto-Maia L., Ramalho, R., Rocha, K. R., and Furlaneto, M. C., (2020). "Antimicrobial activity of enterocins against *Listeria* spp. and other food spoilage bacteria". *Biotechnology letters*, 42(5), 797-806.

Furtado, D. N, Todorov, S. D., Landgraf, M., Destro, M. T., and Franco, B. D., (2015). "Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese". *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 201-206.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., and Omar, N. B., (2007). "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation". *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.

Garde, S. Arias, R., Gaya, P.r, and Nuñez, M., (2011b). "Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates". *International dairy journal,* 21(4), 272-278.

Garde S., Ávila M., Gaya P., Arias R., and Nuñez M., (2012). "Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect". *International dairy journal*, 25(2), 87-91.

Garde S., Ávila, M., Gómez, N., and Nunez, M., (2013). *Clostridium* in late blowing defect of cheese: detection, prevalence, effects and control strategies. In (pp. 503-518): New York: *Nova Science Publishers*.

Garde S., Ávila M., Arias, R., Gaya, P., and Nuñez, M., (2011). "Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese". *International journal of food microbiology*, 150(1), 59-65.

Garde, S., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., and Ávila, M., (2016). "Influence of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on biochemical, physical and sensory properties of semi-hard ewe milk cheese". *Food research international*, 90, 177-185.

Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., and Degraeve, P., (2016). "Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses". *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(8), 1262-1274.

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., and Garde, S., (2014). "Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct". *Food microbiology*, 42, 82-88.

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Narbad, A., Mayer, M. J., and Garde, S., (2019). "Use of fluorescent CTP1L endolysin cell wall-binding domain to study the evolution of *Clostridium tyrobutyricum* during cheese ripening". *Food microbiology,* 78, 11-17.

Gómez-Torres, N., Garde, S., Peirotén, Á., and Ávila, M., (2015). "Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors". *Food Control,* 56, 186-194.

González, L., and Zárate, V., (2015). "Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture". *Journal of Dairy Research,* 82(2), 236-241.

Goode, D., Allen, V. M., and Barrow, P. A., (2003). "Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages". *Applied and environmental microbiology,* 69(8), 5032-5036.

Goudkov, A. V., and Sharpe, M. E., (1965). "Clostridia in dairying". *Journal of Applied Bacteriology,* 28(1), 63-73.

Gould, G. W., (2006). "History of science–spores: lewis B Perry Memorial Lecture 2005". *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 507-513.

Gök Charyyev, M., Özden Tuncer, B., Akpınar Kankaya, D., and Tuncer, Y., (2019). "Bacteriocinogenic properties and safety evaluation of *Enterococcus faecium* YT52 isolated from boza, a traditional cereal based fermented beverage". *Journal of Consumer Protection and Food Safety,* 14(1), 41-53.

Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., and Lacroix, C., (2008). "Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities". *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 421-444.

Greer, G. G., and Dilts, B. D., (2002). "Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages". *Journal of food protection,* 65(5), 861-863.

Grosu-Tudor, S.S., Stancu, M.M., Pelinescu, D., and Zamfir, M., (2014). "Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria

isolated from fermented foods". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2459-2469.

Guinee, T. P., and O'Kennedy, B. T., (2007). Reducing salt in cheese and dairy spreads. In Reducing salt in foods (pp. 316-357): *Elsevier.*

Gülgör, G., and Özçelik, F., (2014). "Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı". *Akademik Gıda*, 12(1), 63-68.

Gün İ., Güzel-Seydim, Z., and Seydim, A. C., (2009). "Modifiye atmosferde paketlemenin farklı tipteki peynirlerin bazı niteliklerine etkisi". *Gıda*, 34(5), 309-316.

Gürsoy, A., Şenel, E., Gürsel, A., Deveci, O., Karademir, E., and Yaman, Ş., (2001). "Yağ İçeriği Azaltılmış Beyaz Peynir Üretiminde Isıl İşlem Uygulanan *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus bulgaricus* Kültürlerinin Kullanımı". *Gıda*, 26(5).

Halkman K. A., and Doğan H. B., (2000). "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. Baskı". *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları*.

Hampikyan, H., and Çolak, H., (2007). "Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi". *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(2).

Harrigan, W. F., (1998). "Laboratory methods in food microbiology" Gulf professional publishing.

Hassan, Y. I, and Bullerman, L. B., (2008). "Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. tolerans isolated from a sourdough bread culture". *International journal of food microbiology*, 121(1), 112-115.

Havlíková, Š., Kvasničková, E., Kavková, M., and Němečková, I., (2018). "The anticlostridial effect of lactococcal and enterococcal adjunct starters in Dutch-type low-scalded cheese". *International Journal of Dairy Technology*, 71, 107-119.

Hayaloglu, A. A., (2009). "Volatile composition and proteolysis in traditionally produced mature Kashar cheese". *International Journal of Food Science & Technology,* 44(7), 1388-1394.

Hayaloglu, A. A., Guven, M., and Fox, P. F., (2002). "Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'". *International dairy journal*, 12(8), 635-648.

Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H., (2005). "Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish white-brined cheese during ripening". *Journal of dairy science*, 88(10), 3460-3474.

Hernandez D., Cardell, E., and Zarate.V., (2005). "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711". *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 77-84.

Heyndrickx, M., Marchand, S., De Jonghe, V., Smet, K., Coudijzer, K., and De Block, J., (2010). Understanding and preventing consumer milk microbial spoilage and chemical deterioration. In Improving the safety and quality of milk (pp. 97-135): *Elsevier.*

Hickey, D. K., Guinee, T. P., Hou, J., and Wilkinson, M. G., (2013). "Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening". *International dairy journal*, 30(1), 53-58.

Hill, A. R., and Kethireddipalli, P., (2013). Dairy products: cheese and yogurt. In Biochemistry of foods (pp. 319-362): *Elsevier.*

Holzapfel, W. H., Geisen, R., and Schillinger, U., (1995). "Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes". *International journal of food microbiology*, 24(3), 343-362.

Hugas, M., (1998). "Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products". *Meat Science*, 49, S139-S150.

Irlinger F., Layec, S., Hélinck, S., and Dugat-Bony, E., (2015). "Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin". *FEMS microbiology letters*, 362(2), 1-11.

ISO., (1998). 15214. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Mesophilic Lactic Acid Bacteria—Colony-Count Technique at 30 Degrees C. Paper presented at the ICS.

ISO., (2004). ISO 6611: 2004. Milk and milk products—Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds—Colony-count technique at 25 degrees C. In: International Organization for Standardization Geneve, Switzerland.

ISO., (2013). "4833-1 (2013): Microbiology of the food chain-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique". Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland.

ISO., (2015). "TS ISO 7251 Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Muhtemel *Escherichia coli*'nin belirlenmesi ve sayımı için yatay yöntem-En muhtemel sayı tekniği". Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

İspirli, H., Demirbaş, F., and Dertli, E., (2015). "Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut". *Canadian journal of microbiology*, 61(11), 861-870.

İspirli, H., Demirbaş, F., and Dertli, E., (2017). "Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese". *LWT,* 75, 358-365.

İspirli, H., and Dertli, E., (2018). "Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt". *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13351.

İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., and Yıldırım, M., (2008). "Identification and izolation of lactic acid bacterium having antimicrobial activity from traditionaly

produced cheese". *Journal of the Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*.

Ivy, R. A., and Wiedmann, M., (2014). "*CLOSTRIDIUM*: *Clostridium tyrobutyricum*".

Jakobsen, M., and Narvhus, J., (1996). "Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products". *International dairy journal,* 6(8-9), 755-768.

Johnson, M. E., (2001). "Cheese products". *Food Science And Technology*-New York-Marcel Dekker-, 345-384.

Johnson, M. E., (2017). "A 100-year review: cheese production and quality". *Journal of dairy science*, 100(12), 9952-9965.

Jousimies-Somer, H. R., Summanen, P., Citron, D. M., Baron, E. J., Wexler, H. M., and Finegold, S. M., (2002). "Preliminary identification methods". Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual, 55-74.

Jozala, A. F., de Lencastre Novaes, L. C., Cholewa, O., and Penna, T. C. V., (2005). "Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media". *African Journal of Biotechnology*, 4(3), 262-265.

Julien, M. C., Dion, P., Lafreniere, C., Antoun, H., and Drouin, P., (2008). "Sources of clostridia in raw milk on farms". *Applied and environmental microbiology,* 74(20), 6348-6357.

Kable, M. E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J., and Marco, M. L., (2016). "The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility". *MBio*, 7(4), e00836-00816.

Kahraman Ilıkkan, Ö., and Bağdat, E. Ş., (2022). "Metataxonomic sequencing to assess microbial safety of Turkish white cheeses". *Brazilian Journal of Microbiology,* 1-8.

Kalkan, S., Ünal, E., and Erginkaya, Z., (2011). "Bio-control of some food-borne pathogenic bacteria by bacteriophage". *Journal of Food Science and Engineering,* 1(4), 237.

Kamber, U., (2007). "The traditional cheeses of Turkey: cheeses common to all regions". *Food Reviews Internationa*l, 24(1), 1-38.

Kennedy, M. J., Reader, S. L., and Swierczynski, L. M., (1994). "Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life". *Microbiology,* 140(10), 2513-2529.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., and Winn, W. C., (1997). "Diagnostic microbiology". The nonfermentative gram-negative bacilli. Philedelphia: *Lippincott-Raven Publishers,* 253-320.

Koral, G., and Tuncer, Y., (2014). "Nisin Z-Producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GY l32 Isolated from Boza". *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1044-1053.

Kozan, H. İ., (2022). "Farklı probiyotik bakteriler inoküle edilmiş yulaf kepeği ilaveli sucukların depolama sürecinde bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerindeki değişimin belirlenmesi".

Kurt, A., Çakmakçı, S., and Çağlar, A., (2007). "A guide book of analysis methods of milk and milk products. Turkey: Ataturk University". *Agriculture Faculty*, Erzurum, Turkey.

Lazárková, Z., Šopík, T., Talár, J., Purevdorj, K., Salek, R. N., Buňková, L., Němečková, I., (2021). "Quality evaluation of white brined cheese stored in cans as affected by the storage temperature and time". *International dairy journal,* 121, 105105.

Le Bourhis, A. G., Doré, J., Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R., and Tholozan, J. L., (2007). "Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese". *International journal of food microbiology*, 113(2), 154-163.

Le Bourhis, A. G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M. R., and Tholozan, J.-L., (2005). "Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis". *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 29-38.

Ledenbach, L. H., and Marshall, R. T., (2009). Microbiological spoilage of dairy products. In Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages (pp. 41-67): *Springer.*

Leroy, F., and De Vuyst, L., (2004). "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry". *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

Leuck, E., (1980). "Antimicrobial food additives". ff. Springer Verl. Berline Heidelberg, New York, 210.

Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C. P., and Camp, M. J., (2006). "Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists". *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1135-1140.

Liu, X., (2016). "Focus: Microbiome: Microbiome". *The Yale Journal of Biology and Medicine,* 89(3), 275.

Loc Carrillo, C., Atterbury, Robert J., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A., and Connerton, I. F., (2005). "Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens". *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 6554-6563.

Lopes, N. A., Pinilla, C. M. B., and Brandelli, A., (2019). "Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides". *Food Hydrocolloids*, 93, 1-9.

Lopez-Brea, S. G., Gómez-Torres, N., and Arribas, M. Á., (2017). "Spore-forming bacteria in dairy products". *Microbiology in Dairy Processing,* 11-36.

López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D., and Hernández, M., (2007). "Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by real-time PCR". *Applied and environmental microbiology,* 73(11), 3747-3751.

Ludwig, W., Schleifer, K.-H., and Whitman, W. B., (2009). "Revised road map to the phylum Firmicutes". Bergey's manual of systematic bacteriology, 2(3), 1-8.

Lycken, L., and Borch, E., (2006). "Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products". *Journal of food protection*, 69(8), 1887-1891.

Malacarne, M., Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P., Pecorari, M., Panari, G., and Mariani, P., (2009). "Free fatty acid profile of Parmigiano–Reggiano cheese throughout ripening: Comparison between the inner and outer regions of the wheel". *International dairy journal,* 19(10), 637-641.

Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., and Cuq, J-L., (1997). "Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese". *Journal of dairy science*, 80(8), 1483-1489.

Martínez-Cuesta, M. C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T., and Peláez, C., (2010). "Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter". *International dairy journal*, 20(1), 18-24.

Mathot, A. G., Beliard, E., and Thuault, D., (2003). "*Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese". *Journal of dairy science*, 86(10), 3068-3074.

Matijašić, B. B., Rajšp, M. K., Perko, B., and Rogelj, I., (2007). "Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*". *International dairy journal,* 17(2), 157-166.

Matijašic, B. B., and Rogelj, I., (2000). "*Lactobacillus* K7-a new candidate for a probiotic strain". *Food technology and biotechnology*, 38(2), 113-119.

Mayer, M. J., Payne, J., Gasson, M. J., and Narbad, A., (2010). "Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage ΦCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin". *Applied and environmental microbiology,* 76(16), 5415-5422.

McSweeney, P. L., and Sousa, M. J., (2000). "Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review". *Le Lait*, 80(3), 293-324.

Melilli, C., Barbano, D. M., Caccamo, M., Calvo, M. A., Schembari, G., and Licitra, G., (2004). "Influence of brine concentration, brine temperature, and presalting on early gas defects in raw milk pasta filata cheese". *Journal of dairy science*, 87(11), 3648-3657.

Mezaini, A., Chihib, N.-E., Dilmi Bouras, A., Nedjar-Arroume, N., and Hornez, J. P., (2009). "Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product". *Journal of environmental and public health,* 2009.

Mohammadi, T. N., Shen, C., Li, Y., Zayda, M. G., Sato, J., Masuda, Y., Miyamoto, T., (2022). "Characterization of *Clostridium perfringens* bacteriophages and their application in chicken meat and milk". *International journal of food microbiology*, 361, 109446.

Mokdad, F. H., Benmechernene, Z., Benyoucef, A., Russo, N., Randazzo, C. L., Caggia, C., and Kihal, M., (2020). "Characterization of bioactive *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin strains isolated from camel's and goat's Algerian raw milks". *International Journal,* 76(3/1).

Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., and Berthier, F., (2014). "Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits". *International journal of food microbiology*, 177, 136-154.

Morandi, S., Battelli, G., Silvetti, T., Tringali, S., Nunziata, L., Villa, A., Brasca, M., (2021). "Impact of salting and ripening temperatures on late blowing defect in Valtellina Casera PDO cheese". *Food Control*, 120, 107508.

Murray, J., and Farrington, D. P., (2010). "Risk factors for conduct disorder and delinquency: key findings from longitudinal studies". *The Canadian Journal of Psychiatry,* 55(10), 633-642.

Němečková, I., Rohacká, H., Kučerová, K., Tůma, Š., Roubal, P., Pechačová, M., Plocková, M., (2010). "Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese-slurry". *Acta alimentaria,* 39(3), 368-377.

O'Flaherty, S., Ross, R. P., and Coffey, A., (2009). "Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria". *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 801-819.

O'flynn, G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Coffey, A., (2004). "Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7". *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3417-3424.

Oguntoyinbo, F. A., Huch, M., Cho, G.-S., Schillinger, U., Holzapfel, W. H, Sanni, A. I., and Franz, C. M., (2010). "Diversity of *Bacillus* species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria". *Journal of food protection*, 73(5), 870-878.

Olguín-Araneda, V., Banawas, S., Sarker, M. R., and Paredes-Sabja, D., (2015). "Recent advances in germination of *Clostridium* spores". *Research in microbiology*, 166(4), 236-243.

Oliveira, R. B., Baptista, R. C., Chincha, A. A., Conceição, D. A., Nascimento, J. S., Costa, L. E.O., Sant'Ana, A. S., (2018). "Thermal inactivation kinetics of *Paenibacillus sanguinis* 2301083PRC and *Clostridium sporogenes* JCM1416MGA in full and low fat "requeijão cremoso"". *Food Control*, 84, 395-402.

Oliveira, R. B., Margalho, L. P., Nascimento, J. S., Costa, L. E., Portela, J. B., Cruz, A. G., and Sant'Ana, A. S., (2016). "Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control". *Trends in Food Science & Technology*, 57, 11-19.

Öner, Z., Karahan, A. G., and Aloğlu, H., (2006). "Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening". *LWT-Food Science and Technology*, 39(5), 449-454.

Özcan, T., and Kurtuldu, O., (2011). "Sütün raf ömrünün uzatılmasında alternatif yöntemler". *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1), 119-129.

Özel, B., Şimşek, Ö., Akçelik, M., and Saris, P. E., (2018). "Innovative approaches to nisin production". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(15), 6299-6307.

Özkuyumcu, C., (2009). "Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi 1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. 1. baskı". *Güneş Kitabevi.* Ankara, 112-121.

Öztürkcan, A., and Acar, S., (2017). "Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddeleri ile ilgili genel bir değerlendirme". *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* (1), 1-17.

Panari, G., Perini, S., Guidetti, R., Pecorari, M., Merialdi, G., and Albertini, A., (2001). "Indagine sul comportamento di germi potenzialmente patogeni nella tecnologia del formaggio Parmigiano-Reggiano". *Sci. Tecn. Latt. Cas,* 52, 13-22.

Panelli, S., Brambati, E., Bonacina, C., and Feligini, M., (2013). "Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk to prevent late blowing in cheese by automated ribosomal intergenic spacer analysis". *Journal of food science,* 78(10), M1569-M1574.

Pao, S., Rolph, S. P., Westbrook, E. W., and Shen, H., (2004). "Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds". *Journal of food science,* 69(5), M127-M130.

Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A., and Lucas López, R., (2016). "Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria". *Critical reviews in biotechnology*, 36(5), 851-861.

Pichhardt, K., (2004). "Gıda mikrobiyolojisi". *Literatür Yayıncılık*, İstanbul.

Pingitore, E. V., Todorov, S. D., Sesma, F., and de Melo Franco, B. D. G., (2012). "Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese". *Food microbiology,* 32(1), 38-47.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D., (2012). "High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses". *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5717-5723.

Rainey, F. A., Hollen, B. J., and Small, A. M., (2015). "*Clostridium*". Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, 1-122.

Ramseier, H. R., (1960). "The mode of action of nisin on *Clostridium butyricum*". Arch. *Mikrobiol,* 37, 57-94.

Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H., and Yu, H., (2018). "Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods". *BioMed research international*, 2018.

Ribeiro, S. C., Ross, R. P., Stanton, C., and Silva, C. C., (2017). "Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese". *Journal of food protection,* 80(8), 1303-1316.

Rilla, N., Martınez, B., Delgado, T., and Rodrıguez, A., (2003). "Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer". *International journal of food microbiology,* 85(1-2), 23-33.

Rodrıguez, E., Calzada, J., Arqués, J. L., Rodrıguez, J. M., Nunez, M., and Medina, M., (2005). "Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese". *International dairy journal,* 15(1), 51-57.

Rodrıguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., and Medina, M., (2000). "Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk". *International dairy journal*, 10(1-2), 7-15.

Saitou, N., and Nei, M., (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Samaržija, D., Damjanović, S., and Pogačić, T., (2007). "*Staphylococcus aureus* u siru". *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka,* 57(1), 31-48.

Savello, P. A., Ernstrom, C. A., and Kalab, M., (1989). "Microstructure and meltability of model process cheese made with rennet and acid casein". *Journal of dairy science*, 72(1), 1-11.

Say, D., (2008). "Haşlama suyunun tuz konsantrasyonu ve depolama süresinin kaşar peynirinin özellikleri üzerine etkileri". *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, 131s.

Schnürer, J., and Magnusson, J., (2005). "Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives". *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 70-78.

Sert, S., (2002). "Genel mikrobiyoloji laboratuvar notları" *Atatürk Üniversitesi*.

Sert, D., Ayar, A., and Akin, N., (2007). "The effects of starter culture on chemical composition, microbiological and sensory characteristics of Turkish Kaşar Cheese during ripening". *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 245-252.

Settanni, L., and Corsetti, A., (2008). "Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation". *International journal of food microbiology,* 121(2), 123-138.

Sheehan, J. J., (2007). "57 What causes the development of gas during ripening?". Cheese problems solved, 131.

Siçramaz, H., Güven, O. T., Can, A., Ayar, A., and Gul, Y., (2022). "Impact of different starter cultures and *Lactobacillus helveticus* on volatile components, chemical and sensory properties of pasta filata cheese". *Current Research in Food Science.*

Silvetti, T., Morandi, S., and Brasca, M., (2018). "Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related *Clostridium* species". *LWT*, 92, 32-39.

Singh, T. K., Drake, M. A., and Cadwallader, K. R., (2003). "Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective". *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(4), 166-189.

Skeie, S., (2010). Milk quality requirements for cheesemaking. In Improving the safety and quality of milk (pp. 433-453): *Elsevier.*

Speck, M. L., (1984). "APHA". Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2nd ed. Washington, DC: *American Public Health Association*, 5-99.

Špehar, I. D., Ljoljić, D. B., Petanjek, Z., Zamberlin, Š., Kalit, M. T., and Samaržija, D., (2020). "Antimicrobial activity of bacteriocins of Lactic Acid Bacteria on *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* and *Clostridium tyrobutyricum* in cheese production". *Mljekarstvo/Dairy*, 70(3).

Stellato, G., De Filippis, F., La Storia, A., and Ercolini, D., (2015). "Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment". *Applied and environmental microbiology*, 81(22), 7893-7904.

Stessl, B., and Hein, I., (2010). Identifying pathogens in milk. In Improving the safety and quality of milk (pp. 87-112): *Elsevier.*

Storari, M., Kulli, S., Wüthrich, D., Bruggmann, R., Berthoud, H., and Arias-Roth, E., (2016). "Genomic approach to studying nutritional requirements of *Clostridium tyrobutyricum* and other Clostridia causing late blowing defects". *Food microbiology*, 59, 213-223.

Strompfová, V., Lauková, A., and Mudroňová, D., (2003). "Effect of bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* EF55 on the composition of avian gastrointestinal microflora". *Acta Veterinaria Brno*, 72(4), 559-564.

Stuart, M. R., Chou, L. S., and Weimer, B. C., (1999). "Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp*. lactis*". *Applied and environmental microbiology,* 65(2), 665-673.

Su, Y.-C., and Ingham, S. C., (2000). "Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda cheese". *International journal of food microbiology*, 54(3), 147-154.

Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P., (2007). "The epidemiology of human listeriosis". *Microbes and infection,* 9(10), 1236-1243.

Şanlıbaba, P., and Uymaz, B., (2015). "Gıdalarda *Listeria monocytogenes*'in biyokontrolünde faj uygulaması". *Akademik Gıda*, 13(1), 81-88.

Tabla, R., Gómez, A., Rebollo, J. E., Molina, F., and Roa, I., (2022). "Effectiveness of a bacteriophage cocktail in reducing cheese early blowing caused by *Escherichia coli*". *LWT*, 153, 112430.

Tagg, J., and McGiven, A., (1971). "Assay system for bacteriocins". *Applied microbiology*, 21(5), 943-943.

Tarakçı, Z., Karaağaç, M., and Çelik, Ö. F., (2015). "Ordu il merkezindeki tüketicilerin fermente süt ürünleri tüketim alışkanlıkları". *Akademik Ziraat Dergisi*, 4(2), 71-80.

Te Giffel, M. C., and Wells-Bennik, M. H. J., (2010). Good hygienic practice in milk production and processing. In Improving the Safety and Quality of Milk (pp. 179-193): *Elsevier*.

Temelli, S., and Çetin, E., (2011). "Gıdalarda patojen kontrolünde bakteriyofaj kullanımı". *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30(2), 45-52.

Ter Steeg, P. F., and Cuppers, H. G., (1995). "Growth of proteolytic *Clostridium botulinum* in process cheese products: II. Predictive modeling". *Journal of food protection*, 58(10), 1100-1108.

Thylin, I., (2000). "Methods of preventing growth of *Clostridium tyrobutyricum* and yeasts in silage": *Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences).*

Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., Piras, C., (2020). "Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production". *Journal of Proteomics*, 210, 103534.

Todaro, M., Palmeri, M., Cardamone, C., Settanni, L., Mancuso, I., Mazza, F., Corona, O., (2018). "Impact of packaging on the microbiological, physicochemical and sensory characteristics of a “pasta filata” cheese". *Food packaging and shelf life*, 17, 85-90.

Topçu, A., (2004). "Kaşar ve Beyaz peynirlerde acılaşmaya yol açan peptidlerin saptanması ve acılaşmada depolama koşulları ile starter kültürlerin etkisinin incelenmesi". *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, Ankara, Turkey.

Tunail, N., (2009). "Mikrobiyoloji" Danone Enstitüsü Derneği.

Tunçtürk, Y., Andiç, S., and Elvan, O., (2010). "Homojenizasyon ve pastörizasyonun beyaz peynir ve peyniraltı suyu bileşimine etkisi". *Gıda*, 35(5), 339-345.

TÜİK., (2020). Süt ve Süt Ürünleri Raporu. Retrieved from https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wpcontent/uploads/Haber_Bulteni_mart_2020.pdf.

TÜİK., (2022). Süt ve Süt Ürünleri Üretimi, Ocak 2022. Retrieved from https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sut-ve-Sut-Urunleri-Uretimi-Ocak-2022-45748

Türk Gıda Kodeksi., (2015). "Peynir Tebliği". Resmi Gazete, 8.

Ulusal Süt Konseyi., (2018). "Dünya ve Türkiye'de Süt Sektör İstatistikleri-2018 Süt Raporu". Ulusal Süt Konseyi, Ankara, 48s.

Ulusal Süt Konseyi., (2019). Türkiye Süt Sektör İstatistikleri Özet Raporu. In.

Ünver, N., and Çelik, Ş., (2017). "İçme sütü üretiminde ESL (Extended Shelf Life) teknolojisinin kullanımı". *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(2), 247-258.

Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., and Drider, D., (2019). "Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production". *Frontiers in Microbiology*, 10, 57.

Vissers, M. M .M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., and Lankveld, J. M. G., (2006). "Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria". *Journal of dairy science*, 89(3), 850-858.

Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., and Lankveld, J. M. G., (2007). "Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk". *Journal of dairy science*, 90(7), 3278-3285.

Wasserfall, F., and Teuber, M., (1979). "Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*". *Applied and environmental microbiology*, 38(2), 197-199.

Wen, L. S., Philip, K., and Ajam, N., (2016). "Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*". *Food Control*, 60, 430-439.

Whichard, J. M., Sriranganathan, N., and Pierson, F. W., (2003). "Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters". *Journal of food protection*, 66(2), 220-225.

Wilkinson, J. M., (2005). Silage. Chapter 19: Analysis and clinical assessment of silage. In: *Chalcombe Publications*, UK.

Willey, J. M., Sherwood, L., and Woolverton, C. J., (2009). "*Prescott's principles of microbiology".*

Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., and Dutton, R. J., (2014). "Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity". *Cell,* 158(2), 422-433.

Wouters, J. T. M., Ayad, E. H., Hugenholtz, J., and Smit, G., (2002). "Microbes from raw milk for fermented dairy products". *International dairy journal*, 12(2-3), 91-109.

Xiraphi, N., Georgalaki M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., and Drosinos. E. H., (2008). "Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131". *Meat Science*, 80(2), 194-203.

Yakıt, S., (2019). "Antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve antimikrobiyel aktivitenin kısmi karakterizasyonu". *Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Yaman, H., Aykas, D. P., Jiménez-Flores, R., and Rodriguez-Saona, L. E., (2022). "Monitoring the ripening attributes of Turkish white cheese using miniaturized vibrational spectrometers". *Journal of dairy science*, 105(1), 40-55.

Yaşar, K. (2007). "Farklı pıhtılaştırıcı enzim kullanımının ve olgunlaşma süresinin kaşar peynirinin özellikleri üzerine etkisi". *Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora tezi*, 134.

Yaygın, H., (1989). "Peynirlerde görülen geç şişmeye karşı lysosym kullanılması". *Gıda,* 14(6).

Yeluri, B. R., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., and Cotter, P. D., (2018). "Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry". *Frontiers in Microbiology*, 9, 1020.

Yetişmeyen, A., and Yıldız, F., (2006). Use of Microfiltration in Milk Industry. *Paper presented at the 9th Food Congress.*

Yoon, Y., Lee, S., and Choi, K.-H., (2016). "Microbial benefits and risks of raw milk cheese". *Food Control,* 63, 201-215.

Yutin, N., and Galperin, M. Y., (2013). "A genomic update on clostridial phylogeny: G ram-negative spore formers and other misplaced clostridia". *Environmental microbiology,* 15(10), 2631-2641.

Yuvaşen, A., Macit, E., and Dertli, E., (2018). "Microbial species playing roles for the production of traditional Kasar cheese during pre-maturation period". *LWT*, 91, 406-413.

Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Ai, L., (2018). "Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk". *Frontiers in Microbiology*, 9, 2165.

Zhao, J., Lu, C., Chen, C.-C., and Yang, S.-T., (2013). "Biological production of butanol and higher alcohols". *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*, 235-262.

A
CLOSTRIDIUM TÜRLERININ 16S rDNA GEN DİZİLİMLERİ

EK-1-10 *Cl. sporogenes* strain DSM 795

CTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAG
AATCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGT
GGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACG
GTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAA

EK-1-13 *Cl. sporogenes* strain DSM 795

CTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAG
AATCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGT
GGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACG
GTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACT

KK-7-2 *Cl. sporogenes* strain DSM 795

AACCTGCCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAAC
ATAAGAGAATCGCATGATTTTTTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCG
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAAC
GCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGAT

AATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCGAGCGTTGT

ZEK-1-5 *Cl. sporogenes* strain DSM 795

GCCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAG
AGAATCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG
TGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACG
GTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCGAGCGTTGTCCG

ZKK-2-7 *Cl. tepidum* strain IEH 97212

CTACCTCAAAGTGGGGGATAGCCTCCCGAAAGGGAGATTAATACCGCATAATATA
AGAAAATCGCATGATTATCTTATCAAAGATTTATCGCTTTGAGATGGACCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCC
GCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATG
ACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCGAGCGTTGTC

ZKK-4-4 *Cl. tepidum* strain IEH 97212

GGGGGATAGCCTCCCGAAAGGGAGATTAATACCGCATAATATAAGAAAATCGCAT
GATTATCTTATCAAAGATTTATCGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATG
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAG
GAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGA
GCGTTGTCCGGA

ZTEK-1-6 *Cl. tepidum* strain IEH 97212

TACCTCAAAGTGGGGGATAGCCTCCCCAAAGGGAGATTAATACCGCATAATATAA
GAAAATCGCATGATTATCTTATCAAAGATTTATCGCTTTGAGATGGACCCGCGGC
GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCCCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCG
CGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGA
CGGTTCCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTG

ZMP-1-4 *Cl. sporogenes* strain DSM 795

CCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGA
GAATCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGC
ATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG
TGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACG
GTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCGAG

ZKK-7-2 *Cl. sporogenes* strain DSM 795

GCCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAG
AGAATCGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCG
TGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACG
GTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCGAGCGTTGTCCGG

B
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT 16S rDNA GEN DİZİLİMLERİ

Y32 *L. plantarum*

TCCCTTTTCGACCTCTCATTAACCGAAGTGATTCTACGTAAGGAAACGGGCAAGG
TGAAACCACTATAGTGATAGAGGCTGTTTCCCCGACATTAAAAATTATAATGTAA
CATCCGTTGATGCTCCCGCGTTGCCCTTTGTTAATGGCGAAGCAATTCAACTCTC
CTTTGCCCCCCGGCGTGTTGCCGCTGGTGCACCTCCTATACTCACCTCGGAATTG
TTACGGTGCCGACCTCCGAGGGTAATTCGCCACCTTGGGACTGTTCCGGTGGCCA
AACGGCGGGTGGAGGCAAAATATATTGGGAGTCCGACTGGGGCAAGATTCCCTC
CTATAAACCCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAA
AGAAGAACATATCTGAAAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGATTTATTGGGCCT

Y35 *Leu. mesenteroides*

GCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGC
CTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGT
GTCGCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGC
GGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCC
GAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
GGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAC
AGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCT
AAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCC

Y43 *L. plantarum*

TGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA
CCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACA
ACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATG

GTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATA
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAA
GAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAA
GAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
ACCAGTGGCG

Y48 *L. plantarum*

TCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTG
CCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTG
GACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC
GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAG
CCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA
ACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAAAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTC
GGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA

Y51 *L. plantarum*

TGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACG
TGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCG
CATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGC
AATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT
CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGT
TGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACC

AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGAT
GTGAAA

Y54 *Leu. mesenteroides*

TTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTC
AAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAATGTC
CCATGACAAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGT
GCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAG
TTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGG
AGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCG
CGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGC
TAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAA
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTC
AACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGC

Y89 *St. thermophilus*

TAGGTAACCTGCCTTGTAACGGGGGATAACTATTGGAAACGATAACTAATACCCC
ATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAA
GATGGACCTGCGTTGTATTATCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACC
ATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
ATACTCCTACGGGAGGCAGCACTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGA
CCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTA
AGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAG
AAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCG
TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAG
TTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTCGCTTTGGAAACTGTCAAACTTGAGTGCA
GAAGG

Y92 *St. thermophilus*

TTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTT
GTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGA
CACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTT

GTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATACATAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGG
TGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTAT
TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGC
TCAACCATAGTTCGCTTTGGAAACTGTCAAACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTG
GAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCG
AAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAG

Y98 ***St. thermophilus***

TGCTCCTCTTGGATTAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTTG
TAGCGGGGGATAACTTTTGGAAACCATAGCTAATACCGGATAACAATGGATGACA
CATGGCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGT
ATTAGCTAGTAGGTGAAGGAATGGGTCACCTAAGGCACCAATCCTTACCCAACTG
GGAGGGGGATCCGGCCCCCTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTCGGGAGG
GCACAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTTGCCGAACCACGCCGCGT
GAATTAATAAAGGTTTTCGAATCTAAAACTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTG
AGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG
GCGTAAAGCGAGCGCAGGC

Y122 ***St. thermophilus***

TAACCTGCCTTGTACCGGGGGATAACTATTGAAAACGAGCTCTTATACCACATAA
CCTTGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATG
GACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATAC
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGGGCAACCCTGACCGA
GCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGTG
AAG

Y125 *St. thermophilus*

CGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAACTAATACC
CCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTAC
AAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTACGCGA
CCATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACGCTGGGACTGAGACACGGC
CCATACTCCTACGGGAGGCACCCCTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCT
GACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
TAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACC
AGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAG
CGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGA
AGTTAAAGGCTGTGGCTCAAC

Y127 *St. thermophilus*

AGCTTGCTCTTCCTGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAAGTAACCTGC
CTTGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAACTAATACCCCATAACAATGGAT
GACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCG
TTGTATTATCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATACATAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGG
GAGGCACCACTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGG
GTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG

Y128 *St. thermophilus*

TGGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGG
GATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCAT
TTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTA
GTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTG
GAAAGTTCACACTGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA

AGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATA
GTTCGCTTTGGAAACTGTCAAACTTGAGTGCAGAAGGG

PY49 *St. thermophilus*

GGGGGGAAGGGGGGGGTGTACCAAGGCCGGGAAACTATTCCCCGCGGCGTGGT
GATCCCCGATTAATAACGATTCCCACTTCCTGTAAGCCAATTGCAACACAGAATC
CGAACTGAAATTGGCTTTTGGAGAATAGCTCGCCCCCCCCGACTCCCCTGCCCTT
GTACCAACCATTGGAACACGTGTGTAGCCCCAGTCATAAGGGGCATGATGATTTG
ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTTACCGGCAGTCTCGCTTAAGTGCCCCCT
GAATGATGGCAACTAAAAAAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAATCT
CACGAACGAGCTGA

PY80 *Lc. lactis* subsp. *lactis*

ACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTA
GGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAAC
ATCACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT
CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCCTCCCCCCCTTCCTCCGGTTTATCACCGG
CAGTCTCGTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCT
CGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACCACCATGCACC
ACCTGTATC

PY81 *Lc. lactis* subsp. *lactis*

GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAAT
CCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATCACTGTCTCGCGACTCGT
TGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTT
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCA
ACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGA
AGGAACTTCCTA

PY82 *Lc. lactis* subsp. *lactis*

GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAAT

CCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATCACTGTCTCGCGACTCGT
TGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTT
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCA
ACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGA
AGGAACTTCCTATCT

PY83 ***Lc. lactis*** **subsp.** ***lactis***

GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAG
CGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTT
TTAAGAGATTAGCTAAACATCACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACT
AACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGAAGGAACTTCC

PY91 ***Lc. lactis*** **subsp.** ***lactis***

CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGA
GAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATCACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATC
CATTGGAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCAACTTAATGA
TGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCTTTGTCCCGAAGGAACTTC
CTAT

PY142 ***Lc. lactis*** **subsp.** ***lactis***

GGGGGGGACGGGGGGGGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCCCCGCGGCGTGC
TGATCCGCAATTACAAGCGATTCCAACTTCATGTAGGCGAGTTGCAACCTACAAT
CCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACCTCACTGTCTCGCGACTCGT
TGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAGTCATAAGGGGCATGATGATTT
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCA
ACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCC

C
EMS Çizelgesi

EMS Çizelgesi; EMS.mL^{-1} (ISO, 2015)

Pozitif tüpler			Sayı ve kategori		%95 güvenlik sınırı		%99 güvenlik sınırı	
1 mL	0,1 mL	0,01 mL	EMS	Kategori	Alt	Üst	Alt	Üst
0	0	0	<0,30	-	0,00	0,94	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,10	3	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	0	1,10	2	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	1	1,50	3	0,50	3,80	0,20	5,20
1	3	0	1,60	3	0,50	3,80	0,20	5,20
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,40	2	0,40	3,50	0,20	4,60
2	1	0	1,50	1	0,40	3,80	0,20	5,20
2	1	1	2,00	2	0,50	3,80	0,20	5,20
2	2	0	2,10	1	0,50	4,00	0,20	5,60
2	2	1	2,80	3	0,90	9,40	0,50	14,20
2	3	0	2,90	3	0,90	9,40	0,50	14,20
3	0	0	2,30	1	0,50	9,40	0,30	14,20
3	0	1	3,80	2	0,90	10,40	0,50	15,70
3	0	2	6,40	3	1,60	18,10	1,00	25,00
3	1	0	4,30	1	0,90	18,10	0,50	25,00
3	1	1	7,50	1	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12,00	3	3,00	36,00	2,00	44,00
3	2	0	9,30	1	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15,00	1	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	2	21,00	2	3,00	40,00	2,00	56,00
3	2	3	29,00	3	9,00	99,00	5,00	152,00
3	3	0	24,00	1	4,00	99,00	3,00	152,00
3	3	1	46,00	1	9,00	198,00	5,00	283,00
3	3	2	110,00	1	20,00	400,00	10,00	570,00
3	3	3	>110,00					

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. **Demirbaş, F.,** Arıcı, M. ve Dertli, E., Inhibition of *Clostridium* Species by Protective Lactic Acid Bacteria in Dairy Industry. III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021.

2. **Demirbaş, F.,** Dertli E. ve Arıcı M., Bakteriophage Solutions Against *Clostridium tyrobutyricum* in Dairy Industry ICADET, 19- 21- 23 Eylül 2019.

Makaleler

1. **Demirbaş, F.,** Dertli, E., ve Arıcı, M. Prevalence of *Clostridium* spp., in Kashar cheese and efficiency of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mix as a biocontrol agents for *Clostridium* spp. *Food Bioscience*,*46*, 101581. (2022).