

## Geleneksel Olarak Üretilmi İzmir Tulum Peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve alttür *cremoris*) Su larının izolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Teknikler ile identifikasyonu<sup>\*1</sup>

S. BÜYÜKYÖRÜK<sup>1</sup>, G.E.SOYUTEM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Aydın-TÜRK YE

<sup>2</sup> Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Bursa-TÜRK YE

**Özet:** Bu çalışma, starter kültür kullanılmadan geleneksel usullere göre üretilmi İzmir Tulum peynirinden birtakım fenotipik testler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak laktokok cinsine ait starter bakterilerin izolasyonu amacıyla yapılmı tır. Bu amaçla, 90 adet peynir örne i Aydın ili ve çevresinden toplandı. Mikrobiyolojik ekimler, nalidiksik asit içeren M17 agarda yapıldı. Bu besi yerinde üreyen mikroorganizma sayısının  $1,9 \times 10^7$  –  $2,1 \times 10^8$  kob/g düzeyleri arasında de i ti i gözlemlendi. Her bir peynir örne inden tipik özellikleri gösteren bir koloni safla tırılarak basit biyokimyasal testler uygulandı ve sonuç olarak 36 izolatin laktokok özelli i gösterdi i tespit edildi. Daha sonra 90 adet izolatin hepsi *lactis* ve *cremoris* alttürlerini belirlemek amacıyla alttürlere özgü primerler kullanılarak PZR tekni i ile analiz edildi ve 18 izolatin *lactis* primeri ile ve 11 izolatin da *cremoris* primeri ile pozitif bant verdi i tespit edildi. Ba tan fenotipik testler neticesinde laktokok özelli i gösteren 17 izolat, gerek *lactis* primeri gerekse de *cremoris* primeri ile pozitif reaksiyon vermedi. Fenotipik testler sonucunda laktokok özelli i göstermeyen 10 izolat ise *lactis* primeri ile pozitif bant vermi ve bu izolatlara atipik olarak adlandırıldı. PZR tekni i sonucunda pozitif bant veren izolatlara, daha sonraki çalı malarda kullanılabilmek amacıyla koruyucu ajan olarak %15 gliserollü M17 broth içeren tüplerde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**Anahtar Kelimeler:** identifikasyon, İzmir tulum peyniri, *Lactococcus*, PZR

### Isolation of *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* subspecies *lactis* ve subspecies *cremoris*) Strains from Traditionally Manufactured İzmir Tulum Cheese and Identification by Phenotypical and Molecular Technics

**Summary:** This study was done to isolate strains belonging to the *Lactococcus* genus from İzmir Tulum cheese manufactured according to traditional techniques without using starter bacteria and to identify the isolates by some phenotypic tests and Polymerase Chain Reaction (PCR). For this purposes, 90 cheese samples were collected from Aydın province. M17 agar containing nalidixic acid was used as the medium for the isolation of lactococcal strains. The number of colonies growing on the medium was found to vary from  $1,9 \times 10^7$  to  $2,1 \times 10^8$  cfu/g bacteria. A colony with typical features of each cheese sample purified and subjected to simple biochemical tests. Consequently, it was detected that 36 isolates presented lactococcus profile. Then all 90 isolates were analyzed by PCR by using subspecies-specific primers for defining *lactis* and *cremoris* subspecies and 18 isolates gave positive result with *lactis* primers, whereas only 11 isolates were confirmed by *cremoris* primers. 17 isolates that were identified as *Lactococcus* by simple phenotypic tests did not produce any bands either with *lactis* nor *cremoris* subspecies-specific primers. Ten isolates that were identified as subspecies-*lactis* by PCR had not showed lactococci profile before by the phenotypic tests and classified as atypical lactococci. The isolates confirmed by molecular PCR technique were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  in M17 broth in the presence of 15% (v/v) glycerol as a cryoprotective agent for further study.

**Key Words:** Identification, İzmir tulum cheese, *Lactococcus*, PCR

### Giriş

Fermente gıdaların fermantasyon süreci sırasında istenen nitelikleri kazanmalarında ve daha dayanıklı bir yapıya dönü melerinde laktik asit bakterileri (LAB) etkin bir role sahiptirler (12,13). LAB grubunda yer alan laktokoklar (9,15) Schleifer ve

arkada larının (47) nükleik asit tabanlı yapımı oldukları çalı malar sonucunda yeni bir soy altında toplandı. Bu hücreler, küre ya da oval olup  $0,5-1,2 \times 0,5-1,5 \mu\text{m}$  büyüklü ündedir. Sıvı besi yerlerinde çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunurlar. Gram pozitif olup endo spor olu turmazlar. Hareketsiz ve kapsülsüzdürler. Fakültatif anaerob-turlar. Fermantatif metabolizma ile birtakım karbohidratları fermente eder ve ba lıca L(+)- laktik asit olu tururken gaz olu turmazlar. Katalaz ve oksidaz negatiftirler. Optimal geli me ısısı  $30^{\circ}\text{C}$  olup  $10^{\circ}\text{C}$ 'de geli ebilirken  $45^{\circ}\text{C}$ 'de geli ememektedirler. Genellikle Lancefield serolojik Grup N'de yer almaktadırlar.

Geli Tarihi/Submission Date : 12.05.2010

Kabul Tarihi/Accepted Date : 13.09.2010

\* Bu çalışma doktora çalı masının özetini olup Adnan Menderes Üniversitesi tarafından VTF06- 003 kodlu projesi olarak desteklenmi tir.

<sup>1</sup> Bu çalışma 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (14 -16 Mayıs 2009, Bursa)'nde poster bildirisi olarak sunulmu tur.

*Lactococcus* (*Lc.*) cinsi, *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* ve *Lc. raffinolactis* olmak üzere 5 tür içermekle birlikte (40) Cho ve ark. (10), *Lc. chungangensis* isimli yeni bir tür bildirmiştir. Mevcut taksonomik verilere göre *Lc. lactis* türünün altında *lactis*, *cremoris* ve *hordniae* alttürleri olmak üzere üç adet alttür bulunmaktadır. Bunlardan ilk ikisi özellikle süt endüstrisi açısından önem arz etmekteyken sonuncu türün insektlerde bulunduğu rapor edilmiştir (40). *Lc. lactis* subsp. *lactis* ile *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sularının birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılan fenotipik özellikler, pH 9,2'de, 40°C'de ve %4 tuz varlığında gelişme durumları olarak sıralanmaktadır (13,43).

Laktokoklar, süt ürünlerinin fermantasyonunda özellikle de birçok peynir çeşidinin yapımında ve olgunlaşmasında endüstriyel bazda önem arz eden mikroorganizmalardır (49). Bu ekilde tanımlanmalarında; aroma oluşumuna yeteneğindeki olması (21), bakteriyosin (48) ve ekzopolisakkarit (EPS) oluşumları (28,30,32), bakteriyofajlara olan dirençliliği (46,48), laktoz ve sitrat metabolizmalarındaki üstünlükleri olarak sıralanabilmektedir. (45)

Türkiye'de çok fazla peynir türü bulunmakla birlikte bunlardan 3 tanesi (Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirleri) daha fazla bilinmekte ve ekonomik önemi bulunmaktadır (22). Tulum peyniri Trakya Bölgesi hariç, Türkiye'nin her bölgesinde üretilmekle beraber gerek üretim ve gerekse üretim sonrası olgunlaşma için tırma ekili ve süreleri farklılık göstermektedir. Tulum peyniri yaygın olarak üretildiği yörelere göre farklı isimlerle anılmaktadır. Yaygın olarak bilinenleri Erzincan (avak), Divle, Çimi ve zmir (salamuralı) Tulum peynirleridir (25,52,53). Başka zmir, Aydın ve Manisa illeri olmak üzere Ege Bölgesi'nde üretilen salamuralı tulum peyniri, zmir Tulum peyniri olarak adlandırılmaktadır (53).

Çiğ sütten yapılan peynirlerin mikrobiyal yükünü belirlemek için LAB oluşturmada ve bu bakterilerin identifikasyonu amacıyla, fenotipik özellikleri göz önüne alınarak yapılan testler oldukça zaman almaktadır. Buna ek olarak nükleik asit tabanlı moleküler teknikler geliştirilmiştir (8). Bunlar arasında rRNA restriksiyon analizi (17,29), rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD) (11), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) (41), bakteriyel proteinler için sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jel elektroforesis (39), spesifik primerlerle DNA hibridizasyonu (4) yer almaktadır. Bu gibi metodlar, çok iyi kontrol edilmiş sistemlere ihtiyaç duymakta ve kullanımında birtakım sınırlılıklar bulunmaktadır iken PZR tekniği bu anlamda daha kullanışlıdır. (40)

Süt endüstrisi, sürekli yeni ürün yelpazesi için LAB havuzundan özellikle çiğ süt ve çiğ sütten

yapılan peynirlerden yeni su ürünleri elde etmeyi amaç edinmiştir (42). Bu çalışmada peynir teknolojisi için büyük öneme sahip *Lc. lactis* sularının zmir Tulum peynirinden izolasyonu ve identifikasyonu amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### *Mikroorganizmaların izolasyonu ve Mikrobiyolojik Testler*

Çiğ sütten kültür kullanılmaksızın üretilmiş olan 90 adet zmir Tulum peyniri, Aydın ili ve çevresindeki farklı pazarlardan toplandı ve laboratuvara sokularak zincir altında getirildi. Homojenizasyon işlemi, %2'lik sodyum sitratla yapıldıktan sonra (Bag Mixer), %0,1 pepton (oxid) ve %0,85 tuz (oxid) içeren dilüsyon sıvılarında sulandırma işlemi yapıldı ve 10<sup>6</sup> ve 10<sup>7</sup>'lik dilüsyonlardan, içersinde 40 µg/ml oranında nalidiksik asit (Sigma N4382) içeren M17 agar (Merck 1.15108) çift kat dökme plak tekniğine göre ekildi ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı (13). Bu süre sonunda her bir petri kutusunda üreyen tipik kolonilerden (beyaz-krem renkte, 2-3 mm çapında yuvarlak-eliptik koloni) bir tanesi seçilip 2 kez M17 agar ve M17 brothda (Merck 1.15029) saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi. Saflaştırılan bu izolatların fenotipik karakterlerinin ortaya konulması amacıyla Gram boyama, 10°C'de ve 45°C'de üreme, %2, 4 ve 6,5 NaCl içeren M17 brothda üreme ve katalaz testlerine tabi tutuldu. Bu testlerin ardından Gram pozitif, kok formunda, katalaz negatif, 10°C'de üreyen ancak 45°C'de üremeyen ayrıca %2 ve %4 NaCl içeren besi yerinde üreyen (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*, %2 NaCl içeren besi yerinde üreyebilirken, %4 NaCl içeren besi yerinde ürememekte, *Lc. lactis* subsp. *lactis* ise %4 tuzu tolere edebilmektedir) fakat %6,5 NaCl içeren besi yerinde üremeyen koloniler laktokok olarak kabul edildi. Fenotipik özelliklerine göre laktokok profili gösterebilir ya da gösteremez tüm izolatlar, Pu ve ark. göre (40) PZR tekniğine göre analiz edildi. İzolatlar, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de %15 gliserol içeren M17 broth içinde saklandı.

### *DNA Ekstraksiyonu*

İzolatlar gece boyunca 30°C'de M17 brothda üretildi ve logaritmik fazda olan mikroorganizmanın üremesi için 2 ml'lik eppendorf tüplerinde 5 dakika, 10.000 devir/sn santrifüj edildi (Eppendorf mini plus). Santrifüj sonrası üst kısımda kalan sıvı atıldı ve altta toplanan bakteri peleti, 2 defa soğuk (+4°C) distile su ile yıkanıp tekrar aynı devir ve sürede santrifüj yapıldı, üst sıvı atıldı altta kalan pelet, genomik DNA ayırma kiti (Fermentas, FE-K0512) ile izolasyona tabi tutuldu.

caya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. DNA ayırma protokolü, üretici firmanın talimatları do rultusunda ger çekle tirildi. Referans su lar, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NRRL-B 1821, *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 4432 ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NRRL-B 634, Yüksek Teknoloji Enstitüsünden (Urla-zmir) tem in edildi.

### Oligonükleotitler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalı mada kullanılan HPLC safıa tırlımı oligonükleotit primerler; *Lc. lactis* için (LacreR: GGGATCATCTTTGAGTGAT), *Lc. lactis* subsp. *lactis* için (LacF: G TACTTGTACCGACTGGAT) ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* için (CreF: GTGCTTGCACCGATTGAA) Pu ve ark. göre düzenlenmi tir (40).

### PZR Karı ımının Hazırlanması

Kırık buz üzerinde 2.0 ml'lik reaksiyon tüpünde a a ıdaki karı ım hazırlandı:

*Lc. lactis* subsp. *lactis* için: Bidistile su (31,8  $\mu\text{l}$ ), PZR Buffer (10x konsantrasyonunda, 5,0  $\mu\text{l}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (25 mM, 3,0  $\mu\text{l}$ ), dNTP Mix (10 mM, Fermentas, FE-R0191, 1,0  $\mu\text{l}$ ), Primer 1 (LacreR, 10 pmol/ul, 2,0  $\mu\text{l}$ ), Primer 2 (LacF, 10 pmol/ul, 2,0  $\mu\text{l}$ ), Hot Start Taq polimeraz (5 U/ul, Fermentas, FE-EP0602, 0,2  $\mu\text{l}$ ) ve örnek DNA (5,0  $\mu\text{l}$ )

*Lc. lactis* subsp. *cremoris* için: Bidistile su (31,8  $\mu\text{l}$ ), PZR Buffer (10x konsantrasyonunda, 5,0  $\mu\text{l}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (25 mM, 3,0  $\mu\text{l}$ ), dNTP (10 mM, Fermentas,

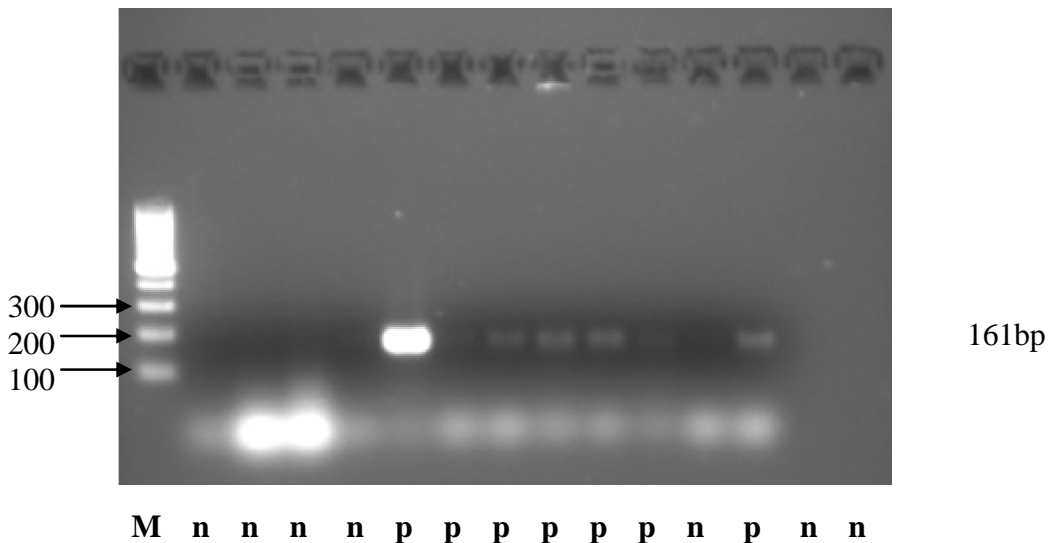
FE-R0191, 1,0  $\mu\text{l}$ ), Primer 1 (LacreR, 10 pmol/ul, 2,0  $\mu\text{l}$ ), Primer 3 (CreF, 10 pmol/ul, 2,0  $\mu\text{l}$ ), Hot Start Taq polimeraz (5 U/ul, Fermentas, FE-EP0602, 0,2  $\mu\text{l}$ ) ve örnek DNA (5,0  $\mu\text{l}$ )

### PZR ve Jel Üzerinde Görüntüleme

PZR için; her bir siklusu  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 40 saniye denatürasyon,  $58^{\circ}\text{C}$ 'de 40 saniye hibridizasyon ve  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 1 dakika tamamlama i lemi 35 siklus olarak uygulandı (40). Bu siklusların ba lamasından önce  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika asıl denatürasyon ger çekle tirildi (Eppendorf Master Cyclor Personal). Bunun ardından PZR ürünleri, TAE elektroforez buffer (Fermentas, FE-B49) içeren %1'lik agaroz jel (Fermentas, Basica Le, HS-8012) üzerinde ilk 5 dakika 90 voltta, sonra 60-75 dakika 60 voltta gö ç ettirildi (ThermoEC 250-90) ve 0.03  $\mu\text{l}/\text{ml}$  etidyum bromür (Fermentas, ZD-A1152) ile boyanarak görüntüledi. Görüntüleme Spectroline TC-312E/F UV transilluminator, kamera pulnix TM-7ETX ve Sony printer kullanıldı. 100 bp artı gösteren DNA marker (Fermentas, FE-SM1143) kullanıldı.

### Bulgular

Toplanan peynir numunelerinin nalidiksik asit içeren M17 agar besiyeri ortamına ekilmesi sonucunda tüm numunelerde üreme ekillendi i tespit edildi. Üreyen mikroorganizma sayısının  $1,9 \times 10^7 - 2,1 \times 10^8$  kob/g düzeyleri arasında de i ti i gözlemlendi. Safıa tırlımı izolatların %2, 4 ve 6,5 tuzda üreme ve  $10^{\circ}\text{C}$  ve  $45^{\circ}\text{C}$ 'de üreme gibi fenotipik



ekil 1: 161 bp boyutunda pozitif bant veren su lar.  
M: Marker, n: Negatif, p: Pozitif

testlere tabii tutulmasıyla birlikte 36 adet izolatin laktokok özelli i gösterdi i tespit edildi. Fenotipik özelliklerine göre laktokok profili gösterebilir ya da göstermesin tüm izolatlara *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ayrımı için PZR primerleri kullanılarak moleküler onaylama i lemne tabii tutuldu ve sonuç olarak tüm izolatlardan 18 tanesinin (%20) *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve 11 tanesinin de (%12,8) *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alttürleri ile 161 base pare (bp) boyutlarında bir bant verdi i gözlemlendi ( ekil 1). Ba tan fenotipik testler neticesinde laktokok profili gösteren 17 izolat, gerek laktis primeri gerekse de kremoris primeri ile pozitif reaksiyon vermemi tir. Fenotipik testler sonucunda laktokok özelli i göstermeyen 10 izolat ise laktis primeri ile pozitif bant vermi ve bu izolatlara atipik olarak adlandırılmı tir.

### Tartı ma ve Sonuç

Bu çalı ma ile zmir Tulum peynirine özgü laktokok florasının identifikasyonu amaçlanmı tir. Standartlarımızda homojenizasyon i leminde %2'lik sodyum sitratın kullanılması gerekti i bildirilmemi tir (1). Fosfat buffer dilüentleri mikroorganizmaların yakalanma ansını azaltmaktadır (9). Laktokokların üremesine en elverişli besi yerinin saptanması amacıyla yapılan çalı malarda ise M17 agarın en iyi oldu u belirlenmi tir (13). Fenotipik özellikleri göz önüne alınarak yapılan identifikasyon i lemleri oldukça zaman aldı ı için (8), fenotipik ve biyokimyasal özellikleri incelendi inde ba tan laktokok olarak üphenilen izolatlara hepsinin laktokok olarak tespit edilmemi olmasından dolayı (31) nükleik asit tabanlı moleküler teknikler geli tirilmemi tir (3, 40). Uzun yıllar boyunca *cremoris* ve *lactis* alttürlerinin birbirinden ayrımında biyokimyasal olarak arjininden amonyak üretim testi kullanılmı tir. Ancak bu test her zaman için güvenilir sonuçlar vermemektedir (19). Çalı mamızda kullandı ımız primerler sadece kendi türlerine özgü DNA ile reaksiyon vermi tir. Bu sonuçlar bu iki alttürün ayrımında PZR'in etkin bir ekilde kullanılabilece i ni göstermektedir.

Bu çalı mada uygulanan fenotipik testlerle 36 izolat tipik *Lc. lactis* profili göstermesine rağmen bu izolatlardan 17 tanesi gerek *Lc. lactis* subsp. *lactis* gerekse de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alttürleri açısından spesifik primerler ile yapılan onaylamada pozitif bir bant vermemi tir. Bu cinste yer alan mikroorganizmalar di er cinslerde, özellikle de enterokok cinsinde yer alan mikroorganizmalar ile fenotipik özelliklerine göre kolaylıkla karı tırılabilmektedir (16). Negatif yanıt veren bu izolatlara laktokok cinsine ait di er mikroorganizma gruplarından da olabilir. Bu durum ayrıca, tür seviyesinde

ayırım için PZR gibi di er ilave analiz tekniklerinin gerekli oldu unun bir göstergesidir. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* genel olarak peynir çe itlerinden daha nadir olarak izole edilen bir türdür (13). Bu çalı mada da benzer ekilde 18 adet *lactis* alttürüne nazaran 11 adet *cremoris* alttürü izole edildi. Ayrıca elde edilen 10 adet atipik laktokok izolata benzer ekilde atipik laktokokları izole etmi olan çalı malar da bulunmaktadır (7, 18, 27, 33, 34, 44, 54).

Ülkemizde tulum peyniri ile ilgili pekçok çalı ma yapılmı tir fakat bunların hemen hemen hepsi Erzincaan avak Tulum peyniri üzerine ve genelde de olgunlaşma süresince paketleme materyalinin (plastik bidon, deri ve cam) duyuşsal kalite üzerine etkisi (5, 25, 38, 50, 51), mikrobiyolojik kaliteleri (14, 37) ve starter kültür kullanımının kalite üzerine etkisi bakımından (2, 6) incelenmi tir. Tulum peynirlerinin olgunlaşma süresi boyunca LAB florasını inceleyen (20), tulum peynirinde bulunan aroma maddelerini saptayan (22) çalı malar da bulunmaktadır. Kılıç ve Gönç (26), zmir Tulum peynirinden yapılmı oldukları izolasyonlar sonucunda *Lactobacillus* (*Lb.*), *Enterococcus* (*E.*) ve *Lactococcus* türlerini yüksek oranda tespit etmi ler ve üretimde starter kültür kullanılacaksa bu grup bakterilerden *E. faecalis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve subsp. *cremoris* ile *Lb. casei* türlerinin seçilmesini uygun bulmu lardır. Öner ve arkadaşları (36), tulum peynirlerinden yapılmı oldukları çalı mada laktobasillerin dominant florayı oluşturu nu tespit ederken laktokokları %15,8 oranında tespit etmi lerdir. Öksüztepe ve arkadaşları (35), tulum peynirlerinde *Streptococcaceae* ailesinde yer alan *Enterococcus* türlerinin, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* ile *Leuconostoc* (*Ln.*) *mesenteroides* subsp. *cremoris*'in olgunlaşma mada ba lıca sorumlu organizmalar olarak bildirmi lerdir.

İleyici ve Akyüz (23), Van Otlu peynirinden yapılmı oldukları çalı mada, laktokok cinsi mikroorganizmaları yüksek oranda identifiye etmi ler ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'i bu peynir yapımında kullanılabilecek starter kültürler arasında göstermi lerdir. Kamber ve Çelik (24) ise Gorcola peynirinden laktokokları  $1,0 \times 10^7$  kob/g gibi yüksek oranda tespit etmi lerdir.

Sonuç olarak; Aydın lı ve çevresinde geleneksel olarak çi süttten üretilen 90 adet zmir Tulum peynirinden elde edilen izolatlardan 36 tanesi fenotipik de erlendirmeler sonucunda pozitif sonuç vermesine rağmen, PZR tekni inden sonra bu 90 izolatin ancak 29 tanesinin (%32,8) *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* açısından pozitif oldu u tespit edilmi tir. Elde edilen bu izolatlara 18 tanesi (%20) *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 11 tanesi (%)

12,8) *Lc. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada ile laktokok alttürlerinin sıklıkla bir şekilde ayırt edilebilmesi için PZR gibi moleküler tanımlama tekniklerinin gerekliliği ortaya konulmuştur. Sonuçlar açısından peynir teknolojisi için vazgeçilmez bir organizma olan laktokoklardan atipik olanların daha etkili olmasından dolayı (% 6,5 tuzda ve/veya 45°C'de üreyebilmesi) bu tiplerin izole edilmiş olması nedeniyle çalışmada daha önemli kılınmıştır.

### Kaynaklar

1. Anonim, Salamura Tulum Peyniri (Zemir Tulum Peyniri), *Türk Standardı TS ICS 67.100.30 TS 11966*, Mart 1996.
2. Ate G, Patır B, 2001. Starter kültürü tulum peynirinin olgunlaşması sırasında duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. *FU Sa Bil Derg*, 15(1): 45-56.
3. Basaran P, Basaran N, Cakir I, 2001. Molecular differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific-PCR. *Curr Microbiol*, 42: 45-48.
4. Beimfohr C, Krause A, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH, 1993. In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci. *System Appl Microbiol*, 16: 450-456.
5. Bostan K, Uğur M, Aksu H, 1992. Deri ve plastik bidonlar içinde satılan tulum peynirlerinin duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Pendik Hayv Hast Merk Ara t Enst Derg*, 23 (1): 75-83.
6. Bostan K, 1991. Tulum Peynirlerinde Starter Kültür Kullanılabilirliği Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programı, İstanbul.
7. Bulut C, Gunes H, Okuklu B, Harsa S, Kilic S, Coban HS, Yenidunya AF, 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *J Dairy Res*, 72: 19-24.
8. Callon C, Millet L, Montel MC, 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J Dairy Res*, 71: 231-244.
9. Carr FJ, Chill D, Miada N, 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28: 281-370.
10. Cho SI, Nam SW, Yoon JH, Lee JS, Sukhoom A, Kim W, 2008. *Lactococcus chungangensis* sp nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58 (8): 1844-1849.
11. Cocconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L, 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and *Enterococci*. *Lett Appl Microbiol*, 21: 376-379.
12. Cogan MT, Barbosa M, Beuquier E, Salvadori BB, Cocconcelli PS, Fernandes I, Gomez J, Gomez R, Kalantzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC, Rodriguez E, 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J Dairy Res*, 64: 409-421.
13. Corroler D, Manguin J, Desmasures N, Gueguen M, 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl Environ Microbiol*, 64: 4729-4735.
14. Çolak H, Hampikyan H, Bingöl EB, Ulusoy B, 2007. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Cont*, 18: 576-579.
15. Dalezios J, Siebert KJ, 2001. Comparison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*, 91: 225-236.
16. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP, 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst Appl Microbiol*, 23: 510-522.
17. Desmasures N, Mangin J, Corroler D, Gueguen M, 1998. Characterization of *Lactococci* isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. *J Appl Microbiol*, 85: 999-1005.
18. Fortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL, 2003. Genetic characterisation of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol*, 20: 397-404.
19. Garde S, Babin M, Gaya P, Nunez M, Medina M, 1999. PCR amplification of the gene *acmA* differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Environ Microbiol*, 65: 5151-5153.

20. Gurses M, Erdogan A, 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. *Int J Food Prop*, 9: 551-557.
21. Hannona JA, Kilcawley KN, Wilkinson MG, Delahunty CM, Beresford TP, 2007. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *Int Dairy J*, 17: 316-327.
22. Hayaloglu AA, Cakmakci S, Brechany EY, Deegan KC, Mcsweeney PLH, 2007. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *J Dairy Sci*, 90: 1102-1121.
23. İyici Ö, Akyüz N, 2009. Van ilinde satılan sunulan Otlu peynirlerde mikrofloranın ve laktik asit bakterilerinin belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 20 (2): 59-64.
24. Kamber U, Çelik TH, 2007. Some microbiological and chemical characteristics of Gorgonzola cheese. *YYÜ Vet Fak Derg*, 18 (1):87-92.
25. Keleş A, 1995. Çiğ ve Pastörize Sütten Üretilen Tulum Peynirinin Farklı Ambalajlarda Olgunlaşma Sürecinin Kaliteye Etkisi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Selçuk Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programı, Konya.
26. Kılıç S, Gönç S, 1992. zmir Tulum peynirinin olgunlaşma sürecinde rol oynayan mikroorganizma gruplarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *EU Ziraat Fak Derg*, 29: 71-78.
27. Klijn N, Weerkamp AH, De Vos WM, 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 61: 788-792.
28. Koçer E, Tekel Ç, Akçelik M, 2004. Conjugal transfer and stability of the plasmids determining exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* strains. *Turk J Vet Anim Sci*, 28: 481-487.
29. Koehler G, Ludwig W, Schleifer KH, 1991. Differentiation of Lactococci by rRNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 84: 307-312.
30. Lin TY, Chien MFC, 2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem*, 100: 1419-1423.
31. Lianez MT, Cordoba BV, Cinco MED, Manzano MAM, Cordova AFG, 2006. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican fresco cheese. *Food Cont*, 17 (9): 683-690.
32. Madiedo PR, Altıng AC, Zoon P, 2005. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *Int Dairy J*, 15: 155-164.
33. Mangin J, Corrolier D, Reinhardt A, Gueguen M, 1999. Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. *J Appl Microbiol*, 86: 514-520.
34. Ouzari H, Hassen A, Najjari A, Ettoumi B, Daffonchio D, Zagorec M, Boudabous A, Mora D, 2006. A novel phenotype based on esterase electrophoretic polymorphism for the differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris*. *Lett Appl Microbiol*, 43: 351-359.
35. Öksüztepe G, Patır B, Çalıcıoğlu M, 2005. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum Cheese. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 873-879.
36. Öner Z, Sağıdıç O, İmrek B, 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *Eur Food Res Technol*, 219: 455-459.
37. Patır B, Ateş G, Dinçoğlu AH, Kök F, 2000. Elazığ'da tüketime sunulan Tulum peynirinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi ile laktik asit bakterileri üzerine araştırmalar. *FU Sağlık Bil Derg*, 14: 75-83.
38. Patır B, Ateş G, Dinçoğlu AH, 2001. Geleneksel yöntemle üretilen Tulum peynirinin olgunlaşma sürecinde meydana gelen mikrobiyolojik ve kimyasal değişimler üzerine araştırmalar. *FU Sağlık Bil Derg*, 15: 1-8.
39. Pot B, Devriese LA, Ursi D, Vandamme P, Haesebrouck F, Kersters K, 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst Appl Microbiol*, 19: 213-222.
40. Pu ZY, Dobos M, Limsowtin GKY, Powell B, 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *J Appl Microbiol*, 93: 353-361.

41. Ramos MS, Harlender SK, 1990. DNA fingerprinting of lactococci and streptococci used in dairy fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 34: 368-374.
42. Rossetti L, Giorgio G, 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Meth*, 63: 135-144.
43. Salama MS, Musafijajeknic T, Sandine WE, Giovannoni SJ, 1995. An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *J Dairy Sci*, 78: 1004-1017.
44. Salama, MS, Sandine, WE, Giovannoni SJ, 1993. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes. *Appl Environ Microbiol*, 59: 3941-3945.
45. Sanchez C, Mayo B, 2003. Sequence and analysis of pBM02, a novel RCR cryptic plasmid from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* P8-2-47. *Plasmid*, 49: 118-129.
46. Anlıbaba P, Akçelik M, 2000. Çiğ süt ve peynir altı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları. *Turk J Biol*, 24: 425-435.
47. Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Balz RK, Collins MD Fischer W, 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol*, 6, 183-195.
48. Shareck J, Choi Y, Lee B, Miguez CB, 2004. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 24 (4): 155-208.
49. Tailliez P, Tremblay J, Ehrlich SD, Chopin A, 1998. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst Appl Microbiol*, 21: 530-538.
50. Tarakçı Z, Küçüköner E, Sancak H, Ekici K, 2005. Çiğ sütünden üretilerek cam kavanozlarda olgunlaştırılan tulum peynirinin bazı özellikleri. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16 (1): 9-14.
51. Tekin en OC, Nizamlı lu M, Keleş A, Atasever M, Güner A, 1998. Tulum peyniri üretiminde yarı sentetik kılıfların kullanılabilirlik imkanları ve vakum ambalajlamanın kaliteye etkisi. *SÜ Vet Fak Vet Bil Derg*, 14 (2): 63-70.
52. Tekin en OC, 2000. *Süt Ürünleri Teknolojisi*. 3. baskı, Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi, ss. 217-218.
53. Üçüncü M, 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. 1. baskı, cilt 2, zmir: Meta basım matbaacılık hizmetleri, 1 (2): ss. 905-915.
54. Ward LJH, Brown JCS, Davey GP, 1998. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett*, 166: 15-20.

#### Yazı ma Adresi

Araştırma Göz. Dr. Sadık BÜYÜKYÖRÜK  
Adnan Menderes Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı,  
Aydın  
Tel No: 0256- 247 07 00- 323  
Gsm: 0506 740 22 34  
Faks: 0256- 247 20 00  
e-posta: sbuyukyoruk@adu.edu.tr