

Van İlinde Satışa Sunulan Otlu Peynirlerde Mikrofloranın ve Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi*

Özgür İŞLEYİCİ¹ Nurhan AKYÜZ²

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD, Van, Türkiye

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Van, Türkiye

Geliş tarihi: 25.05.2009

Kabul Tarihi: 02.08.2009

ÖZET

Van piyasasından toplanan 25 adet Otlu peynir örneği, duyuusal, kimyasal ve mikrobiyolojik yönlerden analize alınmış ve bu peynirin üretiminde kullanılabilecek laktik asit bakterileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Peynir örneklerinde yapılan analizlerde ortalama pH değeri 5.08 ± 0.397 , tuz miktarı 5.69 ± 1.11 , titrasyon asitliği 0.809 ± 0.333 L.A.; kuru madde 47.78 ± 5.06 ; aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı $7.82 \pm 1.04 \log_{10}$ kob/g; koliformlar $2.23 \pm 2.06 \log_{10}$ kob/g; stafilocoklar $3.93 \pm 1.81 \log_{10}$ kob/g; lipolitikler $4.54 \pm 1.14 \log_{10}$ kob/g; proteolitikler $6.05 \pm 1.32 \log_{10}$ kob/g; maya ve küf sayısı $5.81 \pm 1.39 \log_{10}$ kob/g; *Enterococcus* cinsi mikroorganizmalar $2.31 \pm 1.87 \log_{10}$ kob/g; *Lactococcus* cinsi mikroorganizmalar $5.42 \pm 2.39 \log_{10}$ kob/g; *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* grubu mikroorganizmalar $8.08 \pm 0.83 \log_{10}$ kob/g; görünüş puanı 71.36 ± 9.76 ; yapı puanı 74.40 ± 10.58 ; koku puanı 75.68 ± 9.72 ve tat puanı da 75.68 ± 9.72 şeklinde belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonunda, duyuusal özellikler üzerinde olumlu etkilerde bulunan ya da olumsuz etkileri olmayan türlerden *Lb. del. ssp. bulgaricus* ve *Lb. casei*'nin alt türlerinden herhangi birisi ile *E. faecium* ve *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*'in Otlu peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler

Van Otlu peyniri, Mikroflora, Laktik asit bakterileri, İdentifikasyon

Detection of Lactic Acid Bacteria and Microflora of Herby Cheese Sold in Van City

SUMMARY

In the present study, 25 Herby cheese samples sold in markets were analyzed in terms of organoleptic, chemical and microbiological properties and results are given. Results were for pH values, 5.08 ± 0.397 ; for salt amount, 5.69 ± 1.11 ; for titration acidity, 0.809 ± 0.333 L.A.; for dry matter, 47.78 ± 5.06 ; for aerobic mesophilic microorganisms, $7.82 \pm 1.04 \log_{10}$ cfu/g, for coliforms, $2.23 \pm 2.06 \log_{10}$ cfu/g; for *Staphylococcus*, $3.93 \pm 1.81 \log_{10}$ cfu/g; for lipolitics, $4.54 \pm 1.14 \log_{10}$ cfu/g; for proteolitics, $6.05 \pm 1.32 \log_{10}$ cfu/g; for numbers of yeast and mould group microorganism, $5.81 \pm 1.39 \log_{10}$ cfu/g; for *Enterococcus*, $2.31 \pm 1.87 \log_{10}$ cfu/g; for *Lactococcus*, $5.42 \pm 2.39 \log_{10}$ cfu/g; for numbers of *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* group microorganism, $8.08 \pm 0.83 \log_{10}$ cfu/g; for appearance point, 71.36 ± 9.76 , for texture point, 74.40 ± 10.58 ; for smell point, 75.68 ± 9.72 ; and also for taste point, 75.68 ± 9.72 for market cheese mean values respectively. Results in the presents study, has shown that *Lb. del. ssp. bulgaricus*, subspecies of *Lb. casei*, *E. faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* can be used as a starter cultures in Herby cheese.

Key Words

Van Herby cheese, Microflora, Lactic acid bacteria, Identification

GİRİŞ

Otlu peynir, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerimizde, çiğ koyun sütünden üretilen ve sevilerek tüketilen geleneksel bir peynir çeşidimizdir. Telemesine yaklaşık %2 oranında baharat özelliğine sahip otların katılması ve çömlek ya da plastik kaplara konulan peynirin toprağa gömülerek 3-7 ay kadar olgunlaştırılmasıyla Beyaz peynirden ayrılır (Akyüz ve Coşkun 1991; Coşkun 1995). Van İli'nde Otlu peynir imalatının önemli miktarı aile işletmelerinde, istenilen hijyenik şartlara uyulmadan çiğ süt kullanılarak yapılmaktadır (Sancak 1989; Tunçtürk 1991). Bugüne kadar Otlu peynirler üzerinde birçok çalışma yapılmış (Akyüz ve Coşkun 1991; Sancak 1989;

Tarakçı 1997; Yetişmeyen 1997; Yetişmeyen ve ark. 1992) ancak olgunlaşmayı sağlayan mikrofloranın, özellikle de laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyon ve identifikasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma; önemli peynir çeşitlerimizden olan Van Otlu peynirlerinin mikroflorasını, özellikle de önemli laktik asit bakterilerinin türlerini belirlemek ve bu türlerin peynirin duyuusal özellikleri üzerinde etkisi olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla yapılmıştır. Böylece Van Otlu peynirinin modern şartlarda pastörize süttten üretiminde kullanılabilecek bir starter kültür bileşiminin ortaya konulması ve son yıllarda oluşturulmaya çalışılan Otlu Peynir Standardına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu araştırmada; Van İl merkezinde satışa sunulan Otlu peynirlerden alınan 25 örnek materyal olarak kullanılmıştır.

Örneklerin analizlere hazırlanması

Otlu peynir örnekleri steril cam kavanozlara aseptik şartlarda 200 g civarında tartılarak alınmış ve +4 °C'de 1 saat içinde laboratuvara getirilmiştir. Örnekler analizlere alınmaya kadar +4 °C'de saklanmıştır. Cam kavanozlar içinde steril bıçaklarla iyice ufalanan peynir örnekleri kimyasal ve mikrobiyolojik analizler için kullanılmıştır. Mikrobiyolojik analizler için; 90 cc %2'lik (w/v) sodyum sitrat bulunan blender kabına, homojen bir şekilde parçalanmış ve karıştırılan örnekten 10 g tartılarak konmuştur. Blender yardımıyla iyice parçalanmış ve homojenize edilen bu ana dilüsyondan %0.1'lik peptonlu su ile 10⁻⁸'e kadar seri desimal dilüsyonlar hazırlanmış ve bu dilüsyonlar mikrobiyolojik analizlerde kullanılmıştır. Kimyasal analizler için de 200 g alınan ve parçalanarak karıştırılan homojenize örnekten gerektiği kadar alınarak analizler yapılmıştır (Harrigan ve McCance 1976).

Metot

Kimyasal analizler

pH'nın belirlenmesi

Peynir örneğinden 100 ml'lik cam behere bir miktar alınmış ve içerisine pH-metrenin probu sokularak, 45 saniye sonra pH değeri pH-metre'den (NEL® PH 890) okunmuştur (Bianco ve ark. 1972).

Titrasyon asitliğinin belirlenmesi

Bunun için 10 g peynir örneğinden elde edilen süzüntü, fenolftalein indikatörü eşliğinde 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi ile titre edilerek harcanan sodyum hidroksit miktarından peynirin titrasyon asitliği % Laktik Asit cinsinden hesaplanmıştır (Kurt ve ark. 1993).

Kuru madde oranının belirlenmesi

Bu amaçla 5 g peynir örneği porselen krozelere konmuş ve kurutma dolabında 105°C'de yaklaşık 4 saat tutulduktan sonra, çıkarılıp desikatörde soğutulmuş ve tartılmıştır. Bu işlem, krozelerin ağırlığı sabit olana kadar her yarım saatte bir tekrarlanmıştır. Krozelerin ağırlığı sabit hale gelince tartım yapılmış ve % kuru madde oranı hesaplanmıştır (Kurt ve ark. 1993).

Tuz oranının belirlenmesi

5 g peynir tartılmış ve bu peynirden elde edilen süzüntü, potasyum kromat indikatörü eşliğinde 0.1 N gümüş nitrat ile titre edilmiştir. Harcanan gümüş nitrat çözeltisinin miktarından peynir örneğinin tuz oranı hesaplanmıştır (Kurt ve ark. 1993).

Mikrobiyolojik analizler

Aerobik mezofilik mikroorganizma sayımı

Bu amaçla Milk Plate Count Agar (Oxoid CM681B)'a dökme plak yöntemiyle ekim yapılmış ve 32±1 °C'de, 48±3 saat inkubasyondan sonra oluşan tüm koloniler sayılmıştır (Messer ve ark. 1985).

Stafilokok cinsi mikroorganizmaların sayımı

Bunun için Mannitol Salt Agar'a (Oxoid CM085B) dökme plak yöntemiyle ekim yapılmış ve 37 °C'de 48 saat inkubasyondan sonra düzgün, parlak sarı haleli kolonilerle mor ya da kırmızı haleli koloniler sayılmıştır (Baird ve Lee 1995).

Lipolitik mikroorganizmaların sayımı

Bunun için taze saf tereyağı eritilerek adi süzgeç kağıdından süzülmesi ve 1 litreye 50 g olacak şekilde Nutrient Agar'a (Difco 0001-17-0) ilave edilmiştir. Besiyeri sterilize edildikten sonra dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. 30 °C'de 4-7 gün inkubasyondan sonra petri kutularının yüzeyini kaplayacak şekilde Nil Blue solüsyonu konmuş ve 30 dk. beklendikten sonra, gece mavisi zemin üzerinde koyu mavi zon oluşturan koloniler sayılmıştır (Smith ve Alford 1984).

Proteolitik mikroorganizmaların sayımı

Skim Milk Powder (Oxoid L31) ile %10'luk yağsız süt hazırlanmış ve steril Standart Plate Count Agar'a (Oxoid CM463B) %10 oranında ilave edilmiştir. Dilüsyonlardan dökme plak yöntemiyle ekim yapılmış, 21 °C'de 72 saat inkubasyondan sonra petri kutularının yüzeyi %1'lik HCl solüsyonu ile kaplanmış ve 1 dakika beklendikten sonra asit solüsyonu dökülerek petri kutularındaki etrafı açık renkte zonla çevrili koloniler proteolitik koloniler olarak değerlendirilmiştir (Lee ve Kraft 1984).

Koliform grubu mikroorganizmaların sayımı

Bu amaçla Violet Red Bile Agar'a (Oxoid CM107B) dökme plak metoduyla yapılmış ve 32±1 °C'de, 24±2 saat inkubasyondan sonra, koyu kırmızı 0.5 mm çapındaki koloniler koliform grubu mikroorganizmalar olarak değerlendirilmiştir (Koburger ve Marth 1984).

Maya ve küf sayımı

Maya-küf sayımında Potato Dextrose Agar (Oxoid CM139B) kullanılmış, besiyeri sterilize edilmiş ve 50 °C'ye kadar soğutulmuş steril %10'luk tartarik asitle pH'sı 3.5 ±0.1'e ayarlanmıştır. Daha sonra dökme plak metoduyla ekim yapılmış ve 20-25 °C'de 5-7 gün inkubasyondan sonra, petri kutularındaki tüm koloniler sayılmıştır (Koburger ve Marth 1984).

Enterococcus cinsi mikroorganizmaların sayımı

Bu grup mikroorganizmaların sayımında, Slanetz and Bartley besiyeri (Oxoid CM377B) kullanılmış, yayma yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra, petri kutuları 37°C'de 24 saat inkube edilmiş ve kırmızı ile kestane renginde olan koloniler *Enterococcus* cinsi mikroorganizmalar olarak değerlendirilmiştir (Anonymous 1995).

Lactococcus cinsi mikroorganizmaların sayımı

Bu amaçla M17 Agar (Oxoid CM785B) kullanılmış, sterilize edilen 950 ml besiyerine, 50 °C'ye soğutulduktan sonra %10'luk (w/v) hazırlanan steril laktöz solüsyonundan 50 ml. ilave edilmiştir. Dökme plak yöntemiyle ekim yapılmış ve petri kutuları 30 °C'de 48 saat inkube edildikten sonra, oluşan koloniler muhtemel *Lactococcus* cinsi mikroorganizmalar olarak değerlendirilmiştir (Terzaghi ve Sandine 1975).

Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus sayımı

Bu grup mikroorganizmaların sayımında Rogosa Agar (Oxoid CM627B) kullanılmış, eritilen Rogosa Agar 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, glaciyel asetik asit ile pH'sı 5.4'e ayarlanmış, dökme plak metoduyla ekim yapılmıştır. Petri kutularında besiyeri katılaştıktan sonra, üzerleri ikinci bir kat aynı besiyerinden dökülerek örtülmüş ve böylece oksijenle besiyerinin irtibatı kesilmiştir. Çift tabakalı plaklar 30±1 °C'de 5 gün inkube edilmiş ve oluşan koloniler sayılmıştır (Harrigan ve McCance 1976).

Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu ve saflaştırılması
İzolasyon yapılan petri kutularında 30'dan az koloni varsa petri kutusundaki kolonilerin hepsi, 30-300 arasında koloni içeren plaklar ise sekiz eşit kısma bölündükten sonra, büyük yaygın koloni içermeyen kısımlardan bir

tanesindeki tüm koloniler steril bir öze ile alınarak Slanetz and Bartley besiyerinden ve M17 Agar'dan Yeast Glukoz Broth'a (Pepton:10.0 g ; Meat Extract:10.0 g ; NaCl:5.0 g ; D-Glucose: 5.0 g ; Yeast Extract: 3.0 g ; Distile su: 1000 cc.), Rogosa Agar'dan da MRS Broth'a (Oxoid CM 359B) transfer edilmiştir. Üzeri steril mineral oil ile kaplanan MRS Broth ile Yeast Glukoz Broth, 30 °C'de iki gün inkube edilmiştir. Kültürlerin saflaştırılması; bu sıvı besiyerlerinde üreyen kültürlerden yine izolasyonda kullanılan katı besiyerleri ve aynı sıvı besiyerleri kullanılarak tekniğine uygun bir şekilde Harrigan ve McCance, (1976) tarafından verilen kriterlere göre yapılmıştır. Saflaştırılan kültürler burgu kapaklı tüplerdeki saklama besiyerlerine ekim yapılarak stoklanmıştır. Sıvı kültürler identifikasyon testleri için kullanılmıştır. Stok kültürleri kullanılacağına önce yerine yenisi hazırlanarak konmuş, daha sonrada kullanılacak sıvı besiyeri kültürü hazırlanmıştır. Stok kültürler 4 ayda bir yenilenmiştir (Harrigan ve McCance 1976).

Laktik Asit Bakterilerinin karakterizasyonu ve sınıflandırılması

Enterococcus türlerinin identifikasyonu; Harrigan ve McCance (1976), Mundt (1986) ve Tekinşen ile Atasever, (1994) tarafından verilen kriterlere göre, *Lactococcus* türlerinin identifikasyonu; Hardie (1986), Harrigan ve McCance (1976) ile Tekinşen ve Atasever, (1994) tarafından verilen kriterlere göre, *Lactobacillus* cinsi mikroorganizmaların identifikasyonu Kandler ve Weiss (1986), Sharpe (1979), Harrigan ve McCance (1976) ile Tekinşen (1978) tarafından verilen kriterlere göre, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsi mikroorganizmaların tanımlanması da Tekinşen (1978), Garvie (1986), ve Harrigan ve McCance (1976) tarafından verilen kriterlere göre yapılmıştır.

Saflaştırılan kültürlere; Gram boyama, katalaz, glukozdan gaz oluşturma, süütün pıhtılaşmasından önce litmusun indirgenmesi, 10, 15, 40 ve 45 °C'de üreme, %4 ve %6.5 NaCl'de üreme, pH 9.2 ve 9.6'da üreme, %0.1 ve %0.3 metilen mavisinde üreme, β-hemoliz, arginin hidrolizi, nişasta hidrolizi, T.T.C. (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) redüksiyonu, potasyum tellürit redüksiyonu, Voges-Proskauer reaksiyonu, karbonhidrat fermentasyon testleri (L-arabinose, melesitose, sorbitol, sorbose, L-rhamnose, raffinose, glucose, fructose, galactose, mannose, mannitol, lactose, maltose, sucrose, salicin, esculin, cellobiose, trehalose, mellibiose, ribose, xylose) uygulanmıştır.

Bu amaçla uygulanan testler; Harrigan and McCance (1976), Carter (1984), Hartmann ve La Grange (1985), Arda (1985), Koneman ve ark. (1988), Sert (1992) ve Temiz (1994) tarafından bildirildiği şekilde yapılmıştır.

Referans Suşlar

Bu amaçla Unipath Limited, (Wade Road, Basingstoke, Hampshire, R624 8PW. England) firmasından temin edilen *L. fermentum* ATCC® 9338, *L. del. ssp. bulgaricus* ATCC® 11842, *E. faecalis* ATCC® 29212 suşları kullanılmıştır.

Kültürlerin stoklanması ve saklanması

Enterococcus ve *Lactococcus* cinsi mikroorganizmalar yatık olarak hazırlanan Yeast Glucose Agar'da, *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* grubu mikroorganizmalar ise Rogosa Agar'da üretilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Harrigan ve McCance 1976; Temiz 1994).

İstatistiksel analizler

Mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşsal analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde Pearson korelasyon analizinden faydalanılmıştır (Düzgüneş ve ark. 1993).

Duyusal Muayeneler

Peynirlerin duyuşsal muayeneleri, Yetişmeyen ve ark. (1992) tarafından verilen duyuşsal değerlendirme kriterlerine göre, konusunda uzman 5 kişiden oluşturulan bir panelist grubu tarafından yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Otlu peynir örneklerinin analizi sonucu elde edilen kimyasal, duyuşsal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Peynir örneklerinin tamamının titrasyon asitlikleri, %88'inin pH değerleri, %28'inin tuz miktarları, %96'sının da kuru madde oranları yönünden Türk Standardı TS 591'de (Anonim 2006) Beyaz peynirler için verilen standartlara uygun olduğu tespit edilmiştir.

Peynir örneklerinde laktik asit bakterilerinden; *Lb. plantarum* (3.01±3.829 log/g), *Lb. pseudoplantarum* (0.90±2.507 log/g), *Lb. casei* (2.15±3.547 log/g), *Lb. tolerans* (1.45±3.005 log/g), *Lb. del. ssp. lactis* (2.81±3.356 log/g), *Lb. del. ssp. bulgaricus* (1.90±3.470 log/g), *Lb. del. ssp. delbrueckii* (0.24±1.188 log/g), *Lb. fermentum* (0.69±2.378 log/g), *Lb. helveticus* (1.20±2.852 log/g), *Lb. büchnerii* (0.35±1.746 log/g), *Lb. brevis* (0.91±2.540 log/g), *Lb. rhamnusus* (0.22±1.092 log/g), *Leuconostoc* türleri (2.83±3.884 log/g), *Pediococcus* türleri (2.94±3.719 log/g), *E. faecalis* (1.50±2.021 log/g), *E. faecium* (1.50±1.716 log/g), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (2.81±3.356 log/g), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (0.65±1.842 log/g) ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (0.92±2.206 log/g) türleri izole edilmiştir.

E. faecium ile *L. del. ssp. bulgaricus* arasında ve *E. faecalis* ile *Leuconostoc* türleri arasında istatistiksel açıdan önemli (p<0.05) ve pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur. Bu durum türlerin birbirlerinin üremelerini aktive etmelerinden kaynaklanabilir (Medina ve ark. 1995). Ayrıca Enterokoklar oldukça geniş bir pH aralığında üreyebilen, düşük O/R potansiyelindeki (Eh) ortamlarda çok iyi gelişen, %6.5 tuz konsantrasyonunda çoğalabilen, ısıtma, kurutma, dondurma, temizlik ve dezenfeksiyon gibi bir çok dış faktöre karşı oldukça dayanıklı olan mikroorganizmalardır (Kaleli ve Durlu-Özkaya 2000). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ile *Lb. helveticus* arasında p<0.01 düzeyinde önemli bulunan ilişki ise büyük ölçüde bu iki türün, birbirlerinin çoğalmalarını engelleyecek bacteriocin benzeri maddeler sentezlememelerinden ileri gelir. Nitelikim, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in diğer *Lactococcus* türlerinden daha az bacteriocin sentezlediği bildirilmektedir (Geis ve ark. 1983).

Peynir örneklerinden izole edilen laktobasil türlerinden *Lb. plantarum* ile *Lb. cas. ssp. casei* ve *Lb. del. ssp. lactis* arasındaki negatif yönde ve istatistiksel açıdan önemli olan (p<0.05) ilişkinin nedeni; *Lb. plantarum* tarafından üretilen bacteriocinlerin birçok laktobasil üzerine inhibitör etkili olmasından ya da bu mikroorganizmanın diğer laktobasil türleri ile yarışmalı olarak üremesinden kaynaklanabilir (Piard ve Desmazeaud 1992). *Lb. cas. ssp. casei* ile *Lb. del. ssp. lactis* arasında pozitif yönde (p<0.01), *Lb. del. ssp. bulgaricus* ile *Lb. ruminis* arasında pozitif yönde (p<0.01), *Lb. del. ssp. delbrueckii* ile *E. faecium* (p<0.05) ve *Lb. helveticus* ile *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* arasındaki pozitif yönde (p<0.01) ilişkiler; bu mikroorganizmaların birbiri ile sinerjistik üreyebilmelerine bağlanabilir (Morris 1978).

Tablo 1. Peynir örneklerinin kimyasal, duyuusal ve mikrobiyolojik (\log_{10} kob/g) analiz sonuçları**Table 1.** The results of chemical, organoleptic and microbiological (\log_{10} kob/g) analysis of cheese samples

Örn.	PH	Tuz (%)	T.As. (L.A.)	K.M. (%)	Gör.	Yapı	Koku	Tat	A.mz.	Koli.	Staf.	Prot.	Lipol.	M-K	Lac.	Entr.	L.L.P.
1	4.32	7.30	0.44	58.24	68	84	80	64	5.60	<1	1.95	4.99	3.43	2.90	4.26	<1	9.16
2	5.61	5.68	0.52	43.14	80	84	84	82	7.23	<1	2.38	7.49	4.07	5.33	<1	<1	8.89
3	5.14	6.28	0.73	45.13	68	100	100	72	7.89	2.27	4.57	5.26	4.06	5.04	6.68	2.28	8.06
4	5.42	3.74	0.59	41.73	72	64	72	62	7.78	<1	6.18	6.14	4.67	4.88	7.59	4.23	7.43
5	4.32	5.70	1.45	49.87	66	68	88	72	6.82	<1	1.95	6.06	4.41	4.56	4.90	<1	9.24
6	4.33	7.35	1.45	54.16	72	76	80	80	6.08	<1	2.06	3.47	2.06	2.60	4.40	<1	8.69
7	4.87	4.30	1.01	43.94	64	72	84	76	8.31	<1	4.40	7.54	4.71	6.29	6.97	<1	7.96
8	5.09	5.78	0.74	47.13	68	76	88	66	8.38	2.95	4.60	6.45	4.56	6.42	6.48	4.23	8.19
9	4.79	6.93	1.32	52.14	100	76	88	78	6.37	<1	1.00	3.58	2.61	4.60	4.21	<1	6.48
10	5.80	5.16	0.25	49.13	76	84	80	84	8.07	2.34	2.56	6.05	3.61	5.27	4.41	2.21	8.01
11	5.42	6.55	0.45	45.06	76	72	84	80	9.16	5.89	8.71	6.14	5.96	8.00	<1	5.51	6.97
12	4.97	4.33	0.85	44.13	60	64	64	72	9.27	4.31	5.25	7.95	5.61	6.69	8.20	4.07	8.83
13	5.20	5.77	0.93	45.14	80	92	56	100	7.28	<1	3.49	5.61	4.60	6.84	<1	<1	7.71
14	5.24	5.13	0.64	46.12	72	64	72	80	8.99	4.49	6.27	7.29	6.57	7.48	7.89	5.31	8.50
15	5.14	5.48	0.46	48.21	56	68	84	62	8.21	4.70	6.27	6.43	5.50	6.66	<1	3.81	9.29
16	5.32	3.62	0.92	37.32	84	92	76	80	9.19	4.11	3.69	7.26	5.52	7.24	<1	2.24	8.10
17	5.08	5.17	0.76	52.14	76	72	88	70	8.12	2.45	4.04	6.02	4.26	6.31	5.10	3.92	7.62
18	4.89	4.91	1.14	49.12	76	76	92	76	9.31	5.60	5.45	7.61	5.85	6.95	6.95	3.07	9.18
19	5.29	5.59	0.63	46.03	64	64	76	84	8.29	3.61	5.06	6.34	4.77	6.48	7.24	4.59	8.03
20	5.13	4.42	1.11	40.83	68	76	80	74	8.83	4.26	3.59	7.68	5.91	7.46	7.11	2.34	9.34
21	4.65	6.53	0.98	57.34	84	56	100	84	6.94	<1	4.56	5.43	4.57	4.56	<1	<1	8.22
22	5.31	6.44	0.97	45.34	72	76	68	84	7.43	2.26	1.77	4.07	3.26	5.27	5.46	1.86	6.71
23	4.87	6.21	0.94	50.72	64	68	84	82	6.99	<1	2.59	5.18	4.24	6.04	5.09	<1	6.46
24	5.04	7.03	0.72	49.94	60	76	100	76	8.02	3.06	2.57	6.44	3.58	4.83	5.83	<1	8.07
25	5.71	5.09	0.24	48.24	58	60	62	52	6.83	3.45	3.27	4.04	4.06	5.69	<1	2.46	7.60
Ort.	5.08	5.69	0.81	47.78	71.360	74.400	81.200	75.680	7.82	2.23	3.93	6.06	4.54	5.81	5.42	2.31	8.08
S.Hata	0.397	1.108	0.333	5.062	9.7600	10.580	11.370	9.7200	1.037	2.065	1.814	1.319	1.145	1.388	2.392	1.872	0.832

T.As.: Titrasyon Asitliği, K.M.: Kuru Madde, Gör.: Görünüm, A.mz.: Aerobik mezofilikler, Koli.: Koliformlar, Staf.: Stafilkoklar, Prot.: Proteolitikler, Lipol.: Lipolitikler, M-K: Maya ve küfler, Lac.: *Lactococcus*, Entr.: *Enterococcus*, L.L.P.: *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus*.

Lb. del. ssp. bulgaricus ile *Pediococcus* türleri arasındaki negatif yönlü istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) olan ilişki ise *Lb. del. ssp. bulgaricus* tarafından üretilen fazla miktardaki asit ve bulgarican adı verilen bacteriocinin *Pediococcus* türlerini baskılamasına yada *P. acidilactici* tarafından üretilen pediocin AcH adlı maddenin *Lb. del. ssp. bulgaricus*'u baskılamasına bağlanabilir. *Leuconostoc* türleri ile *Pediococcus* türleri arasındaki negatif ($p<0.05$) ilişkinin sebebi, *Pediococcus* türlerinin ürettiği inhibitör maddelerden kaynaklanabilir. Bhunia ve ark. (1988) *P. acidilactici* tarafından üretilen pediocin AcH adlı maddenin birçok patojen mikroorganizmayı, bu aradada *Leu. mesenteroides*'i inhibe ettiğini bildirmişlerdir. İzole edilen laktik asit bakterilerinden bazılarının diğer bazı türleri inhibe ederek antagonistik ürerken diğer bir kısım türlerle sinerjistik üremesi, her laktik asit bakterisinin aside dayanıklılığının aynı olmamasına ve diğer laktik asit bakterilerinin ürettiği bacteriocin benzeri inhibitör maddelerden aynı şekilde etkilenmemesine bağlanabilir. Bu nedenle aynı peynir örneğinde bile bazı türler

sinerjistik bir üreme gösterirken bazıları da birbirini baskılayıcı etki yapmaktadırlar.

Pediococcus türleri ile yapı arasında pozitif yönde ($p<0.05$) bir ilişki bulunmasının sebebi de; *Pediococcus* türlerinin homofermentatif, asit üretebilen, tuza toleranslı ve oksijensiz ortamlarda çoğalabilen türler olmasına, ancak, değişik gelişme faktörlerine ihtiyaç duymalarından dolayı peynirlerde hızlı bir gelişme gösterememelerine bağlıdır. Bu sebeplerle fazla asit üretimi yapamazlar ve yapıyı olumsuz yönde etkilemezler (Turantaş 1998).

Lb. del. ssp. bulgaricus ile yapı arasındaki negatif yöndeki ($p<0.05$) ilişki, *Lb. del. ssp. bulgaricus*'un oldukça fazla miktarda laktik asit üretebilmesine ve bunun da peynir örneklerinde fazla asitlikten dolayı yapı kusurlarına yol açabilmesine bağlıdır (Hardie 1986).

Peynir örneklerindeki pH seviyesi, tuz miktarı, titrasyon asitliği ve kurumadde miktarı gibi kimyasal değerler ile mikroorganizma sayısını ve türlerini etkileyen başlıca faktörler; hammadde olarak kullanılan sütün kalitesi ve

niteliği, pastörizasyon yapıp yapılmadığı, pastörizasyon sonrası kontaminasyonlar, süte uygulanan ısı, ön olgunlaştırma ve telemeye uygulanan ısı ve parçalama işlemleri, peynir üretiminde ve olgunlaştırılmasında kullanılan değişik yöntemler (ambalajlama, starter kültür kullanma, olgunlaşma ısı ve süresi gb.), peynirlerin olgunlaşmalarının değişik zamanlarında satışa sunulmaları, peynirlerdeki asitlik, tuz ve kurumadde miktarları, süt işletmesinde oluşan kontaminasyonlar ve üretimin hijyenik şartlarda yapılmaması gibi faktörlerdir (Akyüz 1983; Garcia ve ark. 1987; Medina ve ark. 1995; Poulet ve ark. 1991). Ayrıca peynir örneklerinde üreyen laktik asit bakterilerinin ürettiği bacteriocin benzeri inhibitör maddeler ve mikrofloranın birbirleriyle olan etkileşimleri mikrobiyal florayı ve bileşimini etkilemektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, yapılan istatistiksel analizlerde, izole edilen laktik asit bakterilerinden hiçbirisinin tek başına Otlu peynirin duyuşal özellikleri üzerinde baskın ve olumlu yönde bir etkide bulunmadığı ortaya konmuştur. Ancak duyuşal özellikler üzerinde azda olsa etkili olan *Lb. del. ssp. bulgaricus* ve *Lb. casei*'nin alt türlerinden biri, seçilen starter kültür bileşiminde kullanılabilir. *Lb. del. ssp. bulgaricus*'un oranı fazla olursa yapı olumsuz yönde etkileneceğinden, oranı iyi ayarlanmalı ve fazla asit üretmeyen soyları kullanılmalıdır. Ayrıca; *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ile Otlu peynirlerde oldukça fazla miktarda üreyen ve diğer mikroorganizmalarla da antagonistik bir etkileşime girmeyen *E. faecium*'un duyuşal özellikleri olumsuz yönde etkilemeyecek oranlarda starter bileşimine katılarak denenmesinin de olumlu sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Nitekim *E. faecium*'un beyaz peynirlerde de olgunlaşma indekslerini olumlu yönde etkilediği ve aroma oluşumuna katkıda bulunduğu ortaya konulmuş ve bu peynir çeşidinde fonksiyonel starter kültür olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Göncüoğlu ve ark. 2009).

Mevcut durumun incelenmesi ve ayrıca yapılan kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal analiz sonuçlarına göre; Otlu peynirler ilkel şartlarda üretilmekte, ambalajlanmakta ve olgunlaştırılmaktadır. Özellikle koliform grubu ve *Enterococcus* cinsi mikroorganizmaların fazla sayıda bulunması ve bunu yüksek aerobik mezofilik mikroorganizma sayısının izlemesi, peynir üretiminde tamamen çiğ süt kullanıldığını ve üretimin hijyenik şartlarda yapılmadığını düşündürmektedir. Bunlara ek olarak yapılan kimyasal analizlerde her ne kadar örneklerin titrasyon asitliği, pH değerleri ve kuru madde oranları büyük ölçüde Beyaz peynir standardında verilen değerlere uygun çıksa da tuz oranları %72 oranında Beyaz peynirler için verilen kriterlerden yüksek çıkmıştır.

Bu nedenle; Otlu peynir üretiminde standart bir metodun ortaya konması, bunun için de Otlu peynirin tanımının, sınıflandırılmasının, işleme tekniğinin, fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal yönlerden standardının oluşturulması ve bu oluşturulacak standarda göre üretim yapıp yapılmadığının kontrol edilmesi zorunludur. Üretimde ISO 22000, GHP (Good Hygiene Practice) ve GMP (Good Manufacturing Practice) uygulamalarının kullanılması daha kaliteli ve hijyenik riski düşük olan Otlu peynir üretiminin sağlanmasına katkıda bulunacaktır.

Otlu peynir yapımında kullanılacak starter kültürü oluşturacak mikroorganizma cins ve türlerinin ve bunların starter kültürdeki oranlarının ortaya konması için, bu araştırmada elde edilen sonuçlar esas alınarak,

tamamlayıcı araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bunun yanında Otlu peynirlerden izole edilen türler tarafından üretilen bacteriocin benzeri inhibitör maddelerinde araştırılması ve hangi mikroorganizmalar tarafından üretildiğinin ve hangi türleri baskıladığının ortaya konulması starter kültür belirleme çalışmalarına olumlu yönde katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- Akyüz N, Coşkun H (1991).** Van Otlu peynirlerinin üretimi ve peynire katılan otların peynirin çeşitli özellikleri üzerine etkisi. "Her Yönüyle Peynir Sempozyumu" *TÜT Zir Fak Yayınları*: 125, s. 200-206. Tekirdağ.
- Akyüz N (1983).** Isının, kültür kullanmanın ve ambalaj işleminin Kaşar peyniri kalite, tat ve aromasına etkileri üzerinde araştırmalar. Doçentlik Tezi (Yayınlanmamış). *AÜ Zir Fak*, s.1-148, Erzurum.
- Anonim (2006).** TSE Türk Sandardı (Turkish Standard), TS 591, Mart 2006, Beyaz Peynir (White Cheese). Türk Standartları Enstitüsü, Necatibey Caddesi No: 112, Bakanlık, Ankara.
- Anonymous (1995).** The Oxoid Manual, 7th Ed., Compiled by E. Y. Bridson., Published by Unipath Limited, Academic Press, p. 197-198, Hampshire, England.
- Arda M (1985).** Genel Bakteriyoloji. A.Ü.Vet. Fak. Yayın no: 402, (3. Baskı), s. 1-531, Ankara.
- Baird RM, Lee WH (1995).** Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 26, 15-24.
- Bhuia AK, Johnson MC, Ray B (1988).** Purification and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Appl Bacteriol*, 65, 261-268.
- Bianco LJ, Peter, BM, Mykleby WR, Burke JA (1972).** Supplemental chemical control methods. In: Hausler, W J (Editor), Standart Methods for the Examination of Dairy Products. Thirteenth Ed. A.P.H.A., p. 320-322. Washington DC.
- Carter GR (1984).** Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Fourth Edition. Springfield. Illinois. USA.
- Coşkun H (1995).** Farklı Metotlarla Üretilen Otlu Peynirlerde Olgunlaşma Süresi Boyunca Meydana Gelen Değişmeler. Doktora Tezi. (Yayınlanmamış), *YYÜ Fen Bil Enst*, s. 1-111, Van.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1993).** İstatistik metodları. A.Ü.Zir. Fak. Yayın No: 1291. 2. Baskı. Ankara.
- Garcia MC, Otero A, Garcia ML, Moreno B (1987).** Microbial quality and composition of two types of Spanish sheep's milk cheeses. (Manchego and Burgos varieties). *J Dairy Res*, 54, 551-557.
- Garvie EI (1986).** Genus *Leuconostoc*. In: J. P. Butler (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol: 2, Williams&Wilkins, p. 1071-1075, Baltimore.
- Geis A, Singh J, Teuber M (1983).** Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*, 45 (1): 205-211.
- Göncüoğlu, M., Bilir Ormancı, F.S., Kasmoğlu Doğru, A. (2009).** Beyaz peynir üretiminde *Enterococcus faecium*'un starter kültür olarak kullanılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 249-254.
- Hardie JM (1986).** Genus *Streptococcus*. In: J.P. Butler (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, Williams&Wilkins, p. 1043-1047, Baltimore.
- Harrigan WF, McCance ME (1976).** Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc. Ltd., London.
- Hartman PA, La Grange WS (1985).** Coliform Bacteria. In: G.H. Richardson. (Editor), Standart Methods for the Examination of Dairy Products. 15th Ed. A.P.H.A. Washington.
- Kaleli D, Durlu-Özkaya F (2000).** Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı, A.Ü. Zir. Fak. Gıda Mühendisliği Yayını, Sim Matbaası, Ankara.
- Kandler O, Weiss N (1986).** Regular, nonsporing gram-positive rods. In: J.P. Butler (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams&Wilkins, p. 1208-1260, Baltimore.
- Koburger JA, Marth EH (1984).** Yeasts and Moulds. In: Marvin L. Speck (Editor), *Compendium of Methods for the Examination of Foods*. A. P. H. A., p. 197-202, Washington D.C.

- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC (1988).** Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology Third Edition. Lippincott comp. Philadelphia. USA.
- Kurt A, Çakmakçı S, Çağlar A (1993).** Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metodları Rehberi. A.Ü. Yayınları No: 252/d, Ziraat Fak. Yay. No:18, A. Ü. Z. F. Ofset Tesisi. Erzurum.
- Lee JS, Kraft AA (1984).** Proteolytic microorganisms. In: Marvin L. Speck (Editor), Compendium of Methods for the Examination of Foods. A. P. H. A., p. 155-159, Washington D.C.
- Medina MLR, Tornadizo ME, Carballo J, Sarmiento RM (1995).** Microbiological study of Leon raw cow-milk cheese, A Spanish craft variety. *J Food Prot*, 57 (9): 998-1006.
- Messer JW, Behney HM, Leudecke LO (1985).** Microbiological count methods. In: Gary H. Richardson. (Editor), Standards Methods for the Microbiological Examination of Dairy Products. 15th. Ed., A. P. H. A., p. 133-141, Washington D.C.
- Morris HA (1978).** Cheese ripening research- trends and perspectives. *J Dairy Sci*, 61 (8): 1198-1203.
- Mundt JO (1986).** *Enterococci*. In: J.P. Butler (Editor), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams&Wilkins, p. 1063-1065, Baltimore.
- Plard JC, Desmazeaud M (1992).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria 2. bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113-142.
- Pouillet B, Huertas M, Sanchez A, Caceres P, Larriba G (1991).** Microbial study of Casar de Cacères cheese throughout ripening. *J Dairy Res*, 58, 231-238.
- Sancak YC (1989).** Van ve çevresinde olgunlaştırılmış olarak tüketime sunulan Otlu peynirlerin mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal kalitesi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. (Yayınlanmamış), *AÜ Sağlık Bil Enst*, 1-69, Ankara.
- Sert S (1992).** Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları. A. Ü. Z. F. Ders Yayınları No: 138, A.Ü.Z. F. Ofset Tesisi. Erzurum.
- Sharpe ME (1979).** Identification of lactic acid bacteria. In: Skinner and Lovelock (Editor), *Identification Methods for Microbiologists*, 2nd edn., Academic Press, p. 1-233 London.
- Smith JL, Alford JA (1984).** Lipolytic microorganisms. In: Marvin L. Speck (Editor), *Compendium of Methods for the Examination of Foods*. A. P. H. A., p. 148-153, Washington.
- Taracık Z (1997).** Otlu peynirlerin çeşitli özelliklerine lor kullanımı, ambalaj materyali ve olgunlaşma süresinin etkisi. Doktora Tezi. (Yayınlanmamış). *YYÜ Fen Bil Enst*, 1-104, Van.
- Tekinşen OC (1978).** İç Anadolu Bölgesi Kaşar peynirlerinin olgunlaşmaları sırasında mikrobiyel florası, özellikle laktik asit bakterileri ve mikrobiyolojik kalitesi üzerinde araştırmalar. Doçentlik Tezi, s. 1-153, Ankara.
- Tekinşen OC, Atasever M (1994).** Süt ürünleri üretiminde starter kültürler. *SÜ Vet Fak s.* 1-205, Konya.
- Temiz A (1994).** Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri., 2. Baskı, Hatipoğlu Yayınevi, s. 1-405, Ankara.
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol*, 29, 807-813.
- Tunçtürk Y (1991).** Van İli'nin Genel Sütçülük Durumu Üzerinde Bir Araştırma. Y. Lisans Tezi. Y.Y.Ü. Fen Bil. Enst., s. 1-78., Van.
- Turantaş F (1998).** Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmalar. (Ed: Ünlütürk, A., Turantaş, F.) Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, s. 1-605., Çınarlı-İzmir.
- Yetişmeyen A (1997).** Otlu Peynir üretim tekniğinin ve kalite özelliklerinin geliştirilmesi üzerine bir araştırma. *Tr J Agriculture and Forestry*, 21, 237- 245.
- Yetişmeyen A, Yıldırım M, Yıldırım Z (1992).** Ankara piyasasında satışa sunulan Otlu peynirlerin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal niteliklerinin belirlenmesi. A Ü Zir Fak Yay: 1273, Bilimsel Araştırma ve İncelemeler: 706., s. 1-17, Ankara.