

## Mengen Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi

Aylin AKOĞLU\*<sup>1</sup>, Hülya YAMAN<sup>1</sup>, Hayri COŞKUN<sup>2</sup>, Kübra SARI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Turizm İşletmeciliği ve Otelcilik Yüksekokulu, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, 14280, Bolu

<sup>2</sup>Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 14280, Bolu

(Alınış / Received: 29.06.2016, Kabul / Accepted: 18.11.2016, Online Yayınlanma / Published Online: 23.12.2016)

### Anahtar Kelimeler

Mengen peyniri,  
Starter kültür,  
Laktik asit bakterisi,  
Moleküler tanımlama,  
Yöresel gıda

**Özet:** Çalışmada 50 adet Mengen peyniri örneğinden toplam 117 adet laktik asit bakterisi izole edilmiş ve laktik asit bakteri florası % 44.5 *Enterococcus* spp., % 29.9 *Lactobacillus* spp., % 25.6 *Lactococcus* spp. olarak belirlenmiştir. Elde edilen izolatların asidifikasyon kapasiteleri ile proteolitik aktiviteleri tespit edilmiş, en iyi asidifikasyona ve proteolitik aktiviteye sahip 22 adet suş 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Tanımlaması yapılan suşların 15'i (% 63) *Enterococcus* spp., 5'i (% 21), *Lactococcus* spp., 1'i (% 4) *Lactobacillus* spp. ve 1'i (% 4) *Weissella* spp. olarak belirlenmiştir. 15 adet *Enterococcus* spp. izolatından; 9'u (% 60) *Enterococcus faecium*, 4'ü (% 26.7) *Enterococcus faecalis* ve 2'si (% 13.3) *Enterococcus durans* olarak; 5 adet *Lactococcus* spp. izolatından, 3'ü (% 60) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2'si (% 40) *Lactococcus garvieae* olarak tanımlanmıştır. *Lactobacillus* spp. ve *Weissella* spp. olarak tanımlanan suşların ise sırasıyla *Lactobacillus casei* ve *Weissella viridescens* olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan suşlar içerisinde aynı anda hem düşük proteolitik aktivite hem de yüksek asidifikasyon aktivitesi özelliği gösteren bir adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşu, Enterokoklar arasından bir adet *Enterococcus faecalis*, bir adet *Enterococcus faecium* ve iki adet *Enterococcus durans* suşu en iyi starter kültür özelliklerine sahip suşlar olarak belirlenmiştir.

## Isolation, Molecular Identification and Determination of Some Starter Culture Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Mengen Cheese

### Keywords

Mengen cheese,  
Starter culture,  
Lactic acid bacteria,  
Molecular identification,  
Local food

**Abstract:** In the study 117 colonies were isolated from 50 Mengen cheese samples and they were determined as 44.5% *Enterococcus* spp., 29.9%, *Lactobacillus* spp., 25.6% *Lactococcus* spp. Among strains, 22 pieces having the most appropriate acidification capability and proteolytic activity were selected and identified by 16S rDNA sequencing. 15 pieces of these strains (63%) were identified as *Enterococcus* spp., 5 pieces (21%) were identified as *Lactococcus* spp., 1 piece (4%) as *Lactobacillus* spp. and 1 piece (4%) as *Weissella* spp. The *Enterococcus* strains were identified (15 pieces) as the following; 60% were *Enterococcus faecium*, 26.7% *Enterococcus faecalis*, 13.3% *Enterococcus durans*. The *Lactococcus* strains were identified (5 pieces) as the following; 60% *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 40% *Lactococcus garvieae* and the others were determined as *Lactobacillus casei* and *Weissella viridescens*. One of the defined strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, one of them were identified as *Enterococcus faecalis*, two of them were identified as *Enterococcus durans*, one of the stains *Enterococcus faecium* were identified as potential starter culture due to high acidification characteristics and low proteolytic activity.

### 1. Giriş

Ülkemiz her biri kendine özgü kimyasal ve duyuşsal niteliklere sahip 50'den fazla yöresel ve bölgesel

peynir çeşidi ile süt ürünlerinde özellikle de peynirde zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Yöre koşulları, özellikle kültürel alışkanlıklar, hayvan tür ve ırklarının farklılığı, farklı üretim tekniklerinin kullanılması bu

çeşitliliğin nedenlerindedir [1]. Bölge ekonomisine katkıda bulunmak, ürün çeşitliliğini ve güvenliğini artırmak için son yıllarda birçok ülkede geleneksel ürünlerin üretim yöntemlerinin orta ve küçük ölçekli sanayiye aktarılması konusunda çalışmalar yapılmaktadır [2]. Bu bağlamda ülkemizde üretilen yöresel peynirlerin çeşitliliği de dikkate alındığında bu tip peynirlerin orjinlerine uygun şekilde ve endüstriyel boyutta üretimlerinin ülke ekonomisine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Laktik asit bakterileri, başta peynir olmak üzere birçok süt ürününün üretimi ve olgunlaşması sırasında aroma geliştirme yetenekleri, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit oluşturabilmeleri, bakteriyofaj dirençlilikleri, proteolitik aktiviteleri gibi sahip oldukları bir çok özellikleri nedeni ile peynir endüstrisinde teknolojik öneme sahip mikroorganizmalardır [3, 4].

Çiğ süttten üretilen peynirlerde tat ve aroma ile tekstür gelişimi tamamen doğal laktik flora ile bağlantılıdır. Laktik flora, farklı türde çiğ süt kullanımı (inek, koyun, keçi vb.), peynir üretiminde ve depolanmasında kullanılan tekniklerin ve sürelerin farklı olması, coğrafi konuma özgü mikrofloranın farklılığı gibi birçok etkene bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Geleneksel yöntemlerle elde edilen peynirlerin biyokimyasal ve duyuşsal özellikleri floradaki bu çeşitlilikten dolayı farklılık arz etmektedir. Bu flora süttün elde edildiği bölgenin faunası ile yakından ilişkilidir ve bu nedenle bölgenin dışında üretimi gerçekleştirilen peynir çeşitlerinde karakteristik tat, aroma ve tekstürel özelliklerin elde edilmesi oldukça güçtür [5, 6].

Geleneksel süt ürünlerini standardize edebilmek ve endüstriyel düzeyde üretebilmek için ürünün doğal mikrobiyal florasının tespit edilmesi ve sonrasında bu floranın karakterize edilerek starter kültür özelliği olan suşların belirlenmesi ve starter kültür olarak üretiminin uygunluğunun saptanması son derece önem teşkil etmektedir [5, 6]. Süt endüstrisinde özellikle de peynir üretiminde starter kültür çeşitliliğinin sınırlı olması nedeni ile peynir üreticileri farklı tipte laktik asit suşlarının üretilmesine yönelik taleplerini arttırmışlardır [6]. Bu talep ve ihtiyaca bağlı olarak son yıllarda herhangi bir starter kültür ilavesi yapılmaksızın üretilen geleneksel peynirlerin laktik asit bakteri florasının belirlenmesi, elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik olarak tanımlanması ve tanımlanan suşların biyokimyasal, teknolojik ve starter kültür özelliklerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır [6, 7, 8, 9, 10, 11]. Elde edilen suşların potansiyel starter kültür özelliklerinin ortaya konulabilmesi için asitlik üretim kapasitesi, proteolitik aktivite, enzimatik aktivite, aroma oluşturma yetenekleri, bakteriyosin üretimi antibiyotik ve faj dirençliliği gibi teknolojik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir [6].

Mengen peyniri "köy peyniri" olarak da adlandırılan, koyun veya inek çiğ süttünden yapılan, pıhtılaştırıcı olarak buzağının şirdeninden elde edilmiş mayanın kullanıldığı, taze üretilen ve taze ya da kızartılarak tüketilen Bolu ili Mengen ilçesine özgü tipik bir peynir çeşididir [12]. Bugüne kadar Mengen peynirinde laktik asit bakteri florası üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, Mengen peynirindeki hakim laktik asit bakteri florasının suş düzeyinde tanımlanması ve endüstriyel üretimlerde kullanılabilen özgün starter kültür özelliğine sahip suşların belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece elde edilen starter kültürlerin Mengen peynirinin endüstriyel boyutta üretimine ve ülkemiz peynir çeşitliliğine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Araştırmada, Haziran 2014-Temmuz 2015 tarihleri arasında toplanan 50 adet Mengen peyniri örneği kullanılmıştır. Semt pazarlarından elde edilen örnekler aseptik koşullarda ve soğukta muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiş ve analizleri yapılmıştır.

### 2.2. Method

#### 2.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması

Aseptik koşullarda tartılan 10 g peynir örneği ile 90 mL ringer çözeltisi StomacherLab-Blender içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize peynir örneğinden dilüsyon tüpleri içerisinde seyreltme yapıldıktan sonra uygun besiyerleri üzerine ekim yapılmıştır.

*Lactobacillus* spp. izolasyonu için MRS (Merck) Agar'da anerobik koşullar altında 37 °C'de 48-72 saat inkübasyon, *Lactococcus* spp. için M17 (Merck) Agar'da 30 °C'de 48-72 saat inkübasyon, *Enterococcus* spp. izolasyonu için Kanamycin Esculin Agar'da (Merck) 37 °C'de 24-48 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir [6]. Her bir örnek için 5 koloni rastgele seçilerek saflaştırılmıştır. İzolatlar %20 oranında gliserol içeren karışım içerisinde -18 °C'de saklanmıştır.

Elde edilen izolatların morfolojik, fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerle ön identifikasyonu yapılmıştır. Buna göre Gram reaksiyonu, morfolojik inceleme, katalaz reaksiyonu, glikozdan gaz oluşturma, farklı tuz konsantrasyonlarında (% 2, % 4 ve % 6) gelişme, farklı sıcaklıklarda (10 °C, 15 °C ve 45 °C ) gelişme testleri yapılarak izolatların cins bazında ayrımı sağlanmıştır [13, 14].

## 2.2.2. İzolatların proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi

İzolatların proteolitik aktiviteleri, serbest NH<sub>3</sub> grupları konsantrasyonunun ölçümü esasına dayanan OPA (o-phthaldialdehide) metodu ile belirlenmiştir. Yönteme göre, 2,5 mL örnek 5 mL % 0.75'lik triklorasetikasit (TCA) ile karıştırıldıktan sonra Advantec 231 filtre kağıdından süzölmüştür. 150 µL filtrat üzerine 3 mL OPA çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 dakikalık inkübasyonun ardından çözeltinin absorbanı spektrofotometrede 340 nm'de okunmuştur [15].

## 2.2.3. İzolatların asidifikasyon kapasitelerinin belirlenmesi

İzolatların asidifikasyon kapasitelerinin belirlenmesi için pH ölçümü ve titrimetrik metotla % laktik asit ölçümlerinden yararlanılmıştır [16]. İzolatların asidifikasyon aktivitelerini belirlemek amacıyla 10 mL'lik Skim Milk besiyeri içeren tüplere aktif kültürlerden % 1 oranında aşılama yapılmıştır. Laktokoklar 28 °C'de, Laktobasiller 30 °C'de ve Enterokoklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyonun 6. ve 24. saatlerinde tüplerden 2'şer mL örnek aseptik koşullarda alınarak pH ölçümleri yapılmış, ilk ve son pH değerleri dikkate alınarak ΔpH değerleri belirlenmiştir.

## 2.2.4. İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile moleküler olarak tanımlanması

İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanması için; saf bakteri kültürlerinden ExiPrep Plus genomik DNA izolasyon kiti (Bioneer K4214, Kore) ile DNA izolasyonu yapılmış, 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmak amacıyla genel primerler (1492R ve 27F) kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiş ve son olarak 16S rRNA gen bölgesinin baz dizisini belirlemek amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen diziler NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bilinen dizilerin yer aldığı veri tabanlarıyla karşılaştırılmış ve tarama sonucunda dizinin hangi mikroorganizmaya ait olduğu benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir. İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile moleküler olarak tanımlanması işlemi Gen Plaza biyoteknoloji merkezi tarafından gerçekleştirilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Peynir örneklerinin laktik asit bakteri florası

Çalışmada 50 adet Mengen peynir örneğinden toplam 166 adet izolat elde edilmiştir. Işık mikroskopunda incelenen bakterilerin morfolojileri (kok, basil ve çubuk), dizilişleri (mono-diplo-tetra kok, balya ve zincir), Gram boyama, katalaz reaksiyonu, glikozdan gaz oluşturma, farklı tuz konsantrasyonlarında (% 2,

% 4 ve % 6) gelişme ve farklı sıcaklıklarda (10 °C, 15 °C ve 45 °C) gelişme özelliklerinin incelenmesinden sonra; MRS Agar'dan izole edilen 51 izolattan 35'inin *Lactobacillus* spp., M17 Agar'dan izole edilen 59 izolattan 30'unun *Lactococcus* spp., KAA Agar'dan izole edilen 56 izolattan 52'sinin *Enterococcus* spp. olduğu tespit edilmiş ve toplamda 117 adet laktik asit bakterisi belirlenmiştir. Bu verilere göre, çiğ süttten geleneksel olarak üretilen olgunlaşmamış Mengen peynirinin laktik asit florasının % 44.5'ini *Enterococcus* spp., % 29.9'unu *Lactobacillus* spp., % 25.6'sını *Lactococcus* spp.'nin oluşturduğu ve sonuç olarak laktik asit bakteri florasında hâkim floranın % 44.5 ile *Enterococcus* spp.'ye ait olduğu görölmektedir. Ülkemizde üretilen diğer yöresel peynirlerdeki laktik asit bakteri florasının belirlenmesine yönelik çalışmalar olmasına karşın Mengen peynirinin bu özelliğinin belirlenmesine yönelik yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışma sonucuna benzer olarak, Durlu-Özkaya ve ark. [17] Türkiye'de üretilen beyaz peynirlerle ilgili yaptıkları çalışmada % 62.33 *Enterococcus* (*E. hirae*, *E. faecium*), % 22.07 *Lactobacillus* (*L. paracasei*) % 15.5 *Lactococcus* (*Lc. lactis* spp. *lactis*) olacak şekilde laktik asit bakteri florası tespit etmişlerdir. Kırmacı [6] geleneksel bir peynir türü olan Urfa peynirinin laktik asit florasını belirlediği çalışmada elde ettiği 143 izolatın % 48.95'ini *Enterococcus* spp., % 40.55'ini *Lactococcus* spp., % 9.10'unu *Lactobacillus* spp., % 0.69'unu *Streptococcus* spp., % 0.69'unu ise *Leuconostoc* spp. olarak belirlenmiştir. Vernile ve ark. [18] İtalya'nın Sicilya bölgesinde geleneksel olarak üretilen ve sert bir peynir türü olan Pecorino Siciliano peynirinde laktik asit bakteri florasını % 47.2'sini *Enterococcus* spp., % 32.4'ünü *Lactobacillus* spp., % 12.6'sını *Lactococcus* spp. olarak belirlemişlerdir.

Hakim floranın *Lactobacillus* spp., olarak belirlendiği çalışmalardan, Ouadghiri ve ark. [19], Fas'a ait geleneksel bir yumuşak peynir türü olan Moroccan peynirinin hakim laktik asit florasının % 34'ünü *Lactobacillus* spp., % 27'sini *Lactococcus* spp., % 27'sini *Leuconostoc* spp. ve % 10'unu *Enterococcus* spp.'nin oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Terzic-Vidojevic ve ark. [20], Sırbistan'a ait yarı-sert bir geleneksel peynir olan Zlatar peynirinin laktik asit bakteri florasını % 53.9 *Lactobacillus* (*L. paracasei* subsp. *paracasei*), % 35.9 *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*), % 9.3 *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) olarak belirlemişlerdir.

Diğer taraftan İspanyaya ait yarı-sert bir peynir türü olan Penamellera [21] ve Ibores [22] peynirleri ve kremamsı bir peynir türü olan Valdeon peyniri [23] ile yapılan çalışmada hakim floranın sırasıyla % 74.7, % 47.5 ve % 42.2 oranı ile *Lactococcus* (*Lc. lactis* spp. *lactis*) oluşturduğu belirtilmiştir. Kırmacı [6], Güney Avrupa ülkelerinde geleneksel olarak çiğ koyun sütünden üretilen birçok peynirin florasında *Lactococcus* spp. türü bakterilerin baskın olduğunu bildirmiştir.

### 3.2. İzolatların starter kültür özellikleri

#### 3.2.1. Asidifikasyon aktiviteleri

Laktik asit bakterilerinin laktoz fermentasyonu sonucu asitlikte meydana getirdikleri artış, ürünün tat, aroma ve tekstür özelliklerinde önemli değişikliklere neden olmakta ve patojenlere karşı ürünün korunmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda asitlik artışına bağlı olarak pH'da meydana gelen azalma sütte pıhtılaşmaya neden olmakta ve tüm bu özelliklerinden dolayı suşların asidifikasyon aktivitesi starter kültür seçiminde önem arz etmektedir [6, 24].

Yapılan çalışmada, 6 saat ve 24 saat inkübasyon sonucunda saptanan  $\Delta$ pH değerleri sırasıyla, Laktokoklarda 0.19-1.20 ve 0.96-2.61, Enterokoklarda 0.04-1.61 ve 0.74-2.34; Laktobasillerde 0.11-0.36 ve 0.70-2.35 arasında değişim göstermiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Laktik asit bakterilerinin asidifikasyon kapasiteleri ve proteolitik aktiviteleri

Laktik asit bakterileri	$\Delta$ pH (6 h)	$\Delta$ pH (24 h)	Proteolitik aktivite (Abs)
<i>Lactococcus</i> spp. (n=30)			
Min.	0.19	0.96	0.60
Mak.	1.20	2.61	2.61
Ortalama	0.50 ± 0.24	2.00 ± 0.46	1.35 ± 0.72
<i>Enterococcus</i> spp. (n=52)			
Min.	0.04	0.74	0.41
Mak.	1.61	2.35	2.41
Ortalama	0.64 ± 0.34	1.62 ± 0.43	0.79 ± 0.32
<i>Lactobacillus</i> spp. (n=35)			
Min.	0.11	0.70	0.65
Mak.	0.36	2.35	1.45
Ortalama	0.22 ± 0.07	1.50 ± 0.48	0.88 ± 0.14

Tüm suşlar için 6 saat sonunda tespit edilen  $\Delta$ pH değerlerinin, 24 saat sonunda 0.77- 1.41 arasında arttığı saptanmıştır. Ertürkmen ve Öner [11], yaptıkları çalışmada  $\Delta$ pH 2.09/24s olan *Lc. Lactis* spp. *lactis* PeLc2 suşunun sahip olduğu yüksek asidifikasyon özelliği nedeni ile endüstriyel fermentasyonlar için potansiyel suş olabileceğini belirtmiştir.

Bu veri doğrultusunda çalışmada elde edilen toplam 30 adet Laktokok suşunun 19 adedinin; 52 adet Enterokok suşunun 11 adedinin; 35 adet Laktobasil suşunun 5 adedinin " $\Delta$ pH (24s)" değerinin 2'nin üzerinde olduğu tespit edilmiş ve bu suşlar yüksek asidifikasyon aktiviteleri nedeni ile potansiyel starter kültür olarak belirlenmişlerdir.

#### 3.2.2. Proteolitik aktiviteleri

Proteolitik aktivite peynirin olgunlaştırılması sırasında karakteristik tat, aroma ve tekstürün oluşumunda katkı sağladığından dolayı starter kültür

seçiminde önemli olan bir diğer özelliktir. Seçilecek peynir türüne göre proteolitik aktivite değişkenlik göstermekte, taze tüketilen peynirlerde düşük proteolitik aktiviteye sahip suşlar, olgunlaştırılan sert peynirlerde ise yüksek proteolitik aktiviteye sahip suşlar tercih edilmektedir [6, 10, 13]. Tablo 1 incelendiğinde Laktokokların, Enterokoklar ve Laktobasillere göre daha yüksek proteolitik aktivite gösterdiği görülmektedir. Mengen peynirinin taze tüketilen yumuşak bir peynir olması nedeni ile düşük proteolitik aktivite gösteren Enterokok suşlarının starter kültür olarak seçilmesi daha uygun görülmüştür.

### 3.3. Potansiyel starter kültürlerin 16S rDNA dizi analiz sonuçları

Proteolitik aktivite ve asidifikasyon özellikleri göz önünde bulundurularak potansiyel starter kültür özelliği taşıyan toplam 22 adet bakterinin moleküler tanımlanması yapılmıştır (Tablo 2). 16S rDNA dizi analizine göre; suşların 15'i (% 63) *Enterococcus* spp., 5'i (% 21), *Lactococcus* spp., 1'i (% 4) *Lactobacillus* spp. ve 1'i (% 4) *Weissella* spp. olarak tanımlanmıştır. 15 adet *Enterococcus* spp. suşundan; 9'u *Enterococcus faecium*, 4'ü *Enterococcus faecalis* ve 2'si *Enterococcus durans* olarak; 5 adet *Lactococcus* spp. izolatından, 2'si *Lactococcus garvieae*, 3'ü *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak; *Lactobacillus* spp. ve *Weissella* spp. olarak tanımlanan suşların ise sırasıyla *Lactobacillus casei* ve *Weissella viridescens* olduğu tespit edilmiştir. *Enterococcus faecium* yüksek sıcaklığa, yüksek NaCl içeren ortamlara, yüksek konsantrasyonda antibiyotiklere dayanıklı oluşları ve potansiyel probiyotik olmaları nedeniyle peynir kültürlerinde starter olarak tercih edilen; *Enterococcus faecalis* daha çok yarı sert peynirlerin olgunlaştırılmasına yönelik hazırlanan starter kültür karışımlarında yer alan; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* temel olarak peynirlerin üretiminde asit üreticisi olarak kullanılan; *Lactobacillus casei* ise probiyotik özelliklerinden dolayı bazı peynir çeşitlerinin üretiminde diğer laktik asit bakterisi ile birlikte yer alan ve peynirlerde sıklıkla rastlanan starter olmayan laktik asit bakterisi arasında bulunan starter bakterisi türleridir [25].

İzolasyon ve tanımlama sonuçlarına bakıldığında Enterokok türlerinin Mengen peynirinin hakim florasını oluşturduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar çiğ süttten geleneksel olarak üretilen peynirlerde üretim ve olgunlaşma sırasında *Enterococcus* cinsi bakterilerin sayılarında genellikle bir artış olduğunu göstermiştir. Bu artışın temel nedeni olarak üretim ve olgunlaşma sırasında yetersiz hijyen koşulları ifade edilmektedir. *Enterococcus* cinsi bakterilerin çiğ süttten üretilmiş taze peynirlerde yüksek miktarda bulunması çiğ süte direkt fekal kaynaklı bir bulaşmanın olduğunu veya üretim sırasındaki ekipmanlardan indirekt bir bulaşmanın olduğunu göstergesidir [26]. Peynir florasında en sık rastlanan *Enterococcus* spp. türleri arasında sayılan *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*,

peynirlerin yapı, tat ve aroma gelişimde önemli rol oynamakta özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis*, asetaldehit, etanol, diasetil ve aseton gibi uçucu bileşikler üretmesi nedeniyle peynirlerde aromanın gelişmesine katkıda bulunmakta ve bu nedenle starter kültür kombinasyonlarında yer almaktadır [6, 10, 26, 27]. Çalışmada tanımlaması yapılan *Enterococcus* cinsi bakterilerin % 60'ının *Enterococcus faecium*, % 27'sinin *Enterococcus faecalis*, % 13'ünün *Enterococcus durans* olduğu belirlenmiştir. Centeno ve ark. [28], çiğ süttten yapılan ve geleneksel bir peynir türü olan İspanyol Cebreiro peynirinde Enterokokları baskın laktik flora olarak belirlemiş ve bu tip peynirlerin geleneksel lezzetinin oluşmasında baskın floranın son derece önemli role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlamda bu tip peynir çeşitlerinin endüstriyel ölçekte pastörize süt kullanılarak üretiminde geleneksel yöntemle üretilmiş peynirlerden izole edilen bu mikroorganizmaların starter olarak kullanımı oldukça kabul gören bir yaklaşımdır [23].

Mengen peynir örneklerinden izole edilen *Lactococcus* spp. türü bakteriler içinde *Lc. lactis* subsp. *lactis* (% 60) türü baskın tür olarak belirlenirken bunu *Lc. garvieae* (% 40) türü izlemiştir. Kırmacı [6], *Lc. garvieae*'nin geleneksel peynirlerde *Lc. lactis* ile birlikte doğal flora içerisinde yer aldığını ve peynirde aroma gelişimi başta olmak üzere gibi bazı spesifik etkilere neden olduğunu bildirmiştir.

Tanımlanan suşlar içerisinde aynı anda hem düşük proteolitik aktivite hem de yüksek asidifikasyon aktivitesi özelliği gösteren bir adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşu, Enterokoklar arasından bir adet *Enterococcus faecalis*, bir adet *Enterococcus faecium* ve iki adet *Enterococcus durans* suşu en iyi starter kültür özelliklerine sahip suşlar olarak belirlenmiştir (Tablo 3).

#### 4. Sonuç

Bu çalışma ile geleneksel olarak üretilen Mengen peynirine özgü laktik asit bakteri florası belirlenmiş ve sonuç olarak *Enterococcus* cinsi bakterilerin peynirde dominant florayı oluşturduğu saptanmıştır. Potansiyel starter kültür olarak belirlenen suşların ileri ki çalışmalarda dekarboksilasyon aktivitesi, antibiyotik dirençlilikleri, faj duyarlılıkları, lipolitik aktivite, aroma profili gibi daha detaylı starter kültür olma özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Geleneksel yöntemle üretilen Mengen peynirindeki en uygun starter kültürlerin belirlenmesi ileride bu peynirin modern koşullarda üretimi sırasında tat, koku, tekstür gibi peynire has özelliklerinin korunmasında ve standart bir ürün elde edilmesinde fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Doğal starter kültür kullanarak modern tekniklerle üretim yapılması sonucunda yöresel peynir çeşitlerimize özgü özellikleri koruyabilecek, üretimi standardize

edebilecek ve gelecek nesillere ürünü kendine has özellikleri ile aktarabilecek duruma ginecektir.

**Tablo 2.** 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre bakterilerin sınıflandırılması ve yakınlık dereceleri

Nükleotid dizi erişim numarası	En yakın komşu	Yüzde nükleotid benzerliği
KT124587.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain PT829	% 98
FJ157238.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain FD-L2	% 97
KF149270.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMAU32599	% 99
KM186186.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain L11	% 99
JN792502.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain PFL331	% 96
HM583338.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain Shahedfarahani	% 98
FJ157238.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain FD-L2	% 98
JN792505.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain PB119	% 96
CP014529.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain E745	% 96
KF149306.1	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU32636	% 97
KR858843.1	<i>Enterococcus durans</i> strain IMAU11650	% 97
KF826015.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain CGLBL146	% 99
KT180316.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain OGR1 16S	% 98
KT261195.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain RCB983	% 98
KR858856.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain IMAU11663	% 97
KJ026679.1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain TW54-2	% 99
KF148840.1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU32155	% 98
HM218132.1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain NM26-6	% 96
KT260294.1	<i>Lactococcus garvieae</i> strain RCB82	% 96
KM409663.1	<i>Lactococcus garvieae</i> strain JB323791/2	% 98
KU587808.1	<i>Lactobacillus casei</i> strain HS4	% 98
HM217967.1	<i>Weissella viridescens</i> strain G78-6	% 98

**Tablo 3.** Potansiyel starter olarak seçilen en iyi beş suşun asidifikasyon kapasiteleri ve proteolitik aktiviteleri

Suş kodu	Suş adı	Asidifikasyon $\Delta$ pH (6h)	Asidifikasyon $\Delta$ pH (24h)	Proteolitik aktivite (Abs)
Lc 59	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0.39	2.35	1.086
Ec41	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.38	2.35	0.95
Ec60	<i>Enterococcus faecium</i>	0.28	2.21	0.886
Ec4	<i>Enterococcus durans</i>	0.34	2.18	0.913
Ec42	<i>Enterococcus durans</i>	1.32	2.33	0.983

## Teşekkür

Bu çalışma, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (BAP2014.09.04.746 nolu proje).

## Kaynakça

- [1] Elmalı, G., Uylaşer, V. 2012. Geleneksel Gıdalardan Çeçil Peynirinin Üretimi ve Özellikleri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 26(1), 83-92.
- [2] Gölge, Ö. 2009. Kelle Peynirlerinin Özellikleri Üzerine Starter Kültür Kullanımının Etkileri. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 97s, Adana.
- [3] Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto C., Lombardi, A., Lodi R. 2006. Technological and Molecular Characterization of Enterococci Isolated from North-West Italian Dairy Products. International Dairy Journal, 16, 867-875.
- [4] Fortina, M. G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L. and Manachini, P. L. 2007. Phenotypic Typing, Technological Properties and Safety Aspects of *Lactococcus garvieae* Strains from Dairy Environments. Journal of Applied Microbiology, 103(2), 445-453.
- [5] Callon, C., Millet, L., Montel, L. C. 2004. Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Salers Cheese. Journal Dairy Research, 71, 231-244.
- [6] Kırmacı H. A. 2010. Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 152s., Şanlıurfa.
- [7] Baruzzi, F., Morea, M., Matarante, A. and Cocconcelli, P. S., 2000. Changes In The Lactobacillus Community During Ricotta Forte Cheese Natural Fermentation. Journal of Applied Microbiology, 89, 807-814.
- [8] Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini, P. L. 2003. Genetic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Occuring in an Artisanal Protected Domination Origin (PDO) Italian Cheese, Toma Piemontese. Food Microbiology, 20, 397-404.
- [9] Turgut, T., Erdoğan, A., Atasever, M. 2012. Karın Kaymağı Peynirinden İzole Edilen Laktobasillerin Tanımlanması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18(2), 209-213.
- [10] Turhan, İ., Öner, Z. 2014. Determination of Starter Culture Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheese. Gıda, 39(1), 9-15.
- [11] Ertürkmen, P., Öner, Z. 2015. Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(3), 9-16.
- [12] Kamber, U. 2008. The Traditional Cheeses of Turkey: "Marmara Region". Food Reviews International, 24, 175-192.
- [13] Tunail N., Özkaya F. D., Gürsel A., Tamaçay B. 2001. Starter Bakterilerin Oluşturdukları Biyojen Aminlerin Saptanması ve Salamura Beyaz Peynirdeki Biyojen Amine Bağlı Risk Faktörünün Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: 96-11-12-04, Ankara.
- [14] Turhan, İ. 2014. Kaşar Peyniri Üretimi için Starter Kültür İzolasyonu ve İzolatların FTIR Spektroskopisi ile Tanısının Yapılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 112s, Isparta.
- [15] Donkor, H. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. 2007. Proteolytic Activity of Dairy Lactic Acid Bacteria and Probiotics as Determinant of Growth and in Vitro Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity in Fermented Milk. Lait, 86, 21-38.
- [16] Sarantinopoulos, P., Andrighetto C., Georgalaki M. D., Reac, M. C., Lombardib, A., Coganc, T. M., Kalantzopoulou, G., Tsakalidou, E. 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. International Dairy Journal, 11(8), 621-647.
- [17] Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopouloutzanetaki, E. 2001. Technology Important Properties of Lactic Acid Bacteria Isolates from Beyaz Cheese Made from Raw Ewe's Milk. Journal of Applied Microbiology, 91, 861-870.
- [18] Vernile, A., Giammanco, G., Spano, G., Beresford, P. T., Fox, P. F., Massa, S. 2008. Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Pecorino Siciliano cheese. Dairy Science Technology, 88, 619-629.
- [19] Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., Swings, J. 2005. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Moroccan Soft White Cheese (Jben). FEMS Microbiology Letters, 251, 267-271.
- [20] Terzić-Vidojević, A., Vukasović, M., Veljić, K., Ostojić, M. and Topisirović, L., 2007. Characterization of Microflora in Homemade SemiHard White Zlutar Cheese. International Journal of Food Microbiology, 114, 36-42.
- [21] Estepar, J., Sanchez, M. M., Alonso, L., Mayo, B. 1999. Biochemical and Microbiological Characterization of Artisanal "Peñamellera"

Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 9, 737-746.

- [22] Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzales, J., Rebollo, E. J., Caceres, P. 2002. Ibores Goat's Milk Cheese: Microbiological and Physicochemical Changes Throughout Ripening. *Lait*, 82, 579-587.
- [23] Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L., Moreno, B. 2000. Lactic Acid Bacteria Isolated from a Hand-Made Blue Cheese. *Food Microbiology*, 17, 23-32.
- [24] Karakuş M. 1994. Beyaz Peynirden izole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Asit Oluşturma ve Proteolitik Aktiviteleri. *Gıda*, 19(4), 237-241.
- [25] Kılıç, S. 2011. Peynir Starter Kültürleri. ss 121-172. Hayalođlu, A. A., Özer, B., ed. 2011. Peynir Biliminin Temelleri, Sıdaş, İzmir, 643s.
- [26] Giraffa, G., 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215-222.
- [27] Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M., Rodriguez, E., 1997. Characterization of The Lactic Acid Bacteria in Artisanal Dairy Products. *Journal Dairy Research*, 64, 409-421.
- [28] Centone, J. A., Menendez, S., Rodriguez-Otero, J. L. 1996. Main Microbial Flora Present as Natural Starters in Cebreiro Raw-cow's Milk Cheese (Norwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33, 307-313.