

Propiyonik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Elif Özer, Harun Kesenkaş

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 10.01.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 15.03.2012

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): harun.kesenkas@ege.edu.tr (H. Kesenkaş)

☎ 0 232 311 16 39 📠 0 232 342 57 13

ÖZET

Propiyonik asit bakterileri (PAB) ilk defa Freudenreich ve Orla-Jensen tarafından Emmantel peynirinden izole edilmiştir. PAB izolasyon kökenlerine göre klasik ve deri kökenli (patojen) PAB olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar. Klasik PAB ya da diğer adıyla “dairy-propionibacteria” genel olarak çiğ sütte, tereyağında ve özellikle olgunlaşma prosesinde oynadığı önemli rolle bilinen İsviçre tipi peynirlerde bulunmaktadır. Özellikle süt endüstrisi açısından büyük önemi olan bu sınıfın izolasyonu ve tanımlanması için klasik tanımlama yöntemleri en yaygın kullanılan prosedürlerdir. Ancak, *Propionibacteria* türlerinin geleneksel yöntemlerle tanımlanması yavaş olup, bazı türleri kesin olarak belirlemede zorluklar ile karşılaşılabilir. Bu nedenle özellikle son dönemlerde moleküler yöntemler ön plana çıkmıştır. Moleküler yöntemler sayesinde PAB’yi sınıf, tür, suş bazında sınıflandırmak ve *P. freudenreichii*’nin alt türlerini belirlemek mümkündür. Ancak mikrobiyolojide genetik tanımlama yöntemlerinin, özellikle PAB alanında olan çalışmaları oldukça yenidir ve daha fazla çalışmayla desteklenmesi gerekmektedir. Bu derlemenin amacı moleküler yöntemlerin süt ve süt ürünlerinden PAB’nin izolasyonu ve tanımlanmasında kullanımını irdelemektir.

Anahtar Kelimeler: Propiyonik asit bakterileri, İzolasyon, İdentifikasyon, Peynir

Isolation and Identification of Propionic Acid Bacteria

ABSTRACT

Propionic acid bacteria (PAB) have been isolated first by Freudenreich and Orla-Jensen from Emmantel cheese. According to their origin of isolation, PAB are divided into two main groups, classical and skin origin (pathogen) PAB. The former, also known as dairy propionibacteria, is particularly found in raw milk, butter and Swiss-type cheeses, where they play a major role during ripening. For this group, which is especially important for dairy industry, classical isolation and identification methods are most widely-used procedures. However, identification of propionibacteria species by conventional methods is slow and can be difficult to identify the specific types. Therefore, recent scientific studies have focused on the use of molecular methods. With the help of these methods, it has been possible to determine propionic acid bacteria classes, species and strain basis and to identify sub-types of *P. freudenreichii*. But, genetic methods in microbiology are very new, and need to be supported by more studies. The aim of this review is to present the use of molecular methods to isolate and identify PABs in dairy products.

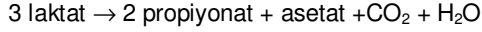
Key Words: Propionic acid bacteria, Isolation, Identification, Cheese

GİRİŞ

1906 yılında, Freudenreich ve Orla-Jensen Emmantel peynirinden *Bacterium acidi-propionici* ve *Bacillus acidi-propionici* adını verdikleri bakterileri izole etmişlerdir. Bu

organizmalar propiyonik asit üretme yetenekleriyle tanımlanmıştır. Bu bakteriler için *Propionibacterium* sınıfı ilk olarak 1909 yılında Orla-Jensen tarafından önerilmiştir [1]. Propiyonik asit bakterileri pleomorfik çubuk şekilli, mikroaerofilik veya anaerobik gelişme

koşullarını tercih eden Gram(+) bakterilerdir. Genom aralıklarının G+C bileşimi %53-67 mol aralığındadır. Bu oran da onları yüksek G+C grubu bakteriler arasına dahil eder. Mezofilik karakterdeki PAB'nin optimum gelişme sıcaklıkları 25 ile 32 °C arasındadır. pH 5.0 ile 8.0 arasında gelişebilen PAB için optimum pH değeri 6.0–7.5'dir [3]. Biotin ve pantotenik asit gelişmeleri için gerekli esansiyel faktörlerdir [4]. Aşağıdaki formülde belirtildiği gibi PAB'nin en önemli karakteristiği temel metabolit olarak laktik asitten propiyonik asit ve asetik asit üretmeleridir [2].



PAB izolasyon kökenlerine göre iki temel gruba ayrılırlar: Klasik PAB ve deri kökenli (patojen) PAB. Klasik PAB ya da diğer adıyla "dairy-propionibacteria" genel olarak çiğ sütte, tereyağında ve özellikle olgunlaşma prosesinde oynadığı önemli rolle bilinen İsviçre tipi peynirlerde bulunmaktadır. Modern peynir yapımında PAB'nin hem doğal florada, hem de starter içinde yer alması bakımından büyük önemi vardır. PAB'nden İsviçre tipi peynirlerde hem tat oluşumunda, hem de tekstür oluşumunda yararlanılır. Bu tip peynirlerin karakteristiği olan tipik göz oluşumundan da PAB sorumludur. Ayrıca bu ürünlerin tat oluşumuna PAB yukarıda belirtildiği gibi propiyonik asit ve asetik asit oluşturarak katkıda bulunurlar [5-8].

PAB diğer bakterilerden farklı olarak homojen bir taksonomik grup oluştururlar. Bu sınıf için önerilen 16S rDNA temelli dizilimdir. PAB *Propionibacteriaceae* ailesi içinde yer alan *Propionibacterineae* alt takımında yer alırlar. En yakın taksonomik akrabaları *Propionibacteriaceae* ailesinde bulunan *Luteococcus*, *Microlunatus* and *Propioniferax* cinslerinin üyeleridir.

Tablo 2. Süt ve süt ürünleri kaynaklı propiyonik asit bakterileri [10]

Türler	Eski isimleri veya orijinal isimleri	İzolasyon Kaynağı
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i> <i>P. shermanii</i> <i>P. globosum</i> <i>P. orientum</i> <i>P. colaratum</i>	Çiğ süt İsviçre peynirleri Diğer süt ürünleri
<i>Propionibacterium jensenii</i>	<i>P. jensenii</i> <i>P. rafinosum (saceum)</i> <i>P. technicum</i> <i>P. peterssonii</i> <i>P. zeae</i>	Süt ürünleri Silaj Enfeksiyonlar
<i>Propionibacterium thoenii</i>	<i>P. thoenii</i> <i>P. rubrum</i>	Emmental peyniri Diğer süt ürünleri
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	<i>P. pentasaceum</i> <i>P. arabesum</i>	Süt ürünleri
<i>Propionibacterium cyclohexanicum</i>	-	Bozulmuş portakal suyu
<i>Propionibacterium coccoides</i>	-	Süt ve taze peynir

PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİ'NİN İZOLASYONU ve İDENTİFİKASYONU

İzolasyonda ve Sayımda Kullanılan Seçici Besiyerleri

PAB'nin izolasyonunda (genellikle peynirden), birkaç besiyeri kullanılmasına rağmen, en popülerleri YEL (yeast ekstrakt laktat) besiyeridir. PAB diğer bakterilere oranla

Propionibacterium sınıfının genel olara kabul görmüş türleri Tablo 1'de verilmiştir. Yeni bir tür olan *P. cyclohexanicum* klasik PAB'ne dahil edilmektedir, çünkü gıdalardan izole edilmiştir ve patojen değildir. Klasik PAB'nin izolasyon kaynakları ve eski isimleri ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. *Propionibacterium* sınıfında yer alan türler [1, 9]

Klasik bakteriler	Deri kökenli bakteriler
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. cyclohexanicum</i>	<i>P. avidum</i>
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. granulosum</i>
<i>P. jensenii</i>	<i>P. lymphophilum</i>
<i>P. thoenii</i>	<i>P. propionicum</i>

PAB'nin izolasyonu zor ve zaman alıcıdır. PAB'nin iki grubu da büyük öneme sahip olduğundan gerek starter kültür, gerek potansiyel patojen olarak hızlı bir identifikasyon aşaması gerekmektedir. İşte, moleküler metotlar bu gereksinimden doğmuştur. Bu yöntemlere örnek olarak ribotiplendirme, RAPD (rastgele çoğaltılmış poimorfik DNA analizi), PCR analizi, MPCR (çoklu PCR), PFGE (darbeli alan jel elektroforezi) verilebilir [1, 11,12].

Bu derlemenin amacı son zamanlarda sıklıkla yararlanılan bu moleküler yöntemlerin süt ve süt ürünlerinden PAB'nin izolasyonu ve identifikasyonunda kullanımını aydınlatmak ve konuya gıda mikrobiyolojisi açısından dikkat çekmektir.

sayımı için kullanılan bazı besiyerleri ve bileşimlerinde yer alan önemli maddeler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. *Propionibacterium* genusu türlerinin izolasyonu ve sayımı için kullanılan besiyerleri [13]

Parametre	YEL ¹	YELA ²	PYG ³	TLA ⁴	ASLA ⁵
Karbon kaynağı	Laktat	Laktat	Glukoz	Laktat	Laktat
Vitamin kaynağı	Triptikaz	Triptikaz	Triptikaz	Triptikaz	Amonyum sülfat
Oligoelement	Maya ekstratı	Maya ekstratı	Maya ekstratı	Biotin PAB	Pantotenat, Tiamin
Diğerleri	Mn	Mg	-	Mn, Mg, Fe	Mn, Mg, Fe
Azot kaynağı	-	-	Sistein, Tween 80	Sistein	Sistein
pH tampon	Fosfat-7.0	Fosfat-6.0	CO ₃ HNA	Fosfat-6.5	Fosfat-6.5

1: YEL: Yeast ekstrakt laktat, 2: YELA: Yeast ekstrakt laktat agar, 3: PYG: Pepton yeast ekstrakt glukoz broth, 4: TLA: Triptikaz laktat agar, 5: ASLA: Amonyum sülfat laktat agar

Fermente süt ürünlerinden özellikle peynirden PAB'nin izolasyonu sırasında özel bir sorunla karşılaşmamaktadır. Anaerobik jarların kullanımı ya da benzer tekniklerin sodyum laktat içeren ortamları PAB'nin iyi gelişmesine imkan vermektedir. PAB'nin deneysel tanımlanması, saf kültürlerin laktattan asit üretme yetenekleri, katalaz pozitif olmaları ve sıvı besiyerlerinin üst kısımlarında gelişmemeleri ile karakterizedir.

Ancak PAB'nin izolasyonunda bazı problemler de yaşanabilmektedir. Örneklerde diğer organizmaların olup olmasına göre PAB kolay ya da zor izole edilebilirler. PAB için rekabetçi floranın laktik asit bakterileri olduğu sert ve yarı sert peynirler diğerlerine nazaran çalışılması daha rahat örneklerdir. Kloksasillin ilave edilmiş YEL broth'dan PAB'nin saf kültürleri kolaylıkla izole edilebilir. Eğer rekabetçi flora PAB'nden çok daha çabuk gelişirse problemler ortaya çıkmaktadır. Aynı besiyerinde özellikle çiğ süttten izole edilen Enterokoklar iyi gelişmektedir. Besiyerine kloksasillin harici antibiyotiklerin ya da diğer inhibe edici substratların katılması genellikle mümkün değildir, çünkü PAB bu bileşiklere Enterokoklardan çok daha hassastır.

Süt ve süt ürünlerinden PAB'nin izolasyonu ile ilgili olarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara bir örnek verecek olursak; peynirden gerekli miktarda örnek YEL broth içerisinde çözündürülmüş ve stomacherda 5 dakika öğütülmüştür. Seri dilüsyonlar YEL brothda hazırlanmış ve YEL ağıra alınmıştır. Muhtemel hücre kayıplarını en aza indirmek için dilüsyon sıvısı olarak YEL broth kullanılmıştır. Bir haftadan fazla süren anaerobik inkübasyonun ardından tipik koloniler (plak başına 50, her bir izolasyon için 200) seçilmiş ve koloni hibridizasyonu için hazırlanmıştır. Spesifik gen problemleri ile hibridizasyonun ardından saf kültür elde etmek için izolatlardan alınan tek koloniler taze besiyerine üç defa aktarılmıştır [1].

PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİNİN İDENTİFİKASYONU

Klasik Metotlarla İdentifikasyon

Kemotaksonomi ve koloni morfolojisine dayalı metotlar PAB'nin identifikasyonunda en yaygın kullanılan uygulamalar: Katalaz aktivitesinin saptanması, Gram boyama ya da mikroskopi gibi basit test reaksiyonlarıdır. Ancak bu analizlerin uygulanması ve sonuçların

alınması sırasında bazı önemli problemler çıkabilmektedir. Örneğin PAB'nin Gram boyama testlerine farklı reaksiyon gösterebildiği noktasına dikkat edilmelidir. Söz konusu durumda Gram boyama yerine KOH testi yardımcı olabilmektedir. Ayrıca karakteristik propiyonik asit ve asetik asit üretimi sınıfı belirlemede en kolay yoldur. Bazı araştırmacılar kemotaksonomiyi kullanarak bu grubu beşe ayırmışlardır. Fakat *P. avidum* ve *P. granulosum* türleri bu gruba dahil değildir. Karbonhidrat fermantasyon modellerine dayanan sayısal sınıflandırmanın kullanılması, PAB'nin karakterize edilmesinde geçerliliğini koruyan bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır [14].

Moleküler Metotlarla İdentifikasyon

Son dönemlerde, moleküler metotlara dayanan tanımlama teknikleri PAB'nin belirlenmesinde de ön plana çıkmıştır. Çünkü, *Propionibacteria* türlerinin geleneksel yöntemlerle identifikasyonu yavaştır ve bazı türleri kesin olarak belirlemede zorluklarla karşılaşılabilir. Bu teknikler çoğunlukla 16S rDNA genlerinin amplifikasyonuna dayanmaktadır. Bunların ardından klonlama ve sıralama analizleri, teorik olarak örnekteki tek bir DNA molekülünü saptamaya yaramaktadır.

Süt ürünlerindeki propiyonik asit türlerinin güvenilir ve hızlı metotlarla belirlenmesi doğal flora türlerinde de olduğu gibi kolay değildir, fakat identifikasyon DNA prob tekniklerini kullanarak kolaylaştırılabilir ve hızlandırılabilir. Problar tek iplikli, radyoaktif ve nonradyoaktif maddelerle işaretlenmiş, örnek materyallerde kendine özdeş tek iplikli DNA veya RNA ile kolayca birleşebilen kısa oligonükleotit sekanlarıdır. PCR yönteminde işaretli problemlerin kullanılmasıyla tanı çok kolay hale gelebilmektedir.

Ayrıca PAB'nin kromozom büyüklüğü PFGE (darbeli alan jel elektroforezi) kullanılarak belirlenmektedir. Bu metot bazı klasik PAB'nin tür bazında belirlenmesinde kullanılmaktadır. Klasik türler arasındaki farklar ribotiplendirme kullanılarak belirlenmiştir [11, 12]. Ayrıca, RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) tekniği türlerin ayrımının yapılabilmesi için incelenmektedir [15]. Bahsedilen moleküler metotlar kullanılarak PAB'nin sınıf, tür, alt tür ve suş bazında identifikasyonu mümkündür.

Sınıf Düzeyinde İdentifikasyon

Çeşitli araştırmalar sonrasında PAB'nin sınıf düzeyinde identifikasyonu için farklı hibridizasyon problemleri önerilmiştir. Örneğin, PAB için RDR514 primeri test edilmiş ve *P. acnes*, *P. avidum*, *P. lymphophilum* ve *P. granuloso* belirlemek amacıyla hibridizasyon probu olarak kullanılmıştır [16]. Fakat bu primerler klasik türlerde test edilmemiştir. Söz konusu primerler klasik türlerde belirgin olumsuzluklar göstermektedir. Örneğin eğer primer belirli bir uzunluğun üzerindeyse (25bp), PCR için pek uygun olmayabilir. Kısa problemler işlerin otomasyonuna çok daha uyumludur. Çünkü uzun problemlerden çok daha hızlı hibride olurlar ve genellikle işlenmeleri daha kolaydır. *Propionibacterium* için 16S rDNA problemleri kullanılmaktadır [14], fakat bunlar sınıflar için spesifik değildir. Ancak bir çalışmada [1] sınıf spesifik primeri *gd1* (5'-TGCTTCGATACGGGTGAC-3') ve MPCR stratejisi geliştirilmiştir. *Gd1*'in hibridizasyon probu olarak kullanılması PAB'nin peynir örneklerinden izolasyonuna olanak vermiştir.

Tür Bazında İdentifikasyon

Klasik PAB'nin identifikasyonu için ribotiplendirme ya da 16S rDNA, 23S rDNA ve intergenik 16S-23S rDNA bölgesinin PCR ürünlerinin restriksiyon analizi gibi metotlar kullanılmaktadır [14, 17, 18]. Her bir klasik *propionibacteria* türünün PCR tespiti için spesifik oligonükleotit primerleri kullanılmaktadır (*P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii* ve *P. thoenii*) [19].

PAB'nin problemler bazında 16S-23S rDNA bölgeleri *P. freudenreichii*'nin belirlenmesinde belirli bir yere kadar kullanılmaktadır. Bu problemler aynı zamanda diğer türlerin belirlenmesi için de yararlanılabilir. Fakat tüm PAB türlerinin yeterli spesifiklikte belirlenmesi için problemlerin dizin uzunluğu her bir hibridasyonda yeterli olmalıdır. Hibridizasyona dayalı metotun temel avantajı bakteri kolonilerinin direk sayımına imkan vermesidir.

Klasik PAB'nin identifikasyonunda kullanılan protein profillerinin karşılaştırmalı analizi gibi diğer metotlar da iyi sonuçlar vermektedir [18]. Fakat bu metot diğer bazı metotlarda olduğu gibi saf *Propionibacterium* kültürleri kullanmayı gerektirmektedir. PAB'nin karışık kültürlerinden farklı türlerin identifikasyonu için sadece PCR ya da hibridizasyon tekniği yeterli olmaktadır [1].

P. freudenreichii'nin Alt Türlerinin İdentifikasyonu

Bilindiği gibi *P. freudenreichii* peynir üretiminde starter kültür olarak çok önemlidir. *P. freudenreichii*'nin alt türleri olan *ssp. freudenreichii* ve *ssp. shermanii* laktoz fermantasyonu yoluyla ayrılabilir, çünkü sadece *ssp. shermanii* laktozu fermente edebilmektedir. Tilsala-Timisjarvi ve Alatossava'nın [15] çalışmalarında protein profillemesi ya da 23S rRNA gen restriksiyon analizi yoluyla bu iki alt türün ayrımı yapılamazken, ribotiplendirme metodunun uygun olacağı belirtilmiştir. Ayrıca de Carvalho ve ark.'nın [12] çalışmasında ribotiplendirme metodu kullanılarak *P. freudenreichii* nin *P. freudenreichii subsp. freudenreichii* ve

P. freudenreichii subsp. shermanii olarak iki alt türe ayrılması sağlanmıştır.

Suş Bazında İdentifikasyon

Moleküler metotlar kullanılarak aynı türün ayrı suşları arasındaki farklılıklar belirlenebilmektedir. PFGE (darbeli alan jel elektroforezi) en popüler metottur. Bu metot genomdaki özel restriksiyon enzimlerinin seyrek tanımlama bölgelerinin ayrımı prensibine dayanmaktadır ve yüksek oranda tekrarlanabilir bir yöntemdir. Ayrıca RAPD de suş bazında identifikasyon için kullanılabilir. Ancak RAPD sadece diğer metotların yokluğunda kullanılmalıdır, çünkü sonuçlar farklı laboratuvarlarda farklı çıkabilmektedir [1].

SONUÇ

Süt teknolojisinde çok önemli yerleri olan bu bakterilerin süt ürünlerinde kullanımı tuz, asitlik gibi özel şartlar gerektirmektedir. PAB İsviçre tipi peynirlerde karakteristik mikroflora içinde yer alırlar, reoloji ve aroma oluşumunda çok büyük etkileri vardır. Yöresel peynirlerimizden olan Mihaliç peynirinde de göz yapısı ve tipik tat-aroma PAB'nin faaliyetleri sonucunda oluşmaktadır. PAB laktatı fermente edip gaz oluşturarak Mihaliç peynirine karakteristik özelliklerini vermektedir [20, 21]. Ayrıca PAB sert ve yarı sert peynirlerde koruyucu özellikleri ve olgunlaşmaya katkısı nedeniyle de kullanılabilir. PAB'nin gerek kendileri gerek lizat preparatları yoğurt, eritme peyniri ve taze peynir gibi ürünlerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Gerek destek kültür gerek koruyucu olarak süt teknolojisinde önemli yeri olan PAB'nin izolasyon ve identifikasyonu temel anlamda güçtür. Bakteri tanımlamada hızlı yöntemlere eğilim PAB'nin de identifikasyonunu bir ölçüde kolaylaştırmıştır. Ancak mikrobiyolojide çağ atlama olarak kabul edebileceğimiz genetik tanımlama yöntemlerinin özellikle PAB alanında olan çalışmaları çok yenidir ve daha çok çalışmayla desteklenmesi gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Dasen, G.H., 1998. Molecular identification and applied genetics of *propionibacteria*. Doctorate Thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 100p.
- [2] Steffen, C., 1973. Lochbildung und vielsatz. *Schweizerische Milchzeitung* 99: 487.
- [3] Deborde, C., 2002. *Propionibacterium* spp. (pp. 2330-2339). In: Roginski, H., Fuguay, J. W. Fox, P. F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, London.
- [4] Cummins, C. S., Johnson, J. L., 1981. The genus *propionibacterium* (pp: 1884-1902). In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A., Balows, H. G. Schegal, (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Springer-Verlag, New York.
- [5] Chamba, J. F., Irlinger, F., 2004. Secondary and adjunct cultures (pp: 191-206). In: Fox, P.F., Mc Sweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P.

- (Eds.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, *Elsevier Applied Science*, London.
- [6] Dherbécourt, J., Thierry, A., Madec, M-N., Lortal, S., 2006. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analyses, peptidoglycan hydrolase and biochemical profiles for rapid dairy propionibacteria species identification. *Research in Microbiology* 157: 905-913.
- [7] Kerjean, J-RA., Condon, S., Lodi, R., Kalantzopoulos, G., Chamba, J-F., Suomalainen, T., Cogan, T., Moreau, D., 2000. Improving the quality of European hard cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria. *Food Research International* 33: 281-287.
- [8] Thierry, A., Maillard, M-B., Herve, C., Richoux, R., Lortal, S., 2004. Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmantel cheese, *Food Chemistry* 87: 439-446.
- [9] Bourgeois, C.M., Larpent, J. P., 1996. Microbiologie Alimentaire, Aliments fermentes et fermentations alimentaires. Tome 2. 2. Ed. Collection science et techniques agroalimentaires. Lavoisier.
- [10] Gürsoy, O., Kesenkaş, H., 2011. Peynir Mikrobiyolojisi. Peynir Biliminin Temelleri, Editörler: Adnan, A., Özer, B., Sidas Medya Ltd. Şti. Çankaya, İzmir, s79-110.
- [11] Riedel, K.H-J., Britz-T.J., 1996. Justification of the classical *Propionibacterium* species concept by ribotyping. *System. Appl. Microbiol.* 19: 370-380.
- [12] de Carvalho, A. F., Gautier, M., Grimont, F., 1994. Identification of dairy propionibacterium species by rRNA gene restriction patterns. *Res. Microbiol.* 145: 667-676.
- [13] Kılıç, S., 2010. Süt Mikrobiyolojisi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Sidas Yayınları, İzmir.
- [14] Riedel, K.-H.J., Wingfield, B.D., Britz, T.J., 1994. Justification of the "classical" *Propionibacterium* species concept by restriction analyses of the 16S ribosomal RNA genes. *System Appl. Microbiol.* 17:536-542.
- [15] Tilsala-Timisjarvi, A., Alatossava, T., 2001. Characterization of the 16S-23S r RNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 68: 45-52.
- [16] Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leon, D., 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32: 335-351.
- [17] Riedel, K.-H.J., Wingfield, B.D., Britz, T.J., 1998. Identification of classical *Propionibacterium* species using 16S rDNA restriction fragment length polymorphism. *System. Appl. Microbiol.* 21: 419-428.
- [18] Fessler, D., 1997. Characterization of *Propionibacteria* in Swiss raw milk by biochemical and molecular-biological methods. Thesis No: 12328. ETH Zürich, Switzerland.
- [19] Rossi, F., Torrani, S., Zapporoli, G., Ellaglio, F., 1998. Use of different genetic methods for typing of dairy *propionibacteria*. *Poster presentation 2. International symposium on propionibacteria*, Cork, Ireland.
- [20] Şen, M.K.C., 1991. Mihaliç Peyniri'nin Mikrobiyolojik, Kimyasal ve Fiziksel Kalitesi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 102 s.
- [21] Bulut, B., 2006. Çiğ ve Pastörize Sütten İşlenen Mihaliç Peynirlerinin Kimyasal Bileşimi ve Olgunlaşma Sırasındaki Mikrobiyal Florasındaki Değişimin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.