

	SAKARYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE		
	e-ISSN: 2147-835X Dergi sayfası: http://www.saujs.sakarya.edu.tr		
	Geliş/Received 24.10.2017 Kabul/Accepted 28.05.2018	Doi 10.16984/saufenbilder.346212	

Sakarya’da geleneksel olarak üretilen bazı yöresel peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF MS Yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi

Eda Kılıç Kanak^{*1}, Suzan Öztürk Yılmaz¹, İpek Mumcuoğlu²

ÖZ

Son yıllarda yöresel peynirler tüketici tarafından daha fazla talep edilmektedir. Ülkemizde lezzetli birçok yöresel peynir vardır. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri bileşikler, peynirlerde dokuyu geliştirir ve nihai ürünün hoş duyuşal profiline katkıda bulunurlar. Bu çalışmada amaç çeşitli yöresel peynirlerin üretiminde ürüne tat, koku, yapı ve görünüm bakımından istenilen nitelikleri kazandıran farklı laktik asit bakterilerini (LAB) ve antibiyotik dirençlerini tespit etmektir. Bu amaçla Sakarya’da üretilen geleneksel peynirlerden LAB’leri izole edilip, MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada geleneksel yöntemle üretilmiş 3 adet peynir örneği ile çalışılmıştır. MALDI-TOF MS analizi ile de 15 suş tür düzeyinde tanımlanarak; izolatlardan 5 tanesi *Enterococcus faecalis*, 4 tanesi *Enterococcus faecium*, 1 tanesi *Lactobacillus paracasei* ve 6 tanesi *Leuconostoc mesenteroides* olarak belirlenmiştir. Tespit edilen bu 15 suşun antibiyotik duyarlılığı incelendiğinde; bu suşların %40’ü vankomisine ve nitrofurantoina, %33’ü gentamisine, %20’si eritromisine ve tetrasikline, %13’ü rifampisine ve kloromfenikole dirençli olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri 1, MALDI-TOF MS 2, yöresel peynirler 3, antibiyotik direnç 4

Identification of lactic acid bacteria isolated from traditionally produced local cheese by MALDI-TOF MS and determination of antibiotic resistants

ABSTRACT

In recent years, local cheeses have been demanded more by consumers. There is a delicious variety of regional cheeses in Turkey. The compounds that produce lactic acid bacteria improve the texture in cheese and contribute to the pleasant sensory profile of the final product. The purpose of this study is to determine the different lactic acid bacteria and their antibiotic resistance that give the desired qualities in terms of taste, odor, structure and appearance of the product in the production of various regional cheeses. For this purpose lactic acid bacteria were isolated from traditional cheeses in Sakarya and identified by MALDI-TOF MS method. In this study, 3 cheese samples produced by traditional methods were used. The 15 strains were identified at species levels as *E. faecalis* (5), *E. faecium* (4), *Lb. paracasei* (1) and *Leu. mesenteroides*

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

¹ Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, edakilic@sakarya.edu.tr

² Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

(6) by MALDI-TOF MS analysis. Antibiotic susceptibility of these 15 strains was investigated. Strains which related to 23 lactic acid bacteria have been found resistant despite of 40% vancomycin and nitrofurantoin, 33% gentamycin, 20% erythromycin and tetracycline, 13% rifampicin and chloramphenicol.

Keywords: Lactic acid bacteria 1, MALDI-TOF MS 2, local cheeses 3, antibiotic resistance 4

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Peynir; sütün, peynir mayası (rennin enzimi) veya organik asitlerle pıhtılaştırılarak, peyniraltı suyunun ayrılmasından sonra pıhtının kesilmesi ve tuzlanması ile elde edilen bir fermente süt ürünüdür. Fermente süt ürünleri üretiminde hammadde olan süt pastörize edilirken, zararlı mikrobiyotaya yanında ürün oluşumu sırasında yararlı olabilecek mikrobiyotaya da yok edilir. Bunların yerine genellikle 2-3 farklı starter kültür katılır.

Fermentasyon süreçlerinde dikkatle seçilmiş suşların starter kültür olarak kullanılması, doğal ve sağlıklı bir ürün elde edilmesine katkıda bulunur. LAB kullanımı ile yapay katkı maddelerinin yerine doğal bileşikler kullanılabilir. Aynı zamanda LAB yeni, farklı ürün sağlayabilir. [1]. Sanayi uygulamaları için en önemli nokta uygun LAB suşlarının seçimidir. Kullanılabilecek starter kültürlerin güvenli bir tanımlama ile spesifik ve net olarak belirlenmesi bu noktada oldukça önemlidir.

Mikrobiyal patojenlerin antibiyotik direncini, özellikle de çoklu ilaca karşı direncini izlemek, potansiyel tehlike değerlendirmesinin önemli bir yönüdür. Antimikrobiyal direncin ana nedeni, insanlarda ve veterinerlik hayvanlarında uygunsuz ve aşırı antibiyotik kullanımınıdır. Son yıllarda, artan küresel ticaret ve seyahat, dünya çapında antimikrobiyal direncin yayılmasını desteklemiştir ve bu nedenle antimikrobiyal direnç, küresel bir halk sağlığı sorunudur. Çoğu çalışmalar sadece patojen bakterilerin değil ayrıca kommensal bakterilerinde antibiyotik direncinin yayılmasında risk taşıdığını göstermektedir. Laktik asit bakterileri gibi kommensal bakteriler, patojenler için direnç genlerinin rezervuarı olarak rol almaktadır [2]. Özellikle Enterococcus cinsi bakterilerden bir kısmının da bazı antibiyotiklere karşı dirençli oldukları yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Söz konusu dirençli suşların gıda zinciri ile yayılması büyük bir risk olarak karşımıza çıkmaktadır [3, 4].

Bu çalışmada amaç çeşitli yöresel peynirlerin üretiminde ürüne tat, koku, yapı ve görünüm

bakımından istenilen nitelikleri kazandıran farklı LAB'lerini tespit etmektir. Bu amaçla Sakarya'da geleneksel peynirlerden LAB'leri izole edilip MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır. Ayrıca izole edilen bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençleri araştırılmıştır.

1.1. MALDI-TOF MS Yöntemi (MALDI-TOF MS Method)

MALDI-TOF MS yönteminde, doğrudan koloni alınarak sisteme yüklenir ve veri tabanındaki protein sekansı ile karşılaştırılarak tanı yapılır. Böylece her mikroorganizma için spesifik olan bir çeşit parmak izi oluşturulmakta ve mikroorganizmaların tanımlanması yapılabilmektedir.

MALDI-TOF MS yönteminin birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi hızlı bir yöntem olmasıdır. Geleneksel yöntemlerde bir mikroorganizmanın tanımlanması birkaç gün sürerken, MALDI-TOF MS yönteminde tanımlama işlemi 1 saat hatta yarım saate kadar inebilmektedir. Ayrıca bu yöntem yeni bir yöntem olmasından dolayı 16S rRNA gen sekansı ile ayrımı yapılamayan, ayrımı zor olan benzer türlerin bile ayrımını yapabilmektedir [5]. Geleneksel yöntemlerle ayrılması zor olan anaerobik, bazı non-fermentatif bakterilerin ve Gram pozitif basillerin ayrımı başarılı bir şekilde yapılabilmektedir [6,7]. Bu sistemin diğer bir avantajı ise maliyet açısından çok uygun olmasıdır. Cihazın ilk alımının dışında örnek başına maliyet, diğer yöntemlere göre oldukça düşüktür. Biyokimyasal testler ile kıyaslandığında mikroorganizma tanısında MALDI-TOF MS yönteminin dört kat daha az masraflı olduğu belirtilmiştir [8].

Avantajlarının yanında bu yöntemin bazı olumsuz özellikleri de vardır. *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* gibi benzer türler tam olarak tanımlanamamaktadır [9, 10]. Bu durum veri tabanında bu iki türe ait yeterli bilgi olmaması ve bu iki bakterinin ribozomal protein sekanslarında yeterli fark olmamasından kaynaklanmaktadır. MALDI-TOF tür saptamasında gayet başarıyla alttürlerin saptanmasında şimdilik çok güvenilir

bulunmamaktadır. Anaerobik bakterilerde de yeterli veri olmadığı için başarılı tanımlama %50'nin altına düşmektedir[11].

2. MATERYAL VE METOT (MATERIAL AND METHODS)

2.1. Materyal (Material)

Araştırmada LAB'lerinin izolasyonu için Sakarya'dan; Çerkez peyniri, Tulum peyniri ve Lavaş peyniri olmak üzere toplam 3 adet geleneksel yöntemlerle üretilen yöresel peynir temin edilmiştir. Örnekler laboratuvara getirilinceye kadar steril örnek kaplarında 4°C'de saklanmış ve Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılmıştır. İzolatlar elde edildikten sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji bölümünde MALDI-TOF MS yöntemi ile moleküler tanımlama yapılmıştır. Kullanılan bakterilerin saflaştırılmış izolatları %20 gliserol içeren ilgili besiyerlerinde -80 °C'de saklanmış ve her analiz öncesinde izolatlar aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır.

2.2. Peynir örneklerinden laktik asit bakterisi izolasyonu (Isolation of lactic acid bacteria from cheese samples)

Bakteri izolasyonu için peynirlerden aseptik koşullar altında 10'ar gram tartılarak 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) çözeltisi ilave edilerek steril stomacher poşetlerinde homojenizatör (Wiggen-Hauser) ile 2 dakika homojenize edilmiştir. Fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanılarak 10⁻⁶ seyreltiye kadar dilüsyon serisi hazırlanmıştır. 10⁻⁶'ya kadar hazırlanan dilüsyonlardan 10⁻⁴ ve 10⁻⁶'lık dilüsyonlardan 0,1'er mL alınarak M17 ve MRS besiyerine aktarılmıştır. Aseptik koşullar altında drigalski spatülü ile örnekler homojen bir şekilde yayılmış, 30°C' de 24-48 saat süreyle anaerobik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda morfolojik olarak farklılık gösteren tipik koloniler seçilerek izolasyon gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolatlar saflık kontrolleri yapıldıktan sonra, Gram boyama ve katalaz testleri de yapılarak tanımlama işlemine geçilmiştir [12, 13, 14].

Gram negatif ve katalaz pozitif olan izolatlar, LAB'si olmadığından dolayı elenmiştir ve geriye kalan izolatlar için MALDI-TOF MS ile tanımlamaya devam edilmiştir.

2.3. MALDI-TOF MS yöntemi ile bakterilerin tanımlanması (Identification of bacteria by MALDI-TOF MS method)

MALDI-TOF MS yönteminde mikroorganizmaların protein, peptit ve şeker gibi biyomolekülleri ve polimer, dendrimer ve makromolekül gibi büyük organik molekülleri lazer atışları ile elektromanyetik uçuş tüpünden geçirilmektedir. Lazer atışları yardımıyla matriks ışığı emer ve örnekteki moleküller iyonize hale gelerek cihazın içinde molekül ağırlığına göre uçmaya başlar. Kütleleri ile orantılı hız kazanan iyonlar detektöre farklı zamanda çarparak farklı sinyaller elde edilir. Böylece elde edilen sinyaller proteinlerin kütle spektralarını oluşturmaktadır. Oluşan bu spektrumların görüntüleri de sistemin veri tabanındaki veriler ile karşılaştırılarak mikroorganizmalar hem cins hem de tür bazında tanımlanabilmektedir[15].

Tanımlama için temel alınan mikroorganizma proteinleri ise hücre içinde bol miktarda bulunan ve orta hidrofobik özellikteki ribozomal proteinlerdir. Genellikle 4-15 kDa aralığında bulunan ribozomal proteinler çevresel koşullardan ve mikrobiyolojik üreme koşullarından çok az etkilenirler. Matriks solüsyonu seçilirken de özellikle bu proteinleri iyonize edecek olan solüsyonların tercih edilmesi gerekmektedir[16]. Matriks solüsyonu da mikroorganizmaların kristalize hale gelmesini sağlamaktadır. 10⁴-10⁶ kob/ml gibi az miktardaki mikroorganizma sayısı bile analiz için yeterli olmaktadır. Dikkat edilmesi gereken nokta ise, kolonilerin 48 saatten daha yaşlı olmamasıdır. Çünkü yaşlanan kültürlerde ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu azalmaktadır. Bu durum ribozomal proteinlerin parçalanmasından kaynaklanmaktadır [5].

Araştırma kapsamında izole edilen 15 bakteri izolatu Trypticase Soy Agar (TSA)'da 24 saat 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Burada izolatların kullanılmadan önce 24 saatlik kültür olması önemlidir. Besiyerinde gelişen koloniden kürdan ucuyla örnek alınarak MALDI-TOF plağına sürülmüştür. Her bakteri izolatu ayrı plaktaki ayrı kuyucuğa sürülmüştür. Üzerine %70'lik formik asitten 1'er µL eklenerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra matriks (HCCA: siyano-4-hidroksisanimik asit) solüsyonundan 1'er µL eklenerek tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Plak daha sonra cihaza yerleştirilerek okuma yapılmıştır. Analiz için MALDI-TOF MS (Matriksle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon

Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi, Bruker, Almanya) kullanılmıştır. Ölçüm sonuçları 0-3 arasında değerler olarak verilmektedir. Buna göre 2'den büyük olan skor değerleri cins ve tür bazında doğru tanımlama olarak kabul edilmekte, değeri 2'den küçük çıkan izolatlar ise tekrar deneyerek tanımlamaları yapılmaktadır [17].

2.4. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi (Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria)

Peynir örneklerinden izole edilen LAB'lerinin antibiyotiklere karşı direncini saptamak için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. LAB suşları, MRS broth'da aktive edildikten sonra antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla, Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile NCCLS doküman M2-A9 önerileri dikkate alınarak, dokuz farklı antibiyotiğe ait antimikrobiyal ilaçlar: vankomisin (VA, 30 mg), kloramfenikol (C, 30 mg), rifampisin (RA, 5 mg), tetrasiklin (TE, 30 mg), eritromisin (E, 15 mg), nitrofurantoin (F, 300 mg), ampisilin (SAM, 5 mg), gentamisin (CN, 10 mg) ve siprofloksasin (CIP, 5 mg) kağıt diskleri kullanılmıştır.

Antibiyotik direnç testi uygulanacak suşlar, MRS agara (Merck) yayma kültürel ekim yöntemi ile ekimleri yapılmış ve besiyeri yüzeyine dispenser aracılığı ile antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saatlik 37 °C' de inkübasyonu takiben antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dikkate alınarak, NCCLS doküman M2-A9 kriterlerine göre bakteri suşları; dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA (CONCLUSIONS AND DISCUSSION)

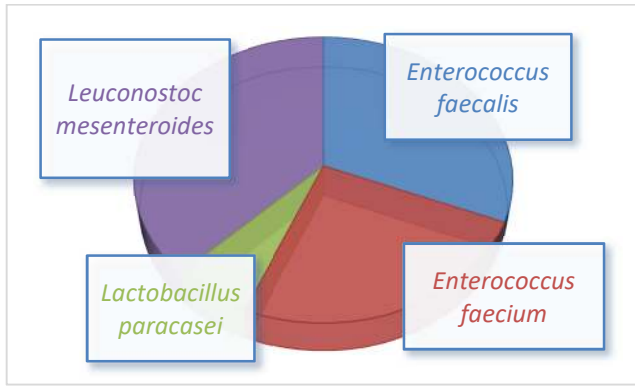
3.1. MALDI-TOF MS yöntemi ile izolatların tanımlanması (Identification of isolates by MALDI-TOF MS method)

Çizelge 1'den görüldüğü gibi 15 izolat MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır. İzolatlardan 5 tanesi *E. faecalis*, 4 tanesi *E. faecium*, 1 tanesi *Lb. paracasei* ve 6 tanesi *Leu. mesenteroides* olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre tüm peynirlerden izole edilen toplam izolatlarda, kokların basillere göre çok daha fazla olduğu görülmüştür.

Tablo 1. MALDI-TOF MS yöntemi ile izolatların tanımlama sonuçları (Table 1. Identification results of isolates by MALDI-TOF MS method)

Çerkez peyniri	İzolat adı
AA1	<i>Enterococcus faecalis</i>
AA2	<i>Enterococcus faecalis</i>
AD1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
AM1	<i>Enterococcus faecalis</i>
Tulum peyniri	
P71	<i>Enterococcus faecalis</i>
P72	<i>Enterococcus faecium</i>
PM1	<i>Enterococcus faecium</i>
PS2	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Lavaş peyniri	
R71	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
R72	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
RA1	<i>Enterococcus faecalis</i>
RA2	<i>Enterococcus faecium</i>
RM1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
RS1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
RS2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Şekil 1'den anlaşıldığı üzere toplam olarak geleneksel yollarla üretilmiş tüm peynirlere bakıldığında zaman %25 oranında *E. faecium*, %31 oranında *E. faecalis*, %38 oranında *Leu. mesenteroides*, %6 oranında *Lb. paracasei* olduğu görülmektedir. Baskın olan türler enterokok olarak tespit edilmiştir. Peynirlerde sık rastlanma nedenlerinin başında, bu bakterilerin yüksek sıcaklık, tuz ve aside toleranslı olmalarından ileri geldiği düşünülmektedir.



Şekil 1. Tüm peynirlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının suşlara göre dağılımı (Figure 1. Distribution of lactic acid bacteria isolates isolated from all cheeses according to strains)

Yapılan bir çalışmada Tomas peynirlerinden izole edilen LAB'nde baskın türün *E. faecium* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak tespit edilmiştir[18].

Daha önce yapılan birçok çalışmada Tulum peynirinde başta *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* türleri olmak üzere farklı enterokok türlerine ait çok sayıda suş tespit edilmiştir [19, 20, 21].

Picante da Beira Baixa [22], Semicotto Caprino [23] ve Bryndza [24] gibi geleneksel peynir türlerinde de izole edilen izolatlar arasında benzer şekilde *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* türlerinin daha fazla oranda olduğu bildirilmiştir[21].

Tüm bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, yapılan bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki bilgiler ile benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada Tablo 1'den anlaşıldığı gibi 3 peynir çeşidinde de Enterokok cinsi bakterilerin tespit edildiği görülmüştür.

Lb. paracasei, ev yapımı olarak üretilen ısı işlem görmüş keçi sütünden üretilen Bukuljac peynirinde[25] ve başka bir çalışmada da Cheddar peynirinde[26] *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ve *Lb. plantarum* baskın tür olarak tespit edilmiştir [27]. Bizim çalışmamızda da köylerde geleneksel yollarla üretilmiş Tulum peynirinde *Lb. paracasei* tespit edilmiştir.

M. Sengül, S. Çakmıkcı [28] ve M. Gurses, A. Erdoğan [29] yaptıkları çalışmada, Tulum peynirlerinden *Lb. paracasei* izole etmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada da Tulum peyniri örneğinden aynı suşun elde edilmesinden dolayı benzerlik göstermektedir.

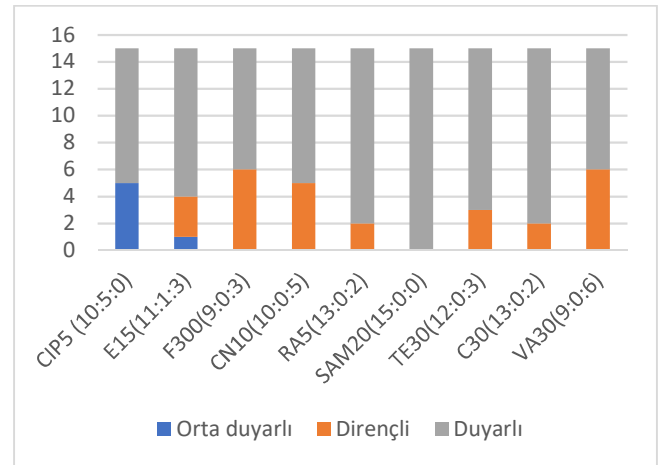
Ülkemizde birçok farklı renk, görünüş ve tada sahip, üretildikleri bölgede sınırlı kalmış

geleneksel peynir vardır. Geleneksel yöntemlerle üretilmiş peynirlerin araştırılması; kültürel mirasın devamlılığına katkı sağlayacak, ayrıca beslenmedeki gıda çeşitliliğini artırmak açısından da yararlı olacaktır.

MALDI-TOF MS yönteminin LAB'lerinin tanımlanmasında çok büyük oranda doğru sonuç vermesi, analizin kısa sürede gerçekleşmesi ve maliyetinin düşük olması gibi çok fazla avantajının olmasından dolayı tanımlama testlerinin bu yöntem ile yapılmasının verimli olacağı tespit edilmiştir.

3.2. Peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençleri (Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from cheese samples)

Çalışılan 15 adet LAB izolatlarından 6 tanesinin vankomisine ve nitrofurantoina, 5 tanesinin gentamisine, 3 tanesinin eritromisine ve tetrasikline, 2 tanesinin rifampisine ve kloramfenikole dirençli olduğu saptanmıştır. Şekil 2'de LABların antibiyotik duyarlılık testi sonuçları görülmektedir. Her sütunun altındaki parantez içindeki üç sayı, farklı renklerde gösterilen hassas, orta derecede dirençli ve dirençli izolatların sayısını gösterir.



Şekil 2. Tüm peynirlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılığı (Figure 2. Antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria isolates isolated from all cheeses)

Clak ve ark. (2004), 101 laktik asit bakterisi izolatının 13 farklı antibiyotiğe karşı dirençlerini Kirby- Bauer disk testi ile saptamışlar. Sonuç olarak, izolatların çoğunun streptomisin, oksasilin, eritromisin ve vankomisine karşı yüksek direnç gösterdiklerini ve beyaz peynirden izole edilen suşların %89.1 streptomisine, %88.1 oksasiline, %93 eritromisin ve %86.1 vankomisine dirençli oldukları bulunmuştur.

Table 2 İzole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık testi sonuçları (Table 2. Antibiotic susceptibility test results of isolated lactic acid bacteria)

	CIP5	E15	F300	CN10	RA5	SAM5	TE30	C30	VA30
AA1	I	S	S	R	R	S	S	S	S
AA2	S	S	S	R	S	S	S	S	S
AD1	S	S	R	S	S	S	S	S	R
AM1	S	S	R	S	S	S	S	S	R
P71	I	I	S	R	S	S	S	S	S
P72	I	S	S	S	S	S	S	S	S
PM1	I	S	S	S	S	S	S	S	S
PS2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R71	S	S	R	S	S	S	S	S	R
R72	S	S	R	S	S	S	S	S	R
RA1	S	R	S	R	S	S	R	S	S
RA2	I	R	S	R	R	S	R	R	S
RM1	S	R	R	S	S	S	R	R	R
RS1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RS2	S	S	R	S	S	S	S	S	R

Suşların %40'ü vankomisine ve nitrofurantoine, %33'ü gentamisine, %20'si eritromisine ve tetrasikline, %13'ü rifampisine ve kloromfenikola dirençli olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, gıda kaynaklı bakterilerin antibiyotik direnç genlerinin kaynaklarından biri olabileceği kuşkusunu destekler niteliktedir. Son yıllarda insan ve hayvanlarda direnç genlerinin ve bakteri dirençlerinin yaygınlaşmasında gıda zincirinin de öncülük ettiği birçok çalışmayla ortaya konmaktadır. Bu nedenle gıdalarda bulunan veya starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri antibiyotik direnç riskine karşı sürekli denetlenmeli ve antibiyotik kullanımı kontrol altına alınmalıdır.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGMENTS)

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 50-01-006 kodlu proje tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

[1] F. Leroy and L. De Vuyst, "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry," *Trends in*

Food Science and Technology, 15(2), 67-78, 2004.

- [2] Lukasova, J., Sustackova, A., "Enterococci and Antibiotic Resistance," *Journal of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno* (72): 315-323, 2003.
- [3] Bertrand, X., Mulin, B., Viel, J. F., Thouverez, M., Talon, D., "Common PFGE Patterns in Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* from Humans and Cheeses," *Food Microbiology*, (17): 543-551, 2000.
- [4] Ammor, M., S., Belén Flórez, A., B., Van Hoek, A.H.A.M., Los Reyes-Gavilán, C.G., A. Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., "Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria," *International Journal of Food Microbiology and Biotechnology*, (14): 6-15, 2008.
- [4] F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, "MALDI MS: A practical guide to instrumentation. in: methods and applications," *John Wiley and Sons*, 345, 2007.
- [5] A. Wieser, L. Schneider, J. Jung, S. Schubert, "MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965-974, 2012.
- [6] S. B. Barbuddhe, T. Maier, G. Schwarz, M. Kostrzewa, H. Hof, E. Domann, T. Chakraborty, T. Hain, "Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry," *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5402-07, 2008.
- [7] A. Mellmann, J. Cloud, T. Maier U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. LaSala, M. Kostrzewa, D. Harmsen, "Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-off light mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non fermenting bacteria," *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946-1954, 2008.

- [8] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, D. Raoult, "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry," *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551, 2009.
- [9] G. Prod'homme, A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, G. Greub, "Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets," *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1481-1483, 2010.
- [10] L. G. Stevenson S. K. Drake P. R. Murray, "Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry," *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), 444-447, 2010.
- [11] A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois, J. Schrenzel, "Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level," *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 1169-75, 2010.
- [12] A. Temiz, *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, Ankara. 291, 2000.
- [13] S. W. Kim, L. Perl, H. J. Park, E. J. Tandianus, W. N. Dunn, W. N. "Assesment of stress response of the probiotic" *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 43: 346-350, 2001.
- [14] F. J. Carr, D. Chill, N. Miada, "The lactic acid bacteria: a literature survey," *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370, 2002.
- [15] J. P. Anhalt, C. Fenselau, "Identification of bacteria using mass spectrometry," *Analytical Chemistry*. 47: 219-25, 1975.
- [16] M. J. Suh, P. A. Limbach, "Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes," *European Journal of Mass Spectrometry*, 10(1), 89-100, 2004.
- [17] N. Özcan, Ö. Ezin, N. Akpolat, H. Bozdağ, M. Mete, K. Gül, "Klinik örneklerde saptanan Candida türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi," *Dicle Medical Journal* 43 (3): 390-394, 2016.
- [18] D. Korucu, "Tomas peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması" Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 32, 2012.
- [19] Z. Öner, O. Sağdıç, B. Şimşek, "Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses," *European Food Research and Technology*, 219, 455-459, 2004.
- [20] Y. Tuncer, "Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese" *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 7008-7016, 2009.
- [21] N. Yoğurtçu, "Tulum peynirinden enterokok suşlarının izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 30-41, 2011.
- [22] A. C. Freitas, C. Paris, F. X. Malcata, T. A. Hogg, "Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese," *Journal of Food Protection*, 59; 155-160, 1996.
- [23] G. Suzzi, M. Caruso, F. Gadrini, A. Lombardi, L. Vanni, M. E. Guerzoni, C. Andrighetto, M. T. Lanorte, "A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino)," *Journal of Applied Microbiology*, 89, 267-274, 2000.
- [24] D. Jurkovič, L. Križkova', R. Dušinsky', A. Belicova', M. Sojka, J. Krajčovič, L. Ebringer, "Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese," *Letters in Applied Microbiology*, 42, 553-559, 2006.
- [25] M. Nicolici, A. Terzic-Vidojevic, B. Jovicic, J. Begovic, N. Golic, L. Topisirovic, "Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's

milk cheese,” *International Journal of Food Microbiology*, 122: 162–170, 2008.

- [26] A. G. Williams, J. M. Banks, “Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (nsLAB) isolated from cheddar cheese manufactured in the United Kingdom,” *Dairy Journal*, 7: 763-774, 1997.
- [27] K. V. Hoorde, T. Verstraete, P. Vandamme, G. Huys, “Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses,” *Food Microbiology*, 25: 929–935, 2008.
- [28] M. Sengül, S. Çakmakçı, “Characterization of natural isolates of lactic acid bacteria from Erzincan (Savak) Tulum cheese,” *Milchwissenschaft*, 58(9-10), 510-513, 2003.
- [29] M. Gurses, A. Erdoğan, “Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period,” *International Journal of Food Properties* (9): 551-557, 2006.