



**T.C.  
MEHMET AK F ERSOY ÜN VERS TES  
FEN B L MLER ENST TÜSÜ  
GIDA MÜHEND SL ANAB L M DALI  
YÜKSEK L SANS TEZ**

**Ç SÜT VE PEYN RLERDEN LAKT K AS T  
BAKTER LER N N ZOLASYONU VE  
ZOLATLARIN OTOL T K ÖZELL KLER N N  
BEL RLENMES**

**Gözde GÜL DEN Z**

**BURDUR, 2017**

T.C.  
MEHMET AK F ERSOY ÜN VERS TES  
FEN B L MLER ENST TÜSÜ  
GIDA MÜHEND SL ANAB L M DALI  
YÜKSEK L SANS

**Ç SÜT VE PEYN RLERDEN LAKT K AS T  
BAKTER LER N N ZOLASYONU VE  
ZOLATLARIN OTOL T K ÖZELL KLER N N  
BEL RLENMES**

**Gözde GÜL DEN Z**

**Dan, man: Doç. Dr. O uz GÜR SOY**

**BURDUR, 2017**

## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Gözde GÜLDEN Z tarafından Doç. Dr. Özgür GÜRSOY yönetiminde hazırlanan  
"Çiğ Süt ve Peynirlerden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve İzolatların Otolitik  
Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı tez tarafından okunmuş, kapsam, ve niteliği  
açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/03/2017

**Doç. Dr. Özgür GÜRSOY** (Danışman)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Müh.-Mim. Fak., Gıda Müh. Bölümü

**Prof. Dr. Yusuf YILMAZ** (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Müh.-Mim. Fak., Gıda Müh. Bölümü

**Doç. Dr. Ömer MEK** (Jüri Üyesi)

Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fak., Gıda Mühendisliği Bölümü

### ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulunun \_\_\_\_\_ Tarih ve \_\_\_\_\_ Sayılı Kararı ile  
Kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İskender GÜLLE

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **İç Süt ve Peynirlerden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve İzolatların Otolitik Özelliklerinin Belirlenmesi** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam oldu ğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışmamın, kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmamıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıfta bulunmadığımı, ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde de iftihar yapmadığımı,
- Tez çalışmam ve yazmamın, sınırlarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışta bulunmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğ er bir üniversitede başka bir tez çalışmamda, içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazmamın kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09 / 03 / 2017

İ İ İ İ İ İ İ İ .

Gözde GÜLDENİZ

## **ÖNSÖZ ve TE EKKÜR**

Bu ara tırma için beni yönlendiren, kar ıla t ım zorluklar, a mamda yard,mc, olan Dan, man,m Doç. Dr. O uz GÜR SOYø te ekkürlerimi sunar,m. Çal, malar,m s,ras,nda önemli katk,lar sa layan Prof. Dr. Yusuf YILMAZ ve Pamukkale Üniversitesi G,da Mühendisli i Bölümü ö retim üyesi Doç. Dr. Ömer M EKø te ekkür ederim. Laboratuvar çal, malar,m s,ras,nda yard,m,n, ve deste ini esirgemeyen Uzman Özge GÖKÇEøye, Selime Haz,r DALCAøya, Ara . Gör. Kübra ERTANø te ekkür ederim.

Bu tez çal, mas, G,da, Tar,m ve Hayvanc,l,k Bakanl, ın, Tar,msal Ara tırmalar ve Politikalar Genel Müdürlü ü (TAGEM) taraf,ndan desteklenen TAGEM-13/AR-GE/11 nolu projenin bir bölümüdür ve ilgili proje kapsam,nda desteklenmi tir. Tez çal, mas,na 0245-YL-14 Nođu Proje ile maddi olarak destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri Koordinatörlü üøne te ekkür ederim.

E itim hayat,m,n her a mas,nda beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve sayg,lar,m, sunar,m.

**Mart, 2017**

**Gözde GÜL DEN Z**

## Ç NDEK LER

	Sayfa
ÖNSÖZ VE TE EKKÜR .....	i
Ç NDEK LER .....	ii
EK LLER D Z N .....	iii
Ç ZELGE D Z N .....	iv
S MGELER VE KISALTMALAR D Z N .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. G R .....	1
2. GENEL B LG LER .....	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri .....	3
2.2. Bakterilerde Hücre Duvar, Yap,s, ve Otoliz .....	4
2.3. Otolizi Etkileyen Faktörler .....	7
2.4. Peynir Teknolojisinde Otolizin Önemi .....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	12
3.1. Örneklem ve Materyal .....	12
3.2. Laktik Asit Bakterilerinin zolasyonu .....	13
3.3. zolatlar,n Otolitik Aktivitesinin Belirlenmesi .....	14
3.4. zolatlar,n Tan,mlanmas, .....	14
3.5. Otolitik Aktiviteye Çevresel Ko ullar,n Etkisinin Belirlenmesi .....	16
4. ARA TIRMA BULGULARI VE TARTI MA .....	17
4.1. Laktik Ait Bakteri zolatlar,n,n Otoliz De erleri .....	17
4.2. Yüksek Otolitik Aktiviteye Sahip zolatlar,n Tan,mlanmas, .....	26
4.3. Otolitik Aktiviteye Çevresel Ko ullar,n Etkisi .....	31
5. SONUÇ .....	35
KAYNAKLAR .....	36
ÖZGEÇM .....	41

## EK LLER D Z N

	Sayfa
<b>ekil 2.1.</b> Bakterilerde hücre duvar, yap,s, .....	5
<b>ekil 2.2.</b> <i>Lactobacillus brevis</i> hücrelerinin 3 gün (A, x10 000 büyütme), 30 gün (B, x20 000 büyütme) ve 6 gün (C, x 30 000 büyütme) süreyle MRS broth'daki hücre morfolojisi görüntüleri.....	7
<b>ekil 4.1.</b> Çi sütlerden izole edilen mezofilik (a) ve termofilik (b) su lar,n % otolitiz de erlerinin da ,l,m, .....	25
<b>ekil 4.2.</b> Peynirlerden izole edilen mezofilik (a) ve termofilik (b) su lar,n % otolitiz de erlerinin da ,l,m, .....	26
<b>ekil 4.3.</b> Çi sütlerden izole edilen otolitik izolatlar,n (GTG) <sub>5</sub> parmak izi profilleri .....	27
<b>ekil 4.4.</b> Peynir örneklerinden izole edilen otolitik izolatlar,n (GTG) <sub>5</sub> parmak izi profilleri .....	28
<b>ekil 4.5.</b> Çi sütlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan 16S-27F/16S-780R primerleri kullan,larak ço alt,lan 16S rDNA fragmentleri... 29	29
<b>ekil 4.6.</b> Çi sütlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan 529F/1491R primerleri kullan,larak ço alt,lan 16S rDNA fragmentleri.....	30
<b>ekil 4.7.</b> Çi sütlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan 529F/1491R primerleri kullan,larak ço alt,lan 16S rDNA fragmentleri.....	30
<b>ekil 4.8.</b> Tan,mlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz de erleri üzerine farklı pH, n etkisi .....	31
<b>ekil 4.9.</b> Tan,mlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz de erleri üzerine farklı inkübasyon s,cakl , n, n etkisi .....	32
<b>ekil 4.10.</b> Tan,mlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz de erleri üzerine farklı tuz konsantrasyonlar, n, n etkisi .....	33

## ÇİZELGE DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1.</b> Baz, termofilik laktobasillerin otolitik sistemleri .....	6
<b>Çizelge 2.2.</b> Farklı peynir çeşitlerinin olgunlaşma süreleri .....	10
<b>Çizelge 3.1.</b> Çiğ süt örneklerinin temin edildiği yerler.....	12
<b>Çizelge 3.2.</b> Çalınan maddelerin kullanıldığı peynir çeşitleri, üretimlerinde kullanılan hammadde tipleri ve temin edildikleri yerler .....	13
<b>Çizelge 4.1.</b> Çiğ sütlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatları, n, n, n % otolizde erleri.....	18
<b>Çizelge 4.2.</b> Farklı otolizde erlerine sahip çiğ süt izolatları, n, n sayıları, .....	20
<b>Çizelge 4.3.</b> Peynirlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatları, n, n, n % otolizde erleri.....	22
<b>Çizelge 4.4.</b> Farklı % otolizde erlerine sahip peynir izolatları, n, n sayıları, .....	25
<b>Çizelge 4.5.</b> Peynir ve çiğ sütlerden elde edilen laktik asit bakteri izolatları, n rRNA gen dizisi analizine göre tanımlama sonuçları, .....	30



## **S İMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>GRAS</b>	: Genel Olarak Güvenli
<b>LAB</b>	: Laktik Asit Bakterisi
<b>NAG</b>	: N-asetilglukozamin
<b>NAM</b>	: N-asetilmuramik Asit
<b>NCBI</b>	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>OD</b>	: Optik Yo unluk
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

# ÖZET

## Yüksek Lisans Tezi

### Çi Süt ve Peynirlerden Laktik Asit Bakterilerinin Otoliz Özelliklerinin Belirlenmesi

Gözde GÜL DEN Z

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özgür GÜRSOY

Mart, 2017

Bu tez çalışmada Burdur, Antalya, Isparta ve Afyon illerinden toplanan 16 çi süt ve 16 peynir örneğinden 449 mezofilik ve 429 termofilik laktik asit bakterisi (LAB) izole edilmiştir. Otoliz oranları, potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH 7.0, 30°C, 24 saat) belirlenmiş ve otoliz oranı yüksek olan 29 izolatleri tanımlamaları için seçilmiştir. Seçilen bakterilerin farklı sıcaklık (10, 20, 30 ve 40°C), pH (3.5, 4.0 ve 5.0) ve NaCl konsantrasyonlarındaki (%0.5, 1, 3, 5, 7 ve 10) otolitik davranışları, ara tarama, tarama yapmaları (GTG)<sub>5</sub> parmak izi ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre 12 izolatın laktik asit bakterisi olduğu belirlenmiş olup, bunlar *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2), *Lactobacillus plantarum* (2), *Enterococcus faecium* (4) ve *Enterococcus faecalis* (4) türleri ile %97'in üzerindeki bir oranda benzer bulunmuştur. Tanımlanan bakterilerin otoliz oranları %25.0 ile 43.6 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Genel olarak bakterilerin otoliz oranları artan pH ve sıcaklık ile yükseldiği belirlenirken farklı tuz konsantrasyonlarında bakterilerin otolitik davranışları izolata bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Çalışma bulguları genel olarak değerlendirildiğinde %35.7 otoliz oranına sahip *Lactobacillus plantarum* P5MRF izolatının peynir üretiminde hızlı lezzet gelişiminin sağlanmasında starter ve/veya destek kültür olarak kullanılması için önemli bir potansiyele sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Laktik asit bakterisi, Otoliz, Peynir, Çi Süt

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0245-YL-14 proje numarası ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM-13/AR-GE/11 proje numarası ile desteklenmiştir.

## SUMMARY

M.Sc. Thesis

**Isolation of Lactic Acid Bacteria from Raw Milk and Cheeses and Determination of their Autolytic Properties**

**Gözde GÜL DEN Z**

**Mehmet Akif Ersoy University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. O uz GÜRSOY**

**March, 2017**

In this study, 449 mesophilic and 429 thermophilic lactic acid bacteria were isolated from 16 raw milk and 16 cheese samples obtained from Burdur, Antalya, Isparta and Afyon provinces of Turkey. Autolysis rates (%) of all isolates were determined in phosphate buffer (100 mM, pH 7.0, 30°C, 24 h), and 29 strains with high autolysis rates were selected for ultimate identification. Autolytic behaviors of selected bacteria were also studied at different temperatures (10, 20, 30 and 40°C), pH values (3.5, 4.0 and 5.0) and NaCl concentrations (0.5, 1, 3, 5, 7 and 10%). According to the results of (GTG)<sub>5</sub> profiles and 16S rDNA sequence analysis, 12 isolates were lactic acid bacteria, and they were homologous by more than 97% with the species of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2), *Lactobacillus plantarum* (2), *Enterococcus faecium* (4) and *Enterococcus faecalis* (4). Autolysis rates of identified bacteria ranged from 25.0 to 43.6%. Bacterial autolysis rate generally increased with an increase in pH and temperature while bacterial autolytic behavior at different NaCl concentrations showed variations depending on strain. The results of this study indicated that *Lactobacillus plantarum* P5MRF strain (35.7% autolysis rate) may have a significant potential to be used as a starter and/or adjunct culture in cheese production for the accelerated development of unique flavors.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Autolysis, Cheese, Raw milk

The present M.Sc. Thesis was supported by Coordinatorship of Scientific Research Projects of Mehmet Akif Ersoy University under the Project number of 0245-YL-14 and the Ministry of Food, Agriculture and Livestock, General Directorate of Agricultural Research and Policies under the Project number TAGEM-13/ARGE/11.

## 1. G R

Endüstriyel yöntemlerle gıda üretiminde, geleneksel ürünlerin sahip olduğu tat ve lezzet karakteristiklerine erişmek için starter kültür kullanımı, neredeyse bir zorunluluk haline gelmiştir. Ancak günümüzde halen pek çok ülkede geleneksel olarak üretilen gıdalara olan talep artan bir şekilde devam etmektedir. Benzer durum ülkemizde de söz konusu olup endüstriyel olarak üretilen bazı peynirler özellikle lezzet bakımından tüketiciler tarafından beğenilmeyebilmektedir.

Peynir üretiminde starter kültür kullanmanın birçok yararları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; pH, oluşumundan itibaren peynirde asitliliği arttırmaları, olgunlaşma süresini kısaltarak farklı lezzet bileşikleri meydana getirmeleri, peynir suyunun çökünmesini, hazırlanırken peynir suyuna kaçan yağ ve protein miktarını azaltmaları, ve peynirde zararlı mikroorganizmaların gelişmesini önlemeleri olarak sayılabilir. Söz konusu yararları özelliklerinden dolayı, peynir endüstrisinde starter kültür olarak *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus helveticus* gibi kültürler kullanılmaktadır. Starter kültür amacıyla kullanılan adı geçen mikroorganizmalara ait suşları ülkemizde üretilmediğinden peynir üreticileri starter kültür temininde dışarıya başvurmak zorunda kalmıştır. Ancak ithal edilen bu kültürlerin, peynirlerimizin karakteristik tat, aroma ve tekstürel özelliklerini kazandırma açısından beklenenleri tam olarak karşılamadıkları görülebilmektedir. Diğer taraftan ithalat yoluyla getirilen ve endüstriyel ölçekte kullanılan starter kültürler nedeniyle çok yakın bir zamanda geleneksel suşların kaybedilmesi riski bulunmaktadır.

Sekizinci beş yıllık kalkınma planı, özel ihtisas komisyonu, endüstriyel yolla üretilen fermente süt ürünlerine özel starter kültür kombinasyonları üretilmesinin teşvik edilmesini kararlaştırmıştır. Ayrıca, fermente süt ürünlerinin üretimi için starter kültürlerin geliştirilmesi konusu, TÜBİTAK ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından öncelikli olarak desteklenmesi gereken alanlar arasında yer almaktadır.

Peynir olgunlaşması, yavaş ve pahalı bir süreçtir. Peynirlerin olgunlaşması amacıyla belirli bir süre depolanması, yüksek miktarda işletme sermayesinin yanı sıra depolama masrafları, faiz yükünü ve firelerin toplam maliyetteki payını da oldukça yükseltmektedir. Olgunlaşma periyodunun kısaltılması, yani depolama süresinin

k,salt,lmas, üreticilerin s,k,nt,lar,n,n önemli ölçüde giderilmesini sağlayabilir. Söz konusu nedenlerle olgunlaşma hızlandırılması, konusundaki çalışmalar da son derece önemli görülmektedir.

Peynir üretiminin ardından peynir matriksinde bulunan laktik asit bakterilerinin otolizi sonucunda ilgili bakterilerin hücre içi enzimlerinin kısa süre içerisinde serbest kalması, peynir lezzetinin kısa sürede gelişmesinde ve dolayısıyla olgunlaşma hızlandırılması, önemli bir rol oynayabilmektedir. Bu nedenle çiğ süt ve geleneksel yöntemlerle üretilen süt ürünlerimizden (peynirler) izole edilecek laktik asit bakterilerinin tanımlanması, otolitik özelliklerinin belirlenmesi ve starter kültür ve/veya destek kültür olarak kullanılabilecekleri değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalar son derece önemlidir.

Yapılan literatür taramasında ülkemizde üretilip tüketilen çiğ süt ve geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin otolitik özelliklerinin belirlendiği kapsamlı çalışmalar oldukça sınırlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarında Burdur, Antalya, Isparta ve Afyon illerinden çiğ süt ve peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izole edilmesi, izolatların otolitik özelliklerinin belirlenmesi ve yüksek otolitik özelliğe sahip olan izolatlardan bazıları seçilerek tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca izolatların farklı sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarındaki otolitik davranışları da belirlenmiştir.

## 2. GENEL B LG LER

### 2.1. Laktik Asit Bakterileri

İlk olarak 1919 yılında tanımlanan laktik asit bakterileri Gram pozitif, çubuk, kok veya tetradolu turabilen, hareketsiz, sporolu turmayan, genellikle aerotolerant, katalaz ve nitrat redüktaz negatif, karbonhidrat fermantasyonu sonucunda genel olarak laktik asitolu turan ve pH 5 ve daha düşük ortamlarda gelişebilen bakterilerdir (Kılıç, 2010). Laktik asit bakterileri genel olarak 10 ila 45°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilmektedir. Tuz tolerans, (bazı su lar %6,5 tuz konsantrasyonlarına, tolere edebilirken *Tetragenococcus* gibi cinslerin üyeleri %18 tuz konsantrasyonunu tolere edebilir) ve asit ve/veya alkalilere tolerans özelliklerine sahiptirler (Axelsson, 1998).

Filogenetik olarak oldukça yüksek heterojen bakteriyel grup olan laktik asit bakterileri genel olarak güvenli (GRAS) statüsündedirler (Burgain vd., 2014). Laktik asit bakterileri bazı gıdaların üretiminde kullanılan fermantasyon prosesinde merkezi bir rol oynamakta ve fermente gıdaların üretiminde uzun ve güvenli bir geçmi e sahiptirler (Leroy ve De Vuyst, 2004). Gıda endüstrisinde çoklukla *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* (süt ürünleri, et ürünleri, sebzeler ve hububatlar), *Lactococcus* (süt ürünleri), *Leuconostoc* (sebzeler ve süt ürünleri), *Oenococcus* (arap), *Pediococcus* (sebzeler ve et), *Streptococcus* (süt ürünleri) ve *Weissella* cinslerine ait tür ve su lar fermente gıdaların üretiminde kullanılmaktadırlar (Burgain vd., 2014).

Fermente gıdaların ilk üretimleri hammadde içerisinde doğal olarak bulunan mikrofloranın gelişmesi ile yapılmaktaydı. Bu durumda son ürünün kalitesi hammaddedeki mikrobiyal yük ve çeşitliliğe bağlıydı. Günümüzde söz konusu yöntemin kullanılmaması az gelişmiş ülkelerde rastlanmakta iken gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde fermente gıdaların büyük ölçekli üretimi gıda endüstrisinin önemli bir kolu haline gelmiştir. Seçilmiş starter/destek kültürlerin doğrudan hammaddelere ilavesi ile kontrollü fermantasyon ve standart son ürün üretimi mümkün hale gelmiştir. Endüstride kullanılan fizyolojik ve metabolik olarak uygun özelliklere sahip söz konusu mikrobiyal kültürler doğal habitatlarından ya da başarıyla üretilen fermente gıdalardan izole edilmektedirler (Leroy ve De Vuyst, 2004).

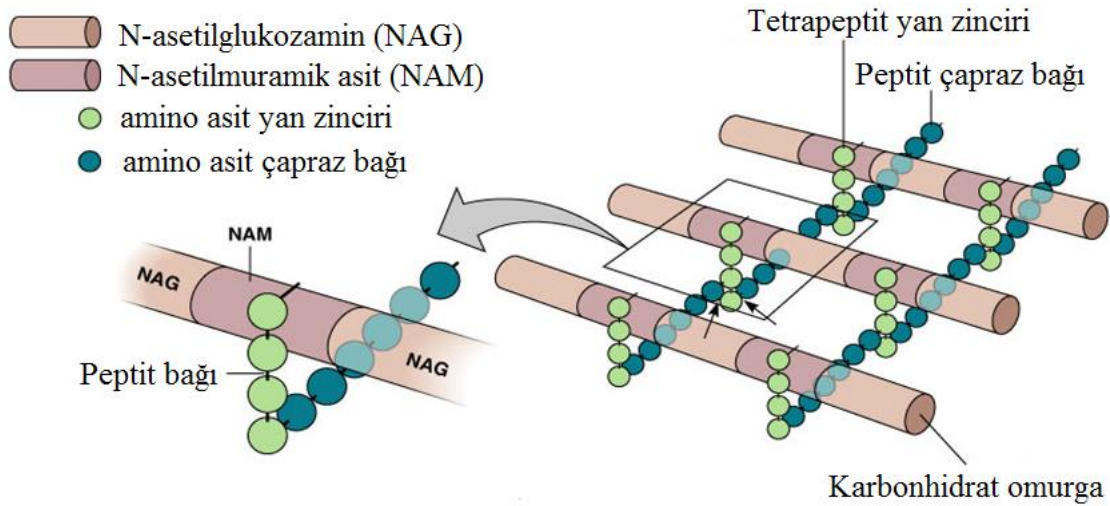
Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinin diğer alanlarında olduğu gibi süt endüstrisinde de kültür olarak kullanılmaktadırlar. Süt endüstrisinde bu bakterilerin kültür

olarak kullanılmaları en önemli nedeni sütteki laktozu hızla bir şekilde laktik asit haline getirmek üzere organik asitlere dönüştürmeleridir. Bu şekilde sütün kontrollü fermantasyonu sağlanmaktadır. Bazı laktik asit bakterileri sütün fermantasyonu sırasında asetik asit, propiyonik asit, etanol, lezzet bileşikleri (diasetil, aseton vb.), CO<sub>2</sub>, bakteriosinler ve ekzopolisakkaritler gibi farklı bileşiklerin üretimini de gerçekleştirebilmektedirler.

Peynir endüstrisinde kullanılan starter kültürler hem peynir üretimi hem de olgunlaşmalarını sağlar; (bazı peynir tipleri için) laktik asit oluşturup pH'ı düşürerek pH'ı düşürülmesini sağlar, pH'ı düşürülmesini hızlandırır, istenmeyen mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi, hücre içi ve dışı, enzimlerin proteinleri ve yağları hidrolizi ile peynirlerin kendine özgü tekstür ve özellikle lezzet karakteristiklerinin oluşmasını, lezzet bileşiklerinin sentezi, ekzopolisakkaritler gibi ürünün tekstürel yapısına katkı sağlayacak bileşiklerin üretimi ve inhibitör maddelerin üretimi gibi çok sayıda fonksiyondan sorumludurlar (Mäyrä-Mäkinen ve Bigret, 1998). Starter kültür kullanılmayan, sadece destek kültür kullanılarak peynirlerde lezzet bileşiklerinin etkili ve daha kısa sürede oluşmasını sağlamak ve olgunlaşmalarını hızlandırmaya katkıda bulunmaktadır (El Soda ve Awad, 2011). Olgunlaşmada etkili olan hücre içi enzimlerin hücre otolizi ile peynir matriksi içerisine salınması hızlandırılmı, olgunlaşmadaki diğer önemli faktörlerden biridir (Kawabata vd., 1997). Bu nedenle peynir endüstrisinde kullanılacak destek kültürlerin otolitik aktivitelerinin bilinmesi son derece önemli görülmektedir.

## 2.2. Bakterilerde Hücre Duvarı, Yapısı ve Otoliz

Bakteri hücrelerinde hücre duvarının güçlü olmasından sorumlu olan yapı, peptidoglikan (murain) olarak adlandırılan çapraz bağlı polimerik bir makromolekül yapıdır. Gram pozitif bakterilerde hücre duvarının %90'ı peptidoglikandan oluşmaktadır ve peptidoglikan üst üste yığılımı, yaklaşık 25 tabaka içermektedir (Çökmü, 2010). Peptidoglikanın glikan bölümü glikozit türevi olan N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) olmak üzere iki tip bakter türevinin dönüşümlü ve -1,4 bağları ile bağlı olarak dizildiği doğrusal bir polimerdir (Humann ve Lenz, 2008). Yapının peptido bölümü ise az sayıda aminoasit (L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit veya L-lisin ya da diaminopimelik asit) içermektedir. Aminoasitler glikan yapısındaki NAM ünitelerindeki komşu polisakkarit zincirlerinin çapraz bağlanmasını sağlamak ve bu şekilde yüksek çekme kuvvetine sahip bir yapı oluşturmaktadır (Çökmü, 2010). Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı, peptidoglikanın yapısını ematik olarak ekil 2.1'de gösterilmektedir.



**ekil 2.1.** Bakterilerde hücre duvar, yap,s, (Tortora vd., 2016dan modifiye edilmi tir)

Otoliz, otolisinler olarak isimlendirilen hücre içi peptidoglikan hidrolazlar, tarafından hücre duvar, peptidoglikan,n,n enzimatik parçalanmas, sonucu meydana gelen (Ouzari vd., 2002; Lortal ve Chapot-Chartier, 2005) ve sitoplazmik içeri in hücrenin bulundu u ortama sal,verilmesi ile sonuçlanan kompleks bir olayd,r (Husson-Kao vd., 2000).

Bakteriler kendi hücre duvarlar,n, parçalayan bir veya daha fazla otolitik enzim içerebilirler (Østlie vd., 1995). Hücrenin otolizinde özellikle (i) N-asetilmuramik asitin serbest indirgeyici gruplar,n, serbest b,rakan N-asetilmuramidazlar, (ii) N-asetilglukozaminin serbest indirgeyici gruplar,n, serbest b,rakan N-asetilglukozaminidazlar, (iii) N-asetilmuramik asit ve L-alanin aras,ndaki ba , parçalayan N-asetilmuramil-L-alanin amidaz ve (iv) ana peptitler ve peptit ba lar,n, hidrolize eden endopeptidazlar önemli rol oynamaktad,r (Østlie vd., 1995; Ouzari vd., 2002). Otolizde rol oynayan söz konusu enzimler bakterinin ötolitik sisteminiö olu turmaktad,r (Lemée vd., 1995). Örne in Lemee vd. (1994) taraf,ndan yap,lan bir çal, mada sviçre peyniri üretiminde proteoliz ve lipolize önemli katk,lar sa layan *Propionibacterium freudenreichii* CNRZ 725ön farklı ko ullardaki otolizinde yalnızca bir N-asetilglukozaminidaz,n etkili oldu u belirlenmi tir. Cibik ve Chapot-Chartier (2000), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*ön peptidoglikan hidrolaz profilini inceledikleri çal, malar,nda, bir glikozidaz ve bir N-asetilmuramil-L-alanin amidaz enzimi bulundu unu rapor etmi lerdir. Benzer sonuç Østlie vd. (1995) taraf,ndan *Lactococcus lactis* su lar,nda yap,lan



çal, malarda da elde edilmi tir. Baz, termofilik laktobasillerin otolitik sistemleri Çizelge 2.1de özetlenmi tir.

**Çizelge 2.1.** Baz, termofilik laktobasillerin otolitik sistemleri (Lortal vd., 1997)

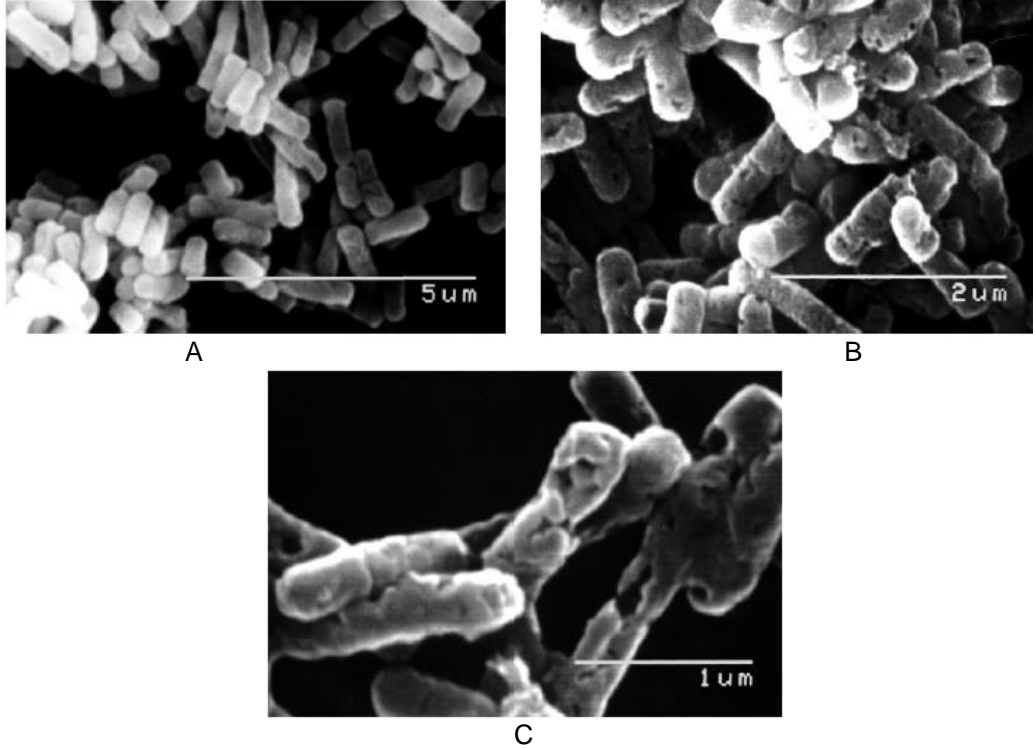
Bakteri Türü	Otolisin	SDS-PAGE ncelemesi		
		Substrat	LBS	MA (kDa)
<i>L. helveticus</i>	N-asetilmuramidaz	<i>M. luteus</i>	2	30/42.4
		<i>L. helveticus</i>		
		Hücreler	2	30/42.4
		SDS hücre duvarlar,	3	30/37.5/42.4
<i>L. acidophilus</i>	N-asetilmuramidaz	<i>M. luteus</i>	4	27/28/30/43
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Belirlenmemi	<i>M. luteus</i>	2	31/44
<i>L. fermentum</i>	• N-asetilmuramidaz • Amidaz Endopeptidaz	<i>M. luteus hücreleri</i>	2	56/89

LBS: Ba l,ca litik bant say,s,, MA: Moleküler a ,rl,k

Bakteriyel peptidoglikan hidrolazlar, hücrenin büyümesi ve bölünmesi sırasında rijit peptidoglikan a ,n,n modifikasyonu için gerekli olan çok sayıda farklı hücre sel fonksiyonda görev almaktadırlar. Bunun dışında, otoliz sistemi hücre popülasyonu içerisinde zayıflam, veya bozulmuş hücrelerin elemine edilmesi için de kullanılmaktadır. Bir bakteri hücrelerinde aynı anda farklı spesifikli e ve/veya yapıya sahip peptidoglikan hidrolazlar, bulunabilir ve bu durumda ilgili hidrolazlar kompleks bir enzimatik sistem meydana getirirler (Lortal ve Chapot-Chartier, 2005; İmrek vd., 2016). Genel anlamda bakteriyel hücrelerin kendiliğinden parçalanması olan otoliz (El-Kholy vd., 1998; Kenny vd., 2006) birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteride görülmektedir (Humann ve Lenz, 2008).

Bakteri hücrelerindeki hidrolitik enzimler olan N-asetil-muramidazlar hücre duvar, polisakkaritlerine etki ederek daha küçük moleküllerin hücre içerisine girmesine kolaylaştırarak da yeni hücrelerin oluşumuna izin vermektedirler. N-asetil-muramidazlar özellikle hücrenin çoğalma evresinde aktifler ancak çoğalma tamamlandıktan sonra da aktivitelerine devam etmektedirler. Hücre duvarında meydana gelen bozulmalar (yarılma ve delikler) genel yapıya zarar vermemekte ve sadece hidrolitik enzimlerin bulunduğu birkaç yerde görülmektedir. Otolizin başlangıcında hücre duvarlarında görülen küçük çatlaklar otolizin ilerleyen evrelerinde kademeli olarak büyüyerek büyük çatlaklar haline gelmektedir. Bu noktada hücre tipik görüntüsünü kaybetmektedir. Otolizin farklı amaçlarında hücre duvarının taramalı elektron mikroskopunda elde edilen görüntüleri ekil 2.2de verilmektedir (Zambonelli vd., 2002).

Otoliz genel olarak besin ö esi yetersizli i ya da di er istenmeyen çevresel ko ullar gibi peptidoglikan sentezinin durmas,yla sonuçlanan durumlarda meydana gelmektedir. Söz konusu durumlarda hücrenin yap,sal bütünlü ü için gerekli olan peptidoglikan,n hidrolizi hücresel otolize sebep olabilmekte ve hücre içi bile im hücre d ,na ç,kabilmektedir (Lortal ve Chapot-Chartier, 2005).



**ekil 2.2.** *Lactobacillus brevis* hücrelerinin 3 gün (A, x10 000 büyütme), 30 gün (B, x20 000 büyütme) ve 6 gün (C, x 30 000 büyütme) süreyle MRS broth'daki hücre morfolojisi görüntüleri (Zambonelli vd., 2002).

### 2.3. Otolizi Etkileyen Faktörler

Laktik asit bakterilerinin otolitik aktivitelerinin hücre duvar, kompozisyonu, genom yap,s,ndaki hatalar ve bölünme s,ras,nda peptidoglikan yap,s,nda olu an farklıklar, genetik yap,n,n çe itlili i gibi faktörlerin yan, s,ra çevre ko ullar,na ba l, oldu u bildirilmektedir ( im ek vd., 2016). Otolizden sorumlu olan otolisinlerin aktiviteleri genel olarak enzimatik reaksiyonlar, etkilen pH, s,cakl,k, iyonik yük, tuz konsantrasyonu, baz, kasyonlar,n varl, , gibi çevre ko ullar,na ba l, olarak de i ebilmektedir. Söz konusu parametreler do rudan otolisinleri etkileyebilece i gibi substratlar, da (hücre duvar,ndaki peptidoglikana ula ,labilirlik) etkileyebilmektedir (Lortal vd., 1997).

Otolisinlerin farklı çevre koşullardaki aktiviteleri aynı, bakteri türünün farklı suları, arasında da farklılık gösterebilmektedir (Boutrou vd., 1998). Örneğin Husson-Kao vd. (2000) 146 *Streptococcus thermophilus* suyunun %0,5 (w/v) laktoz içeren M17 sıvı besiyerinde otolizini incelemişler ve otolitik özelliğinin suya bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 6 suyun (DN-001 065, DN-001 561, CNRZ 701, 1358, 1205 ve 1209) oldukça yüksek otolitik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde Ouzari vd. (2002) Tunus'taki geleneksel süt ürünlerinden izole edilen 31 *Lactococcus lactis* suyunun potasyum fosfat tamponundaki (50 mM, pH=6,5, 30°C) otolitiz derecelerinin suya bağlı olarak %10,3 ile 56,8 arasında değiştiğini bulmuştur.

Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada (Kozakova vd., 2010) çiğ süt ve peynirlerden izole edilen 300 bakteriden *Lactococcus lactis* olarak tanımlanan 23 tanesi otolitik aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Yirmi üç izolattan 3 izolasyon oldukça yüksek otolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ve sitrat tamponunda en yüksek otolitik aktiviteye (yaklaşık %48) sahip izolat olan *Lactococcus lactis* HMM81 otolize etki eden faktörlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Bu amaçla sodyum sitrat tamponu konsantrasyonu (10, 50, 100, 200, 1000 mmol/L), pH (4, 5, 6, 7, 8), NaCl konsantrasyonu (0, 2, 6,5, 10 ve 15 g/L) ve inkübasyon sıcaklıklarının (13, 30, 45 ve 56°C) otoliz üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuçta 30°C'de 6 saat ön inkübasyon, 50 mmol/L sodyum sitrat tamponunda (pH=5, 15g/L NaCl içeren) hücrelerin tekrar süspansiyonu ve 30°C'de 6 gün inkübasyonun çalışılan izolatın otolizi için en iyi koşullar olduğu belirlenmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada 10 farklı *Lactococcus lactis* suyunun aynı pH ve tuz konsantrasyonu koşullarındaki otolitik özelliklerinin farklılık gösterdiği görülmüştür. Örneğin düşük pH (5,4) ve düşük tuz konsantrasyonunda (0,17M) çalışılan suyun yarısından (BB07, CZ01, MA101, KK01, EJ06) en yüksek otoliz derecelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan yalnızca iki su (RQ07, EZ03B) en yüksek otoliz derecelerine yüksek tuz konsantrasyonunda (0,51M) ve asidik pH'da (5,4) ulaşmıştır. Diğer suların (MA16, PK04, KK05) en yüksek otoliz dereceleri nötr pH (7) ve yüksek tuz konsantrasyonunda (0.51M) belirlenmiştir (Ramirez-Nunez vd., 2011).

Nájera-Domínguez ve Gutiérrez-Méndez (2013) farklı kaynaklardan izole ettikleri 21 *L. lactis* suyunun otolitik özelliklerini incelemiştir. Çalışmada genel olarak birçok *L. lactis* suyunun asidik ortam ve düşük tuz konsantrasyonlar (pH=5 ve %1 NaCl) ile nötr pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (pH=7 ve %5 NaCl) yüksek otoliz derecelerine

sahip oldu u görülmü tür. Ara t,rmac,lar asidik ortam ve yüksek tuz konsantrasyonun (pH=5 ve %5 NaCl) birçok *L. lactis* su unun otolizini te vik etmedi ini tespit etmi lerdir.

El-Soda vd. (2003) M,s,rødaki çi süt ve farklı, süt ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin otolitik özelliklerini belirlemi lerdir. Çal, mada incelenen laktik asit bakterileri yüksek otolitik özellikli (%73-94, *L. paracasei* subsp. *paracasei* FAAU27, 155, *L. rhamnosus* FAUU110), orta düzey otolitik özellikli (%40-69, *L. rhamnosus* FAAU115, 23, 34, 55) ve zayıf otolitik özellikli (%4-39, *L. plantarum* FAAU20, *L. paracasei* subsp. *paracasei* FAAU92 ve *L. rhamnosus* FAAU141) olarak üç gruba ayrılm, t,r.

Masuda vd. (2005) tarafından insanlardan izole edilen 5 farklı, *L. acidophilus* ve 7 farklı, *L. gasseri* su unun otolitik özellikleri araştırılm, t,r. Çal, mada incelenen laktik asit bakterilerinin düşük pH de erinde (pH=5) nötr pH de erine göre daha fazla otolitik aktivite gösterdi i ve birçok *L. gasseri* su unun *L. acidophilus* su lar,na göre daha fazla otoliz e ilimine sahip oldu u görülmü tür.

sviçrede farklı, kaynaklardan izole edilen (bitki, süt, peynir p,ht,s, ve peynir) *L. casei* (n=114), *L. rhamnosus* (n=22) ve *L. plantarum*ın (n=48) otolitik aktiveleri incelenmi ve bakteriler otoliz h,zlar,na göre h,zl,, orta ve düşük h,zl, olarak gruplandırılm, t,r (Weinrichter vd., 2001). Genel olarak *L. plantarum* su lar, (toplam izolat,n %42øsi) h,zl, ve *L. rhamnosus* su lar, (toplam izolat,n %59øü) yavaş otoliz olan grupta yer alm, t,r. *L. casei*ın ise her üç gruba ait birbirine yak,n say,da su lar,n,n (%29, 32 ve 39) oldu u belirlenmi tir. Ara t,rmac,lar otolitik özelliklerin su a ba l, olarak de i im gösterdi ini vurgulam, lard,r.

Cibik ve Chapot-Chartier (2000), 59 farklı, *Leuconostoc* su unun potasyum fosfat tamponunda (50 mmol/L, pH=6,5, 30°C, 24 saat inkübasyon) otolitik aktivitesini ara t,rd,klar, çal, mas,nda, otolizinin su a ba l, olarak %7 ile %44 aras,nda de i ti ini ve otolitik özelli in türe de il su a ba l, oldu unu bildirmi tir. Ara t,rmac,lar ayrıca 24 saatten daha fazla inkübasyon süresinin otoliz oranlar,n, önemli düzeyde de i tirmedini belirlemi tir. Aynı, ara t,r,c,lar tarafından yapılan ba ka bir çal, mada (Cibik ve Chapot-Chartier, 2004), 9 farklı, *Lb. pentosus* su unun otolitik aktivitesi yukarıda belirtilen artlarda araştırılm, ve bakterilerin otoliz oranlar,n,n su a ba l, olarak %34 ile %94 aras,nda de i ti i belirlenmi tir.

#### 2.4. Peynir Teknolojisinde Otolizinin Önemi

Peynir olgunlaşma, peynir tipine ba l, olarak 4 hafta ile 28 ay aras,nda de i ebilmektedir (Çizelge 2.2). Söz konusu olgunlaşma süresince her peynirin kendine

özgü görünüşü, tat, aroma, tekstür ve fonksiyonel karakteristikleri gelişmektedir (McSweeney, 2004; 2011). Olgunlaşma sırasında istenen mikrobiyal floranın gelişimini teşvik etmek ve biyokimyasal değişimlerden sorumlu enzimlerin salınmasını sağlamak için olgunlaşma sıcaklığı ve nem kontrol edilmektedir. Ancak yine de olgunlaşma süreci tam olarak kontrol edilememektedir (El Soda ve Awad, 2011).

**Çizelge 2.2.** Farklı peynir çeşitlerinin olgunlaşma süreleri (El Soda ve Awad, 2011; Anonim, 2015)

Peynir Çeşidi	Olgunlaşma Süresi (Ay)
Cheddar tipi peynirler	6-12
Mavi (Blue) peynir çeşitleri	3-4
Parmigiano	24-28
Provolone	10-12
Gouda	1-2
Ras	3-4
Salamura Beyaz Peynir	3 ay (en az)
Kaşar	1,5-3 ay (en az)

Peynir olgunlaşması, oldukça pahalı bir süreçtir. Örneğin Cheddar peynirinin olgunlaşma süresince maliyetinin her ay %1,5-3 oranında arttığı bildirilmektedir (El Soda ve Awad, 2011). Dolayısıyla peynir olgunlaşması hızlandırılması için etkili yöntemlerin geliştirilmesi peynir endüstrisi için önemli ekonomik kazançlar sağlayabilecektir (Yvon ve Rijnen, 2001; El Soda ve Awad, 2011).

Peynirlerin olgunlaşması sırasında gerçekleşen lezzet gelişimi, glikoliz, lipoliz ve proteoliz olmak üzere başlıca üç katabolik yolla meydana gelen kompleks bir süreçtir (Yvon ve Rijnen, 2001). Glikoliz ve glikolize başlıca süreçler starter ve/veya starter olmayan canlı mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmekte iken lipoliz ve proteoliz çoğunlukla rennet, süt, starter bakteriler, starter olmayan mikroflora ve destek kültürlerden kaynaklı enzimler tarafından katalize edilmektedir (McSweeney, 2011). Olgunlaşma için önemli olan söz konusu enzimlerin hücrenin erken otolizi ile peynir pH'sine salınması olgunlaşma için gerekli olan hücre için enzimlerin substratlara daha kolay ulaşmasını sağlayacaktır. Bu şekilde olgunlaşmada önemli biyokimyasal reaksiyonlar daha kısa sürede gerçekleşerek peynir olgunlaşması hızlanabilecektir (Kawabata vd., 1997; Valence vd., 2000; Beresford vd., 2001; McSweeney, 2004).

Olgunlaşma süresince peynir üretiminde kullanılan starter ve/veya destek kültürlerin lisansını sağlamak için kullanılan yaklaşımlar; (i) otolitik starter bakterilerin seçimi, (ii) litik bakteriyofajların kullanımı, ve (iii) üretimde bakteriosin üreten destek kültürlerin kullanımıdır (Oumer vd., 2001; İmrek vd., 2016).

Laktik asit bakterilerinin bazı otolitik suşları, peynir teknolojisinde olgunlaşma hızlandırma ve lezzet gelişimini arttırmak amacıyla kullanılabilmektedir (Valence vd., 2000; Deutsch vd., 2003). Yapılan çalışmalar, yüksek otolitik suşların peynir üretiminde kullanılmasıyla peynir matriksinde bulunan serbest amino asit konsantrasyonunda artış (Hannon vd., 2007) ve peynirde bir lezzet kusuru olan asitlik azalmasına katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (Kenny vd., 2006). Peynir üretiminde otolitik suşların kullanılması sadece peynir olgunlaşmasını hızlandırmakla kalmamakta, bunun yanında peynirin duyu özelliklerini geliştirme potansiyeline de sahip bulunmaktadır (Hannon vd., 2003; Kenny vd., 2006). Konu ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalar ve peynirlerin otolizinin belirlenmesi ile ilgili yöntemler İmrek vd. (2016) tarafından derlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Örneklem ve Materyal

Çal, mada Burdur, Antalya, Isparta ve Afyon illerinden toplanan 16 çi süt (Çizelge 3.1) ve 16 peynir örne i (Çizelge 3.2) laktik asit bakterilerinin izolasyonu için kullan,lm, t,r. Çi süt ve peynir örnekleri çi süt üreticileri, yerel pazarlar ve arküterilerden temin edilmi tir. Steril kavanozlara aseptik ko ullarda al,nan örnekler en k,sa zamanda laboratuvara ta ,nm, ve ayn, gün içerisinde analiz edilmi tir. Analizler yap,l,ncaya kadar örnekler buzdolab,nda ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) bekletilmi tir. Çal, ma sonucunda elde edilen bakteri izolatlar,, son konsantrasyonu %30 steril gliserol içeren besiyeri ortam,nda  $-80^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edilmi tir.

**Çizelge 3.1.** Çi süt örneklerinin temin edildi i yerler

Süt No	Süt Örne inin Al,nd, , Yer
1	Gökçeba , Burdur
2	Gökçeba , Burdur
3	Gökçeba , Burdur
4	Gökçeba , Burdur
5	Gökçeba , Burdur
6	Gökçeba , Burdur
7	Gökçeba , Burdur
8	slanköy, Isparta
9	slanköy, Isparta
10	Diyadin Köyü, Isparta
11	Ba ören Köyü, Isparta
12	Direkli Köyü, Isparta
13	Çak,rlar, Antalya
14	Akdere, Burdur
15	Salar Kasabas,, Afyonkarahisar
16	Salar Kasabas,, Afyonkarahisar

**Çizelge 3.2.** Çal, mada kullan,lan peynir çe itleri, üretimlerinde kullan,lan hammadde tipleri ve temin edildikleri yerler

Peynir No	Peynir Çe idi	Hammadde Tipi	Temin Yeri
1	Yar,m Ya l, Tulum	nek	Sav, Isparta
2	Tulum	nek	Antalya
3	Beyaz Peynir	nek	Sütçüler, Antalya
4	Tulum	nek	Sav, Isparta
5	Salamura	nek	Sav, Isparta
6	Köy Peyniri	nek	Isparta
7	Tulum	Keçi	Isparta
8	Köy Peyniri	nek	Afyonkarahisar
9	Lor	nek	Burdur
10	Köy Peyniri	nek	Burdur
11	Köy Peyniri	nek	Burdur
12	Köy Peyniri	Koyun	Burdur
13	Köy Peyniri	nek	Afyonkarahisar
14	Köy Peyniri	nek	Afyonkarahisar
15	Tulum	Keçi	Akseki, Antalya,
16	Köy Peyniri	nek	Elmal,, Antalya

### 3.2. Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu

Çi süt ve peynir örneklerinden maximum recovery diluent (Merck) kullan,larak uygun oranlarda örnek dilüsyonlar, haz,rlanm, t,r. Laktobasil ve laktokoklar,n izolasyonu için s,ras,yla MRS (Merck) ve %0,5 glukoz ilave edilen M17 (M17G) (Merck) kat, besiyeri kullan,lm, t,r. Termofil LABøder için 43°C, mezofil LABøder için ise 30°C'de 48 saatlik inkübasyon uygulanm, t,r. inkübasyon sonunda MRS ve M17G agar üzerinde geli en kolonilerden seçilerek LABøderin izolasyonu gerçekleştirilmi tir. Her numune için petrilere farklı oldu u dü ünülen 40 adet koloni seçilmi ve seçilen koloniler MRS ve M17G s,v, besiyerinde termofilik ve mezofilik ko ullarda geli tirilmi tir.

### 3.3. izolatlar,n Otolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

Otolitik aktivitenin belirlenmesinde Cibik vd. (2006) taraf,ndan kullan,lan yöntem küçük modifikasyonlar yap,larak kullan,lm, t,r. Otolitik aktivitesi belirlenecek izolatlar uygun besiyerinde iki kez aktifle tirilmi tir. Aktifle tirilen izolatlar falkon tüplere al,narak



10700 g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırılmış ve hücre biyokütlesine uygun olarak peletler 1, 3 ve 5 mL potasyum fosfat tamponuyla (100 mM, pH:7,0) iki kez yıkılmıştır. Zolat yoğunluğu 0.6-0.8 (OD<sub>620</sub>) aralığında tampon kullanılarak ayarlanmıştır. Ardından belirli yoğunlukta hücre süspansiyonları, 96 kuyucuklu mikrolakalara doldurulmuş plakalar 24 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon öncesi ve 24 saat inkübasyon sonundaki hücre yoğunlukları, mikrolaka spektrofotometrede (Epoch, BioTech Instruments, ABD) 620 nanometre dalga boyunda ölçülmüştür. Zolatların otoliz yüzdesi;

$$\% \text{ Otoliz} = 100 - [(A1/A2) \times 100]$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Cibik vd., 2006). Burada A1 en düşük OD<sub>620</sub> değerini (son okuma) ve A2 ise en yüksek OD<sub>620</sub> değerini (ilk okuma) ifade etmektedir.

#### **3.4. Zolatların Tanımlanması,**

Zolatların tanımlanmasında Hazır Dalca (2015) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu için yüksek otolitik aktiviteye sahip 12'isi süt ve 17'isi peynir olmak üzere toplam 29 adet laktik asit bakterisi izolat seçilmiştir. -80°C'deki mezofilik ve termofilik izolatlar sırasıyla 30 ve 43°C sıcaklıkta MRS ve M17 katı besiyerine çizim yöntemiyle ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tek düz en koloniler seçilerek MRS ve M17 sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Genomik DNA izolasyonu, 10<sup>9</sup> kob/mL hücre alınarak genomik DNA saflaştırma kiti (PureLink<sup>®</sup> Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan genomik DNA'ların saflık kontrolleri spektrofotometrede (PG Instruments, Birleşik Krallık) 260/280 nm dalga boyundaki absorbans oranı ve %0,8'den düşük agaroz jel (Sigma) üzerinde elektroforez sisteminde (Thermo Fisher Scientific, ABD) yürütülmesi ardından DNA görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) görüntülenerek belirlenmiştir.

Seçilen izolatlar arasında benzer sonuçların ayrılması için genomik (GTG)<sub>5</sub> parmak izi profilleri karşılaştırılmıştır. Bu tekrar serilerinin çoğaltılması için her bir suş için 20 µL'lik PZR karışımı kullanılmıştır. Söz konusu karışım 4 µL master mix (5\*FIREPol<sup>®</sup> Master Mix / SOLIS BioDyne), 1 µL primer (5-GTGGTGGTGGTGGTG-3), 1 µL kalıplaştırılmış DNA ve toplam hacim 20 µL olacak şekilde steril ultra saf su kullanılmıştır. PZR işlemi 95°C 3

1 dakika ön denatürasyon, 30 döngü 95°C 1 dakika, 45°C 30 saniye, 72°C 5 dakika ile 72°C 10 dakika son uzama program, uygulanm, t.r. PZR ürünleri %10'lik agaroz jelde (Sigma) yürütülerek jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) olan bant profilleri analiz edilmiştir. (GTG)<sub>5</sub> profil farklı, esasına göre izolatlar gruplandırılmış, t.r.

LAB izolatlarının tanımlanması için 16S rDNA geninin 1464 baz bölümü için farklı primer çifti (529F-1491R ve 27F-780R) kullanılarak PZR ile çoğaltılmış, t.r. PZR karışımı, 5 µL tampon, 2 µL dNTP karışımı (Fermentas), 1'er µL (529F 5' GTGCCAGCMGCCGCGG 3' - 1491R 5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3' ve 27F 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' - 780R 5' TACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3') ileri ve geri yönlü primer, 1 µL Hi-Fi Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 2 µL genomik DNA'dan oluşur ve toplam hacim 50 µL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tüplere Techne (Birkbeck Krallık) cihazında 95°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben 30 döngü 95°C'de 30 saniye, 57°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve sonunda 72°C'de 5 dakika içeren bir program uygulanmıştır, t.r.

PZR ile çoğaltılan fragmentlerin doğruluğu ve saflık kontrolü %1 agaroz jelde (Sigma) yürütülerek izlenmiştir. Doğru büyüklükte ve saflıktaki PZR fragmentlerin PZR saflaştırma kiti (Fermentas) ile temizliği yapıldıktan sonra, RefGen Gen Araştırmalar ve Biyoteknoloji A.Ş. (Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Ankara) tarafından DNA dizi analizi yapıldı. Çalışmada bakterilerden elde edilen fragmentlerin DNA dizileri elde edilen dizinin Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'ne bağlı, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) veri tabanı üzerinden dizi benzerliği araştırılarak gerçekleştirilmiştir ve nihai tanımlama yapılmıştır, t.r.

### 3.5. Otolitik Aktiviteye Çevresel Koşulların Etkisinin Belirlenmesi

Tanımlama yapılan 12 laktik asit bakterisinin farklı sıcaklık (10, 20, 30 ve 40°C), pH (3,5, 4,0 ve 5,0) ve NaCl konsantrasyonlarındaki (%0,5, 1, 3, 5, 7 ve 10) otolitik davranışları araştırılmış, t.r. -80°C'de stoklanan kültürler MRS veya M17 sıvı besiyerinde aktifletirmenin ardından 10700g'de 5 dakika santrifüjlenerek (MPW MED Instruments, MPW-351 R Var ova, Polonya) toplanmıştır, t.r. Bakteri kültürlerinin otolizini üzerine ortam pH'sinin etkisini belirlemek için hasat edilen bakteri hücreleri pH'si 3,5, 4,0 ve 5,0'a ayarlanmış olan potasyum fosfat (100 mM) tamponunda çözündürülmüş ve 30°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda bakterilerin otolitik aktivitesi hesaplanmıştır, t.r. Tuz konsantrasyonunun

etkisi için %0,5, 1, 3, 5, 7 ve 10 NaCl içeren potasyum fosfat (100 mM, pH 7.0) tamponunda çözüldürülmü ve 30°Cde 24 saat inkübe edilerek bakterilerin otolitik aktivitesi hesaplanm, t.r. S,cağı, n otolitik aktivite üzerine etkisini ölçmek için hasat edilen bakteriler 100 mM potasyum fosfat tamponunda (pH=7,0) çözüldürülmü 10, 20, 30 ve 40°Cde 12 ve 24 saat inkübasyon süresince ölçümleri yapılm, t.r. Deneysel parametreler ile hazırlanan tüm tampon ortamlarında bakteriler 0,6-0,8 (OD<sub>620</sub>) hücre yoğunluğunda çal, lm, ve hücrelerin yoğunluğunun de i imi plaka okuyucuda ölçülmü tür.

## 4. ARA TIRMA BULGULARI VE TARTI MA

### 4.1. Laktik Ait Bakteri zolatlar,n,n Otoliz De erleri

Çal, mam,zda 16 çi süttten izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakterilerinin 24 saat inkübasyon sonunda belirlenen % otoliz de erleri s,ras,yla Çizelge 4.1de verilmi tir. Çi süt örneklerinden toplam 396 bakteri izole edilmi olup izolatlar,n 90 tanesinin çal, lan ko ullardaki % otoliz de eri s,f,r olarak bulunmu tur. Kalan 306 izolat,n % otoliz de erleri %0,2 (S930MRSE) ila %71,5 (S1630M17I) aras,nda de i im göstermi tir. 30°Cde geli en mezofilik izolatlar (228 izolat) kendi aras,nda de erlendirildi inde 55 izolatta otolitik aktivite saptanmam, iken otolitik aktivite gösteren izolatlar,n 24 saatlik inkübasyon sonundaki otoliz de erleri %0,2 ila %71,5 aras,nda de i im göstermi tir. On dokuz izolat,n (%8,3) otoliz de eri %20-30 aras,nda saptanm, iken, 9 izolat,n (%3,9) otoliz de erinin %30un üzerinde oldu u tespit edilmi tir. Mezofilik izolatlar,n yakla ,k %12sinin % otoliz de eri 20 ve üzerinde bulunmu tur.

Çal, mada çi sütlerden izole edilen 43°Cde geli en (termofilik) toplam 168 izolat,n 35 tanesinde otolitik aktivite belirlenmezken kalan 133 izolat,n otolitik aktivitesinin %0,6 ile %68 aras,nda de i ti i tespit edilmi tir. zolatlardan 21 adedinin otoliz de eri %20-30 aras,nda de i im gösterirken 12 adedinin otoliz de eri ise %30-40 aral, nda bulunmu tur. Otolitik aktivitesi %40un üzerinde olan 7 izolat (S643M17G, S143M17F, S643M17E, S143M17G, S643M17A, S343M17I ve S1643M17D) belirlenmi tir.

Çi sütlerden elde edilen izolatlar,n otolitik aktiviteleri genel olarak de erlendirilirse otolitik aktivite gösteren izolatlar,n %9,2sinin otoliz de erinin %30un üzerinde oldu u belirlenmi tir. Genel olarak termofilik izolatlar,n daha yüksek otolitik potansiyele sahip oldu u görülmektedir (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1.** Çi sütlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatlar, n, n % otoliz değerleri\*

zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz
S930MRSE	0,2	S743M17C	3,8	S830M17E	7,1
S130MRSC	0,5	S1330M17G	3,8	S1543MRSA	7,2
S843M17G	0,6	S1243M17D	3,9	S343M17B	7,2
S530MRSH	0,6	S943M17D	3,9	S1130MRSH	7,4
S1230MRSJ	0,6	S1243MRSE	4,0	S543M17F	7,7
S1530M17H	0,7	S830M17A	4,1	S1530M17B	7,7
S1143M17D	1,1	S430MRSG	4,2	S530MRSB	7,8
S1030M17B	1,1	S1030M17F	4,3	S330MRSG	7,9
S1143M17C	1,2	S1243MRSB	4,4	S1330M17I	8,0
S430MRSD	1,4	S1430M17I	4,6	S443MRSA	8,0
S1230M17G	1,4	S930MRSC	4,7	S830M17J	8,0
S1130MRSB	1,4	S830M17F	4,7	S230M17F	8,1
S1243M17C	1,4	S843M17D	4,8	S1443MRSB	8,2
S1230M17C	1,6	S243MRSC	4,8	S630M17E	8,3
S330MRSB	1,8	S843M17C	4,9	S1330M17D	8,4
S1143M17A	1,9	S843MRSF	5,0	S1430MRSA	8,5
S930MRSD	1,9	S130MRSD	5,1	S643M17B	8,7
S1230MRSE	2,0	S530M17E	5,3	S1230MRSF	8,7
S543MRSD	2,0	S230M17G	5,4	S230MRSF	8,7
S1143M17B	2,0	S730M17I	5,5	S1230M17H	8,7
S830MRSD	2,0	S230MRSB	5,7	S730M17J	8,8
S1230M17D	2,1	S1443MRSA	5,7	S1630MRSC	8,8
S243MRSI	2,2	S943M17A	5,7	S830MRSC	8,9
S1230M17A	2,4	S1130M17E	5,7	S230MRSC	8,9
S230MRSD	2,5	S1243MRSD	5,8	S530MRSC	9,0
S1230MRSA	2,5	S1630M17J	5,8	S443MRSH	9,0
S930M17C	2,6	S530M17F	5,8	S330M17B	9,0
S1030M17D	2,8	S443MRSF	5,9	S743M17D	9,0
S1130MRSI	2,9	S843MRSD	6,0	S230MRSE	9,1
S230MRSG	2,9	S743M17E	6,0	S1030M17E	9,1
S930MRSB	2,9	S1130MRSF	6,0	S830M17H	9,1
S543MRSG	3,0	S1443M17I	6,3	S930M17H	9,2
S1030M17H	3,2	S530M17C	6,3	S1443M17C	9,2
S1030M17I	3,2	S130MRSG	6,4	S1443M17F	9,2
S1243MRSA	3,3	S943M17B	6,5	S1143M17E	9,3
S243MRSB	3,4	S743MRSH	6,6	S130MRSI	9,4
S230MRSJ	3,6	S1130MRSG	6,7	S230M17I	9,4
S1243MRSF	3,6	S130MRSJ	6,8	S443MRSI	9,5
S1030M17G	3,6	S730M17D	7,1	S930MRSF	9,6
S1630MRSA	3,7	S930M17E	7,1	S230MRSI	9,6
S543MRSF	3,7	S130MRSA	7,1	S930M17D	9,6

**Çizelge 4.1.** Çi sütlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatlar,n,n % otoliz de erleri\* (Devam)

zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz
S1330M17B	9,6	S743MRSG	11,8	S1043M17J	16,0
S1630M17G	9,6	S1630MRSF	11,8	S1530MRSA	16,1
S230M17J	9,7	S1630MRSD	11,8	S743MRSC	16,1
S1530MRSD	9,8	S1043M17I	11,9	S230M17H	16,1
S230MRSH	9,8	S330MRSH	11,9	S1043M17F	16,5
S830MRSB	9,9	S1443M17A	12,1	S1643M17F	16,6
S743MRSF	10,0	S330MRSE	12,1	S1043M17E	16,6
S530M17D	10,0	S1643MRSF	12,3	S1043M17D	16,7
S643MRSB	10,0	S730M17F	12,4	S1130MRSJ	16,9
S543M17B	10,2	S730M17B	12,5	S230M17B	17,0
S130MRSE	10,2	S730M17E	12,6	S443M17I	17,1
S130MRSF	10,3	S830MRSG	12,7	S1630M17D	17,1
S130MRSH	10,3	S243MRSF	12,7	S1430M17C	17,3
S343M17D	10,3	S330M17C	12,7	S343M17F	17,5
S943M17C	10,3	S243M17B	12,7	S530M17B	17,6
S943M17E	10,4	S843M17E	12,9	S443M17A	17,8
S1343MRSB	10,5	S843MRSE	13,0	S1130M17H	17,9
S430MRSE	10,5	S230M17A	13,1	S1630M17C	18,0
S543M17G	10,6	S230M17C	13,2	S643M17D	18,0
S1330M17J	10,6	S1030MRSA	13,2	S1030M17J	18,1
S1543M17F	10,8	S330MRSF	13,3	S1630M17A	18,1
S730M17C	10,8	S1630MRSH	13,3	S1043M17H	18,2
S1430MRSB	10,9	S1643MRSE	13,5	S1543MRSC	18,3
S830M17I	10,9	S1043MRSA	13,5	S1530M17G	18,3
S1630MRSI	11,0	S1043M17B	13,7	S243M17E	18,3
S1530MRSC	11,0	S330M17E	13,7	S1130M17C	18,3
S830MRSE	11,1	S1330M17A	13,9	S743MRSB	18,4
S1643MRSC	11,1	S1630M17H	14,2	S643M17J	18,5
S243M17G	11,1	S1343MRSA	14,2	S1330MRSD	18,9
S830MRSA	11,3	S843MRSA	14,3	S743M17A	19,1
S1330M17C	11,5	S1530MRSB	14,5	S643M17I	19,1
S1630M17F	11,5	S1543M17H	14,7	S330MRSI	19,1
S1030MRSD	11,5	S843MRSB	14,8	S1330MRSC	19,3
S1030M17C	11,5	S1443M17D	15,1	S343M17E	20,1
S543MRSJ	11,6	S143M17C	15,1	S843MRSC	20,1
S743MRSE	11,6	S1343M17J	15,1	S243M17A	20,3
S130MRSB	11,7	S1030MRSG	15,1	S743MRSA	20,4
S1530M17A	11,7	S530MRSF	15,3	S1030MRSC	20,4
S943M17F	11,7	S1330MRSB	15,5	S1030MRSF	20,7
S730M17A	11,7	S730MRSD	15,7	S343M17G	20,8
S1543MRSD	11,7	S230M17E	16,0	S1630MRSG	20,8

**Çizelge 4.1.** Çi sütlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatlar,n,n % otoliz de erleri\* (Devam)

zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz
S1530M17D	20,9	S543MRSI	24,6	S543M17I	32,4
S543M17C	20,9	S543M17E	24,6	S343M17J	33,2
S1530M17J	21,2	S643M17C	24,8	S543M17D	33,5
S1330M17F	21,8	S530MRSA	25,8	S330M17A	33,6
S343M17H	21,8	S443M17C	26,0	S730MRSE	36,5
S730M17H	22,3	S543M17H	26,2	S1030MRSE	36,6
S1430M17F	22,4	S1043M17C	26,6	S1430M17D	36,6
S1143M17F	22,6	S530MRSD	26,6	S730MRSA	37,7
S830MRSF	22,9	S730M17G	27,7	S1030MRSH	38,0
S443M17J	22,9	S1630M17B	28,8	S730MRSC	38,1
S230MRSA	23,0	S330M17D	29,3	S143M17J	38,9
S1030M17A	23,0	S1043M17A	29,5	S643M17F	39,5
S1530M17C	23,2	S1043M17G	30,0	S643M17G	47,6
S643M17A	23,2	S343M17A	30,2	S143M17F	51,9
S730MRSE	23,3	S1530M17E	30,2	S643M17E	51,9
S543MRSE	23,4	S343M17C	30,2	S143M17G	53,5
S543M17A	23,6	S543M17J	30,2	S643MRSA	55,2
S1530M17F	23,7	S143M17H	31,1	S343M17I	58,6
S143MRSD	24,1	S743M17B	31,3	S1643M17D	68,0
S443M17B	24,5	S643M17H	31,9	S1630M17I	71,5

\*: zole edilen 90 izolat,n çal ,lan ko ullardaki % otoliz de eri s,f,r olarak bulundu undan çizelgede gösterilmemi tir.

**Çizelge 4.2.** Farklı otoliz de erlerine sahip çi süt izolatlar,n,n say,lar,

% Otoliz De eri	Mezofilik zolat Say,s,	Termofilik zolat Say,s,	Toplam
0	55	35	90
0-10	86	43	129
10-20	59	50	109
20-30	19	21	40
>30	9	19	28
TOPLAM	228	168	396

Ara t,rnam,zda 16 peynir örne inden izole edilen laktik asit bakterilerinin 24 saat inkübasyon sonunda belirlenen % otoliz de erleri Çizelge 4.3'öte verilmi tir. Farklı tip peynir örneklerinden toplam 482 laktik asit bakterisi izole edilmi olup, izolatlar,n 140 tanesinin çal ,lan ko ullardaki % otoliz de eri s,f,r olarak bulunmu tur. Otolitik aktivitesi belirlenen 342 izolat,n % otoliz de erleri %0,1 (P530M17E ve P1430M17A) ile %58

(P830M17D) arasında de i mi tir. Mezofilik karakterli (30°C'de geli en) 220 izolat kendi arasında de erlendirildi inde 51 izolatta otolitik aktivite saptanmam, iken otolitik aktivite gösteren izolatlar, n 24 saatlik inkübasyon sonundaki otoliz de erleri %0,1 ile %58 arasında de i im göstermi tir. On yedi mezofilik izolat, n (%7,7) otoliz de eri %20-30 arasında saptanm, iken, 7 izolat, n (%3,2) otoliz de erinin %30'un üzerinde oldu u tespit edilmi tir. Mezofilik izolatlar, n yakla k %11'inin % otoliz de eri 20 ve üzerinde bulunmu tur.

Peynirlerden izole edilen termofilik (43°C'de geli en) toplam 262 izolat, n 89 tanesinde otolitik aktivite belirlenmezken kalan 173 izolat, n otolitik aktivitesinin %0,2 ile %51,5 arasında de i ti i belirlenmi tir. izolatlardan 32 adedinin otoliz de eri %20-30 arasında de i im gösterirken 9 adedinin otoliz de eri ise %30-40 aral, nda tespit edilmi tir. Termofilik izolatlar, n 3 tanesinin (P543MRSC, P343M17F ve P1343M17C) otolitik aktivitesinin %40'un üzerinde oldu u görülmü tür.

Peynirlerden mezofilik 220 ve termofilik 262 izolat elde edilmi tir. Elde edilen izolatlar, n otolitik aktiviteleri genel olarak de erlendirilirse otolitik aktivite gösteren izolatlar, n (toplam 342 izolat) %4,7'sinin (16 izolat) otoliz de erinin %30'un üzerinde oldu u görülmektedir. Otolitik aktivitesi %20'nin üzerinde olan 24 mezofilik ve 41 termofilik laktik asit bakteri izolat, oldu u görülmektedir (Çizelge 4.4). Genel olarak çi süt izolatlar, nda elde edilen sonuçlarla benzer ekilde peynir izolatlar, nda da termofilik izolatlar, n daha yüksek otolitik potansiyele sahip oldu u belirlenmi tir (Çizelge 4.4).

Çal, mam, zda çi süt ve peynir örneklerinden toplam 878 izolat elde edilmi olup bu izolatlar, n 230'unda otolitik aktivite belirlenmemi tir. Otolitik aktivitesi %20 ile %30 arasında olan toplam 89 ve %30'un üzerinde olan 44 izolat elde edilmi tir. Otolitik aktivite gösteren izolatlar, n (648 izolat) otolitik aktiviteleri %0,1 ile %71,5 arasında bulunmu tur. Çi süt ve peynir örneklerinden izole edilen mezofilik ve termofilik bakterilerin % otoliz de erlerinin da l, m, ekil 4.1 ve 4.2'de veri mi tir.

Ara tırma bulgular, m, z literatürdeki farklı çal, malarda (Cibik ve Chapot-Chartier, 2000; Ouzari vd., 2002, El Soda vd., 2003; Cibik ve Chapot-Chartier, 2004; Hazır Dalca, 2015) laktik asit bakteri için belirlenen % otoliz de erleri ile benzer bulunmu tur.



**Çizelge 4.3.** Peynirlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakterii izolatları, n, n % otoliz de erleri\*

zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz
P530M17E	0,1	P1143MRSF	3,7	P130MRSJ	6,3
P1430M17A	0,1	P830MRSE	3,8	P130M17B	6,3
P1643MRSG	0,2	P843M17E	3,9	P243MRSA	6,3
P430M17F	0,3	P543M17J	3,9	P830MRSH	6,4
P1030M17A	0,3	P530MRSH	3,9	P830M17F	6,6
P630M17I	0,4	P1243M17I	4,0	P730M17I	6,7
P1043MRSB	0,4	P143MRSH	4,0	P1043MRSD	6,8
P143M17I	0,5	P1330M17J	4,0	P1030MRSA	6,8
P630MRSB	0,5	P1430M17H	4,1	P1543MRSE	6,9
P143M17D	0,6	P130MRSH	4,2	P730MRSF	6,9
P730M17E	0,7	P843M17C	4,2	P1143MRSC	6,9
P730M17D	0,7	P1243MRSG	4,3	P930MRSA	6,9
P543M17D	0,7	P943M17J	4,3	P1530MRSH	7,0
P630M17G	0,8	P1443MRSB	4,4	P330M17H	7,0
P1030M17I	1,0	P330M17B	4,4	P1330MRSA	7,0
P143MRSI	1,1	P630M17B	4,4	P743M17I	7,1
P443M17E	1,2	P1543M17A	4,5	P1430M17I	7,1
P1643MRSA	1,3	P1443M17B	4,7	P1443MRSG	7,1
P1643MRSD	1,4	P430M17E	4,7	P1030M17F	7,1
P830M17C	1,5	P1630M17C	4,7	P443MRSH	7,3
P1030M17C	1,9	P1230M17G	4,8	P330M17E	7,3
P130M17H	2,0	P1443MRSE	5,0	P1330M17H	7,3
P143MRSA	2,0	P1143MRSE	5,0	P830M17I	7,4
P930M17B	2,3	P743MRSE	5,1	P530MRSG	7,5
P330M17G	2,4	P530MRSB	5,2	P1430MRSB	7,5
P430M17G	2,4	P1030M17E	5,3	P1130M17A	7,5
P830MRSD	2,5	P1443M17F	5,4	P343M17B	7,6
P843M17A	2,5	P730M17G	5,4	P1230M17C	7,7
P143MRSD	2,6	P743M17J	5,5	P1243MRSC	7,8
P730MRSC	2,6	P843MRSF	5,5	P1630MRSA	7,9
P930M17A	2,7	P1530MRSI	5,6	P1130M17H	8,0
P1443M17G	2,7	P143M17H	5,7	P630M17D	8,1
P543M17G	2,8	P1443MRSD	5,7	P730MRSH	8,1
P1430M17J	2,9	P943MRSB	5,7	P1243MRSE	8,2
P843M17B	3,1	P1430M17E	5,9	P1143MRSA	8,2
P130MRSG	3,4	P1243MRSF	5,9	P1230M17F	8,3
P1330MRSB	3,4	P1243MRSH	6,0	P830M17J	8,4
P743M17F	3,6	P730M17A	6,0	P843M17F	8,4
P1530M17G	3,6	P530MRSD	6,0	P343M17E	8,4
P1243MRSA	3,6	P1143MRSD	6,1	P1243M17E	8,5
P1543M17H	3,7	P1443M17E	6,1	P1630MRSD	8,6

**Çizelge 4.3.** Peynirlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatlar,n,n % otoliz de erleri (Devam)\*

zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz	zolat Kodu	% Otoliz
P430MRSB	8,6	P1143M17K	10,6	P1430MRSD	13,3
P730MRSB	8,7	P1130M17E	10,7	P1243M17G	13,4
P730M17C	8,7	P1130M17B	10,7	P1543MRSD	13,5
P1530MRSB	8,7	P1543MRSG	10,8	P1330M17A	13,5
P1030MRSE	8,8	P1343M17H	11,0	P1430MRSC	13,5
P1443M17H	8,9	P743M17H	11,2	P1330M17B	13,6
P1630MRSE	8,9	P343M17D	11,3	P1243M17C	13,6
P943M17C	8,9	P1530MRSG	11,3	P730MRSI	13,7
P630MRSA	8,9	P443MRSC	11,4	P1230M17A	13,7
P1543MRSB	8,9	P430MRSF	11,4	P1343M17B	14,0
P443MRSB	9,0	P330M17I	11,7	P543M17A	14,0
P1530MRSA	9,0	P343MRSA	11,7	P930MRSE	14,1
P830MRSG	9,1	P1130M17C	11,7	P530MRSA	14,2
P730M17F	9,1	P1430MRSF	11,8	P730MRSJ	14,3
P1243MRSB	9,2	P1143M17M	11,8	P1530M17C	14,5
P1043MRSC	9,2	P1243M17B	11,9	P1343M17G	14,5
P330M17A	9,2	P1443MRSC	11,9	P243MRSE	14,6
P130MRSF	9,3	P430MRSG	11,9	P643M17B	14,6
P1343MRSD	9,4	P1530M17H	12,0	P1230M17B	14,7
P930MRSC	9,4	P143MRSB	12,0	P1043M17H	14,8
P1430MRSA	9,4	P130MRSD	12,2	P630M17E	14,9
P243M17A	9,6	P1330M17G	12,2	P730MRSG	14,9
P1343MRSB	9,6	P1130M17F	12,2	P1143M17I	14,9
P830M17H	9,6	P143MRSF	12,3	P1030M17J	14,9
P243MRSB	9,6	P1330M17C	12,4	P943M17E	14,9
P1443MRSA	9,8	P1343MRSF	12,5	P1143M17F	15,0
P830M17G	9,8	P630MRSD	12,5	P1230M17I	15,0
P730MRSE	9,8	P1143M17D	12,6	P1643M17I	15,2
P730M17B	9,9	P1543MRSA	12,7	P1530MRSE	15,3
P543M17E	9,9	P130MRSC	12,7	P1243M17F	15,4
P1430MRSG	10,0	P843M17G	12,7	P430MRSJ	15,6
P1130M17G	10,0	P130MRSI	12,7	P1443MRSH	15,6
P1330MRSC	10,1	P1143M17B	12,8	P930MRSD	15,7
P743MRSF	10,2	P243M17G	12,8	P843M17H	15,7
P1530M17E	10,2	P243M17I	12,9	P1343M17D	15,7
P130MRSE	10,2	P1243M17H	13,0	P443MRSG	15,8
P643M17I	10,2	P630M17F	13,1	P1230M17D	15,9
P1030MRSD	10,3	P330M17D	13,1	P1143M17A	16,1
P943M17H	10,5	P330M17C	13,2	P1430MRSH	16,2
P743M17E	10,6	P730MRSD	13,3	P1530M17D	16,3
P843M17I	10,6	P1143MRSB	13,3	P1343M17E	16,4

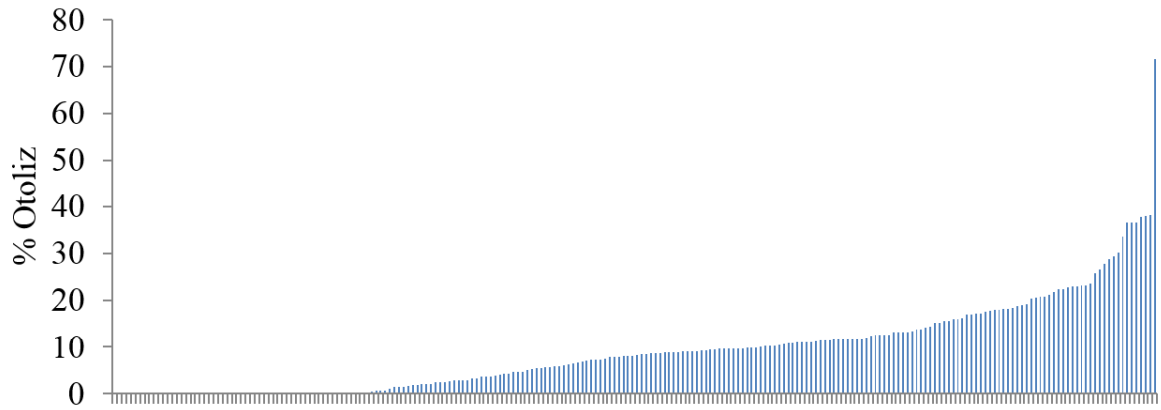
**Çizelge 4.3.** Peynirlerden izole edilen mezofilik ve termofilik laktik asit bakteri izolatları, n, n % otoliz değerleri (Devam)\*

izolat Kodu	% Otoliz	izolat Kodu	% Otoliz	izolat Kodu	% Otoliz
P1530MRSC	16,5	P843M17J	20,2	P530M17D	24,6
P1543M17J	16,6	P943M17I	20,3	P430MRSE	24,8
P630MRSE	16,8	P1143M17H	20,4	P530MRSI	24,8
P1643M17J	16,9	P1643M17A	20,6	P430MRSH	25,0
P1543M17F	17,0	P1143M17G	21,0	P343M17H	25,1
P1430MRSE	17,0	P343MRSB	21,2	P630M17A	25,1
P143M17J	17,3	P1143M17C	21,2	P243M17H	25,3
P530MRSE	17,4	P1530MRSF	21,3	P143M17B	25,3
P430MRSA	17,4	P343M17G	21,3	P930M17C	26,0
P1343M17F	17,5	P1543MRSH	21,4	P730MRSA	27,2
P630M17C	17,6	P1343M17A	21,5	P1630M17I	27,4
P1530MRSJ	17,6	P930M17I	21,5	P943M17A	27,6
P643MRSH	17,7	P1543M17C	21,5	P243M17D	28,1
P1030MRSC	17,8	P343MRSC	21,6	P343M17A	28,4
P1143M17E	17,9	P643M17H	21,7	P1230M17E	28,8
P1543MRSC	18,0	P1243M17K	21,8	P343M17C	29,9
P930M17E	18,0	P643M17G	21,9	P1343MRSC	30,1
P1330M17I	18,1	P343MRSG	22,1	P1330M17D	30,1
P643M17C	18,4	P530MRSC	22,2	P1630M17F	30,8
P1343MRSH	18,5	P1630M17D	22,4	P743M17G	31,0
P430MRSD	18,5	P443MRSF	22,6	P930M17H	31,8
P1543MRSF	18,5	P643M17D	22,7	P243M17B	31,9
P1643M17E	18,5	P1030MRSB	22,8	P643M17J	32,0
P930MRSB	18,6	P1343MRSG	23,0	P930M17D	35,5
P843M17D	18,7	P143M17F	23,1	P530MRSF	35,7
P343M17I	19,1	P430MRSI	23,2	P543MRSE	36,4
P830MRSF	19,4	P930M17J	23,3	P543MRSF	38,0
P243M17J	19,4	P343MRSE	23,4	P543MRSC	43,3
P643M17F	19,9	P343M17J	23,7	P343M17F	43,6
P243MRSD	19,9	P543M17F	23,8	P930M17G	49,3
P1643M17C	19,9	P343MRSH	23,9	P1343M17C	51,5
P830MRSA	20,2	P343MRSF	24,1	P830M17D	58,0

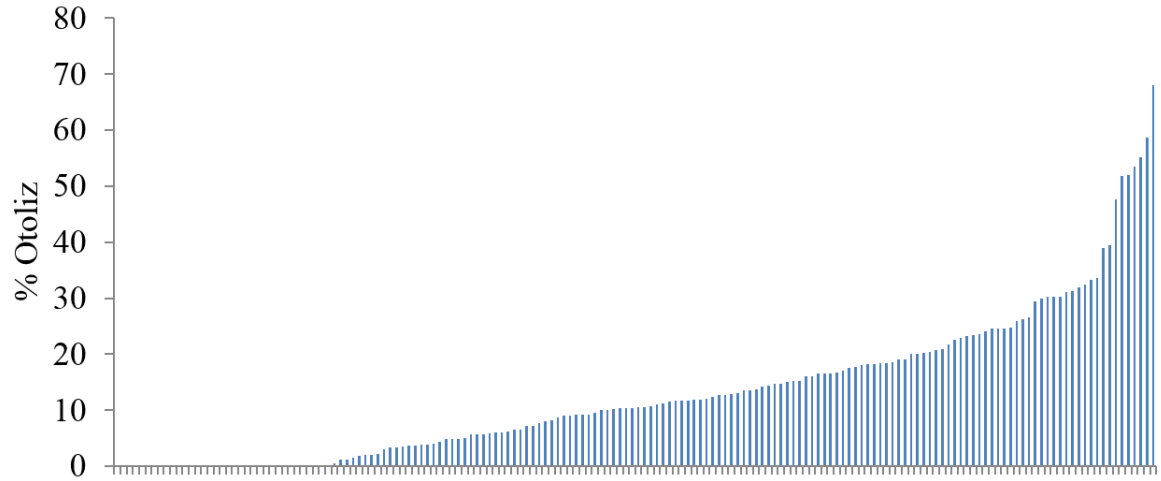
\*: izole edilen 140 izolat, n çal, lan ko ullaardaki % otoliz de eri s, f, r olarak bulundu undan çizelgede gösterilmemi tir.

**Çizelge 4.4.** Farklı % otoliz de erlerine sahip peynir izolatlar,n,n say,lar,

% Otoliz De eri	Mezofilik zolat Say,s,	Termofilik zolat Say,s,	Toplam
0	51	89	140
0-10	85	68	153
10-20	60	64	124
20-30	17	32	49
>30	7	9	16
TOPLAM	220	262	482

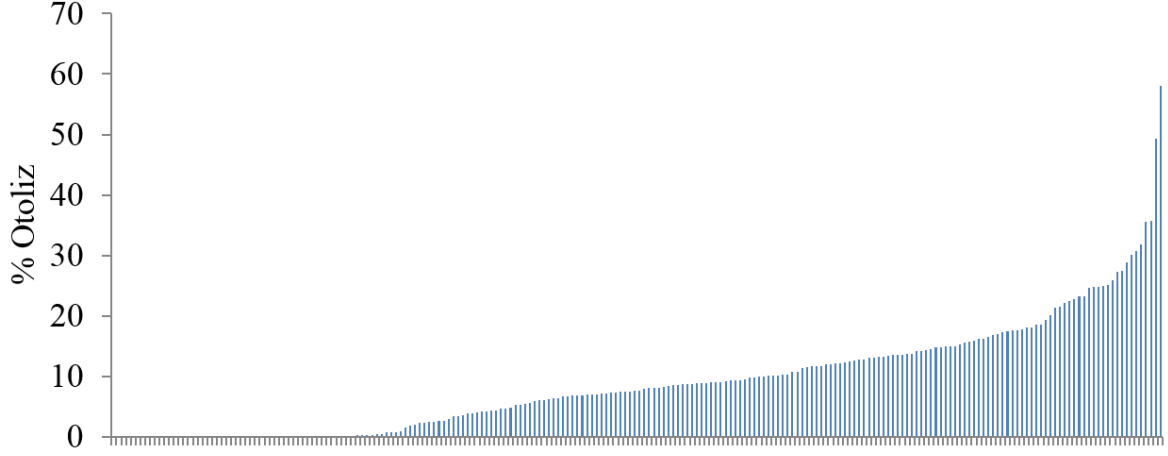


(a)

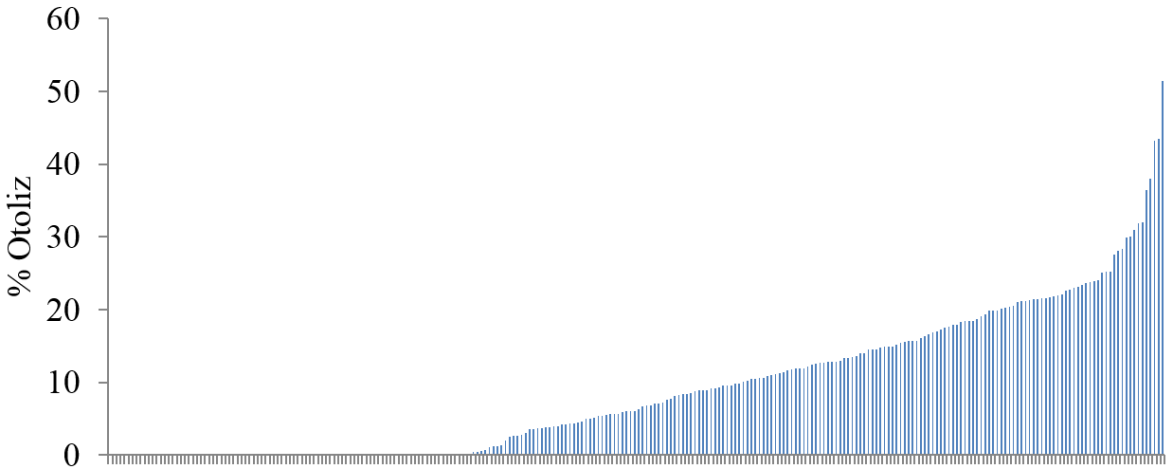


(b)

**ekil 4.1.** Çi sütlerden izole edilen mezofilik (a) ve termofilik (b) su lar,n % otoliz de erlerinin da ,l,m,



(a)



(b)

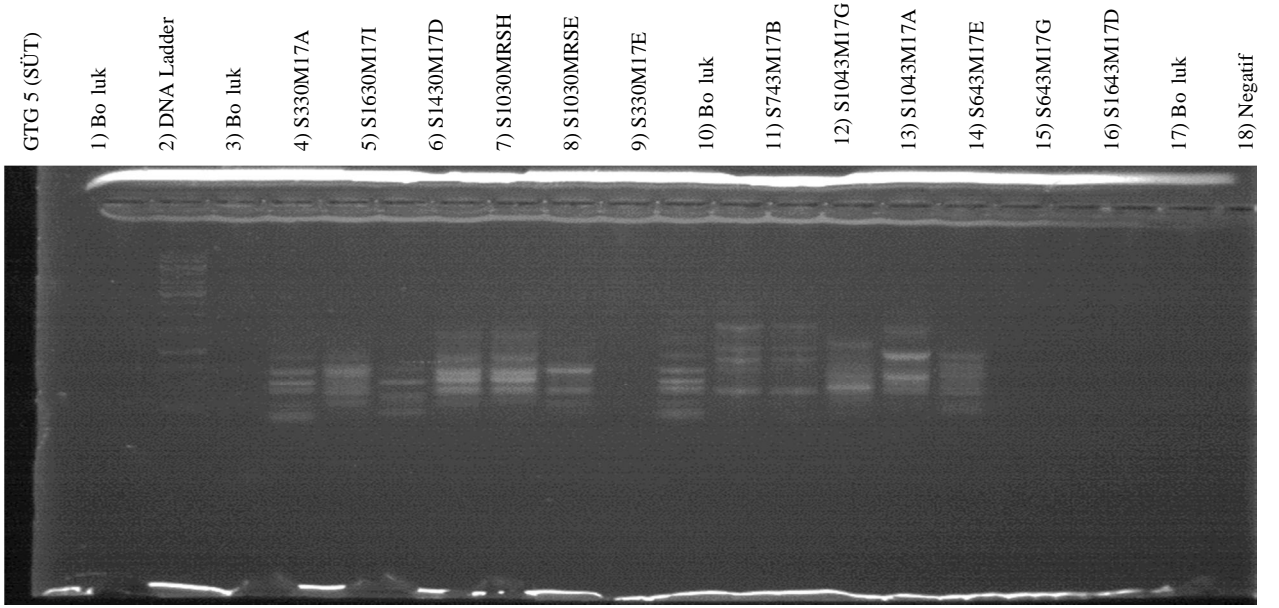
**ekil 4.2.** Peynirlerden izole edilen mezofilik (a) ve termofilik (b) su lar,n % otolitiz de erlerinin da ,l,m,

#### **4.2. Yüksek Otolitik Aktiviteye Sahip zolatlar,n Tan,mılanmas,**

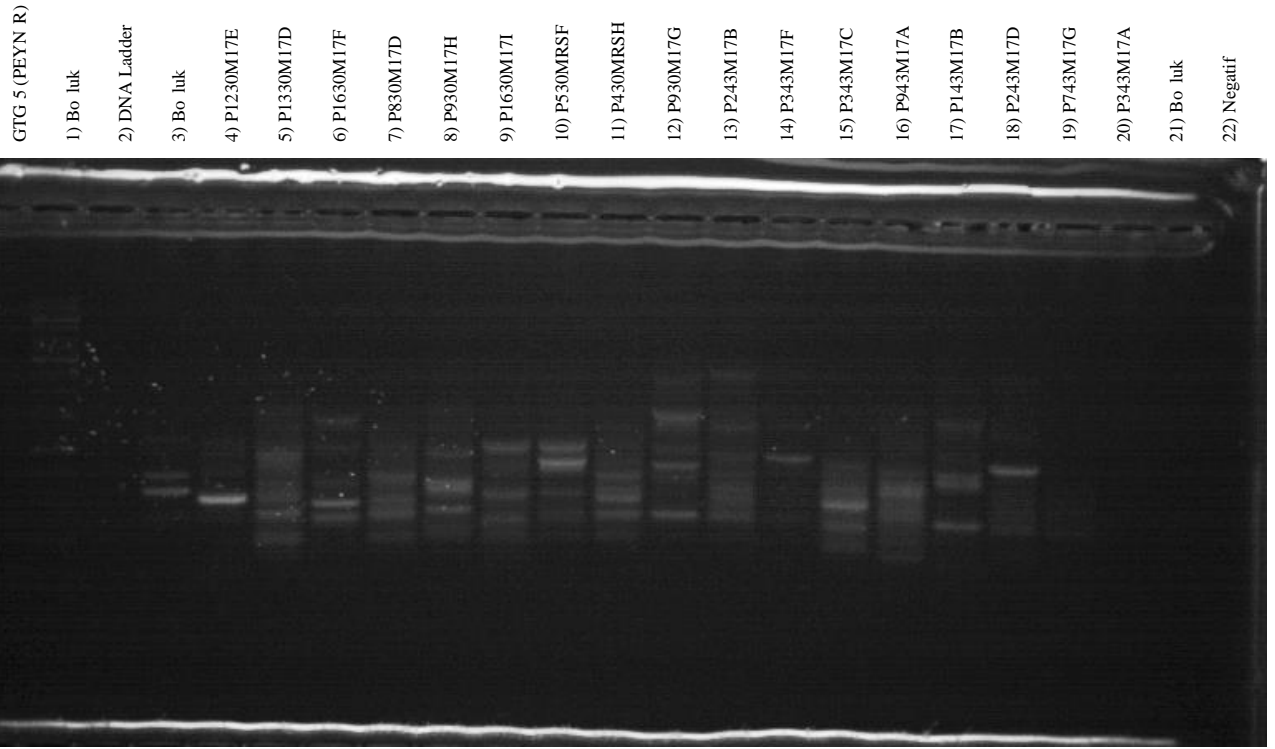
Ara t,rınam,zda izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan yüksek otolitik aktiviteye sahip 29 izolat seçilmi ve seçilen izolatlar,n tür düzeyinde tan,mılamalar, yapılm, t,r. Bu amaçla çi sütlerden elde edilen otolitik aktivitesi %13,7 ile %71,5 aras,nda de i en 12 izolat (S1043M17G, S1043M17A, S330M17E, S743M17B, S330M17A, S1030MRSE, S1430M17D, S1030MRSH, S643M17G, S643M17E, S1643M17D ve S1630M17I) ve peynirlerde elde edilen otolitik aktivitesi %24,9 ile %58 aras,nda de i en 17 izolat (P1230M17E, P1330M17D, P530MRSF, P430MRSH, P243M17B, P343M17F, P343M17C, P243M17D, P743M17G, P343M17A, P143M17B,

P1630M17I, P943M17A, P1630M17F, P930M17H, P930M17G ve P830M17D) seçilmiştir.

Aynı su ların tanımlama analizlerinde tekerrürlü kullanılm, önüne geçilmesi ve yüksek çeşitliliğe ulaşabilmek amacıyla (GTG)<sub>5</sub> parmak izi profili benzerliklerine 29 izolattan farklı bant veren su lar tanımlanmak üzere seçilmiştir. Çi süt ve peynir örneklerinden izole edilen bakterilerin (GTG)<sub>5</sub> parmak izi profillerinin jel görüntüsü ekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



**ekil 4.3.** Çi sütlerden izole edilen otolitik izolatların (GTG)<sub>5</sub> parmak izi profilleri



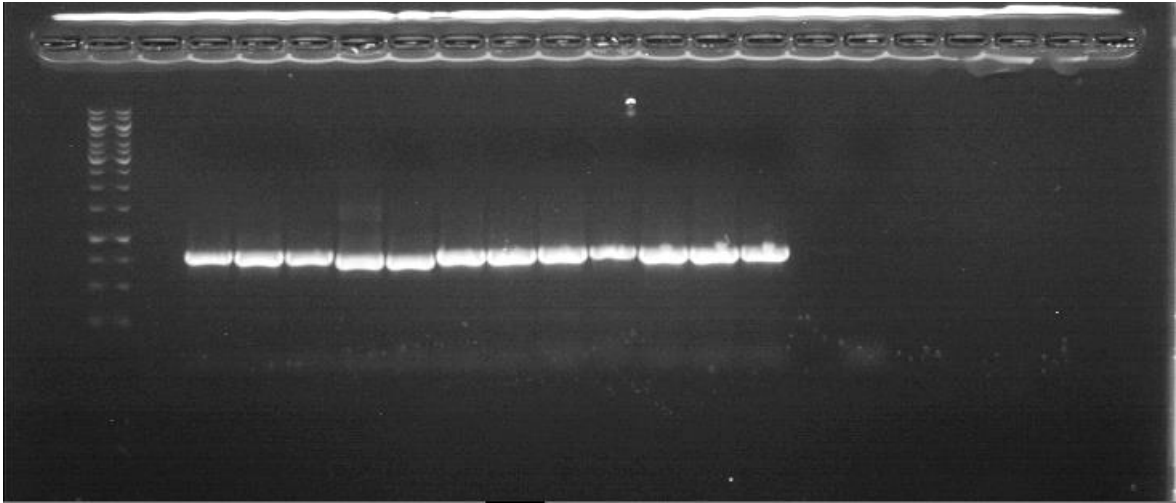
**ekil 4.4.** Peynir örneklerinden izole edilen otolitik izolatlar,n (GTG)<sub>5</sub> parmak izi profilleri

Seçilen laktik asit bakteri izolatlar,n,n tür seviyesindeki tanımlanması için 16S rRNA geninin birbiri ile karşılaştırılması, farklı bölümleri karşılaştırılması ve söz konusu genin 1464 bazlık bölümünün dizi analizi ile tanımlanması yapılmıştır. Bu şekilde rRNA geninin hemen hemen tamamına yakın kısmı değerlendirilmiştir. Bu bölgelerin karşılaştırılması amacıyla 16S-27F/16S-780R ve 16S-529F/1491R primer çiftlerinden yararlanılmıştır. Daha sonra sonuçlar NCBI veri tabanına kayıtlı dizi sonuçları ile karşılaştırılarak, izolatların hangi türle homolog oldukları belirlenmiştir.

izolatların genomik DNA'sından PZR ile çıkarılan ve 16S rRNA genine ait fragmentler ekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir. Ekilerden de görüldüğü gibi, 16S-27F/16S-780R primer çifti kullanıldığında her bir LAB izolatından 753 baz uzunluğunda bir adet, 16S-529F/1491R primer çifti ile de 962 baz uzunluğunda bir adet DNA fragmentinin çıkarıldığı, agaroz jel üzerinde tespit edilmiştir ve bu sonuç izolatlardan doğrudan bölge ve büyüklükte karşılaştırma yapıldığında göstermiştir. Özellikle DNA fragmentlerinin bir adet olması primerlerin özgül olduğu ve doğrudan karşılaştırılması gerektiği anlamına gelir. Ayrıca izolatlardan alınan DNA fragmentleri temizlendikten sonra DNA dizisi çıkarılmıştır.

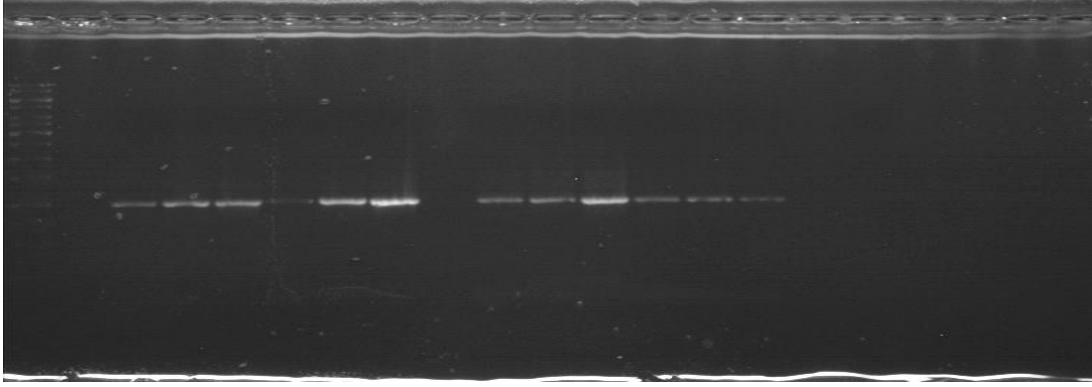
NCBI veri taban, kullan,larak yap,lan kar ,la t,rma sonucunda izolatlar,n tür düzeyindeki tan,mlanma sonuçlar, ve yüzdeleri Çizelge 4.5'te gösterilmi tir. Buna göre çi süt ve peynir örneklerinden izole edilen otolitik özellikteki 29 izolattan 17 tanesi laktik asit bakteri olmad, , için çal, madan ç,kar,lm, t,r. Tan,mlamas, yap,lan 12 laktik asit bakteri izolat,ndan; 2 adedi (P1230M17E ve P1330M17D) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 adedi (P530MRSF ve P430MRSH) *Lactobacillus plantarum*, 4 adedi (P343M17F, P343M17C, P743M17G ve P343M17A) *Enterococcus faecium* ve 4 adedi de (P243M17B, P243M17D, S1043M17G ve S1043M17A) *Enterococcus faecalis* türleri ile %96'n, üzerinde benzer bulunmu tur.

Tan,mlanan izolatlar,n otoliz oranlar, de erlendirildi inde, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Enterococcus faecalis* türlerine ait izolatlar,n her bir tür içindeki % otoliz de erlerinin benzer oldu u görülmü tür. Bu durum izolatlar,n ayn, türün ayn, su lar, olmas,ndan kaynaklanabilir (Haz,r Dalca, 2015). Tan,mlanan di er 2 türe ait izolatlar,n otolitik aktivitelerinin literatürle de uyumlu olarak (Cibik ve Chapot-Chartier, 2000) ba l, olarak de i ti i belirlenmi tir.

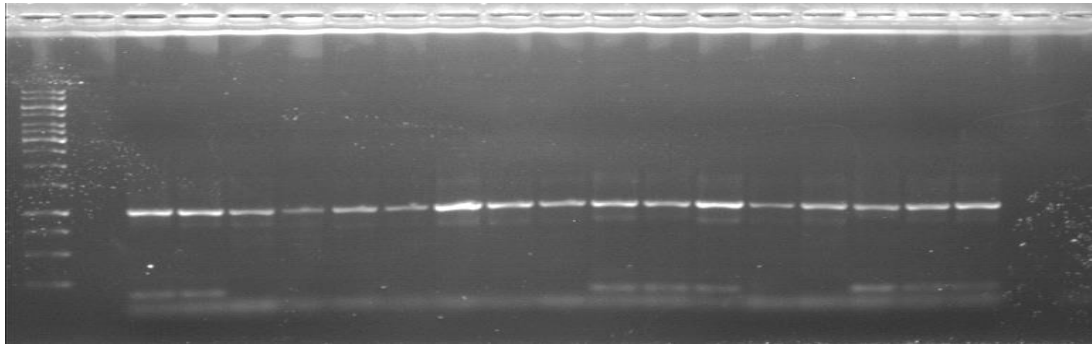


**ekil 4.5.** Çi sütlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan 16S-27F/16S-780R primerleri kullan,larak ço alt,lan 16S rDNA fragmentleri





**ekil 4.6.** Çi sütlerden izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan 529F/1491R primerleri kullan,larak ço alt,lan 16S rDNA fragmentleri



**ekil 4.7.** Peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakteri izolatlar,ndan 529F/1491R primerleri kullan,larak ço alt,lan 16S rDNA fragmentleri

**Çizelge 4.5.** Peynir ve çi sütlerden elde edilen laktik asit bakteri izolatlar,n rRNA gen dizi analizine göre tan,mlama sonuçlar,\*

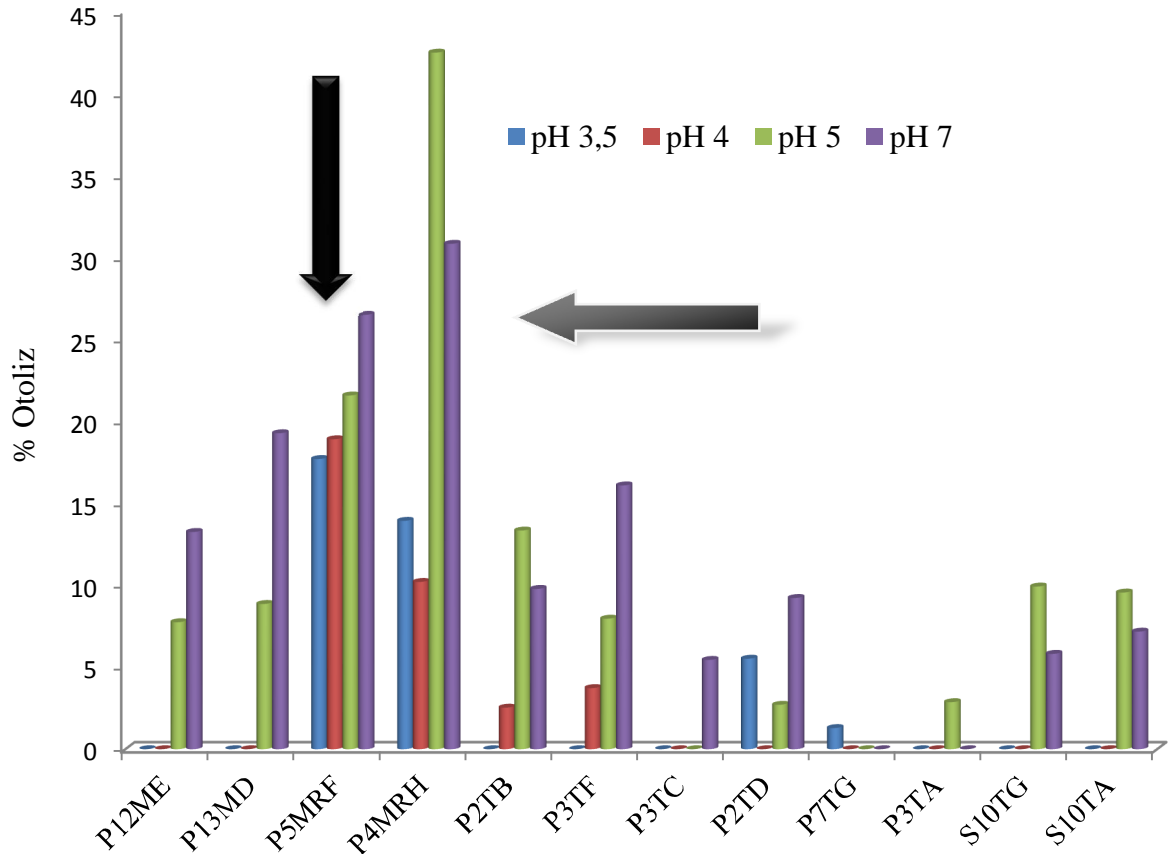
izolat Kodu	Tan,mlama	% Tan,mlama	Otoliz (%)
P1230M17E	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	28,8
P1330M17D	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	30,1
P530MRSF	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	35,7
P430MRSH	<i>Lb. plantarum</i>	99	25,0
P243M17B	<i>Enterococcus faecalis</i>	98	31,9
S1043M17G	<i>E. faecalis</i>	98	30,0
S1043M17A	<i>E. faecalis</i>	99	29,5
P243M17D	<i>E. faecalis</i>	97	28,1
P343M17F	<i>Enterococcus faecium</i>	98	43,6
P743M17G	<i>E. faecium</i>	99	31,0
P343M17C	<i>E. faecium</i>	98	29,9
P343M17A	<i>E. faecium</i>	98	28,4

\*Çizelgede verilen izolatlarda peynir izolatlar, P, çi süt izolatlar, S harfi ile kodlanm, t,r.

### 4.3. Otolitik Aktiviteye Çevresel Koşulların Etkisi

Çalışmada tanımlanan 12 laktik asit bakterisinin otolitik aktivitesi üzerine farklı pH (3,5, 4, 5 ve 7), inkübasyon sıcaklıkları (10, 20, 30 ve 40°C) ve tuz konsantrasyonları (%0,5, 1, 3, 5, 7, 10) etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla ekil 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

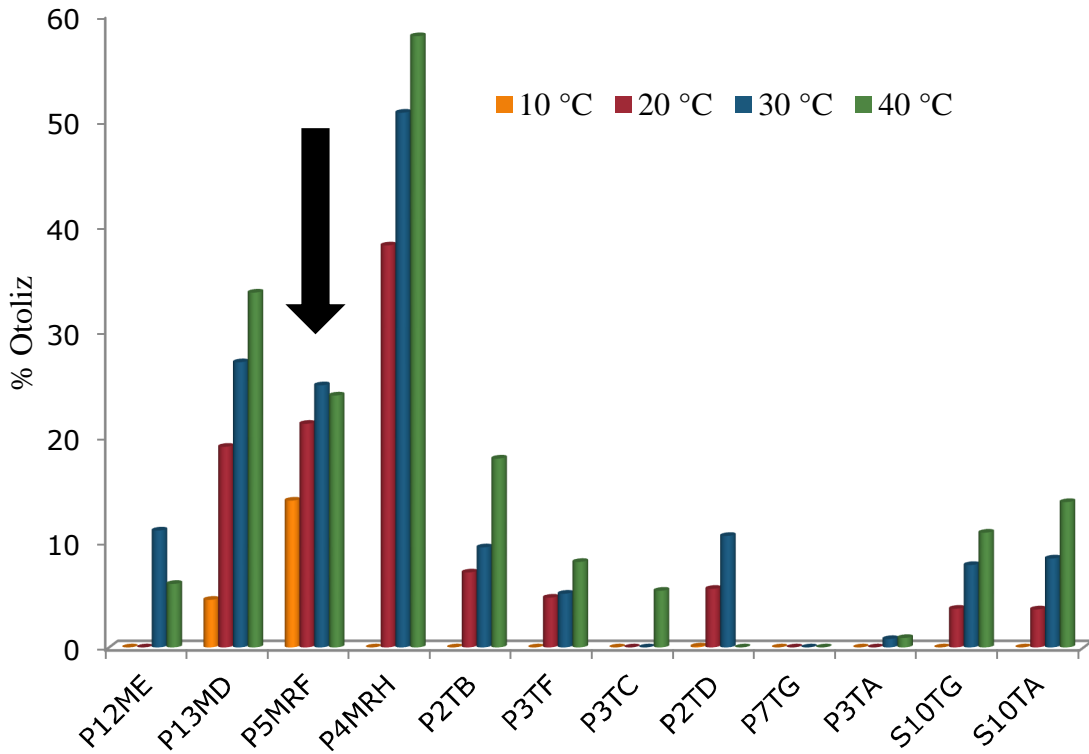
*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* düşük pH'da daha fazla bir ifade ile yüksek asidik ortamda otolitik aktivite göstermemiştir. pH 5 ve 7 değerlerinde pH arttıkça, buna bağlı olarak artan otolitik davranış sergilemiştir. *Lactobacillus plantarum* suşlarının otolitik aktiviteleri de genel olarak pH'daki artışa bağlı olarak artmıştır. Özellikle P5MRF suşunda bu durumun oldukça belirgin olduğu görülmektedir. Bazı istisnalar dışında *Enterococcus* türleri için de benzer durum görülmüştür.



**ekil 4.8.** Tanımlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz değerleri üzerine farklı pH'nın etkisi (P12ME-P13MD=*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, P5MRF-P4MRH=*Lactobacillus plantarum*, P2TB-P2TD-S10TG-S10TA=*Enterococcus faecalis* ve P3TF-P3TC-P7TG-P3TA=*Enterococcus faecium*)

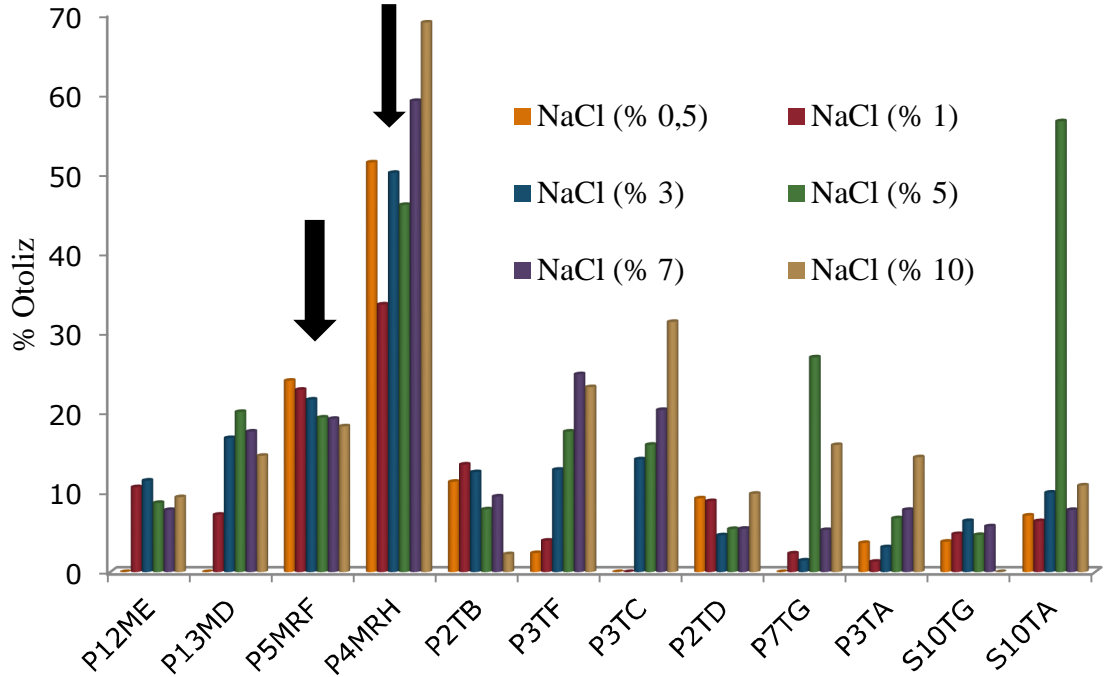
Laktik asit bakterilerinde ortam pH'sindeki azalma ile birlikte otoliz oranları, düşük pH, peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin çalışması için gerekli optimum pH ile ilişkilendirilebilir (Hazar-Dalca, 2015). Çalışmalarımızla benzer bulgular Østlie vd. (1995) ve Kozakova vd. (2010) tarafından yapılan çalışmalarda da belirlenmiştir. Çalışmalarımızda zayıf olarak Ramirez-Nunez vd. (2010) tarafından pH'daki düşük pH ile birlikte otoliz değerlerinin yükseldiği ifade edilmiştir. İlgili durum Huard vd. (2004) tarafından söz konusu bakterilerdeki peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin izoelektrik pH'da, nötr değerlere yakın olması ile açıklanmıştır.

Tanımlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz değerleri üzerine farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi incelendiğinde, pH'nın etkisine benzer şekilde genel olarak inkübasyon sıcaklığı arttıkça otoliz oranları arttı, görülmektedir (ekil 4.9). Ancak her bir su için sıcaklık arttıkça ulaşılan maksimum % otoliz değerleri birbirinden farklılık göstermektedir.



**ekil 4.9.** Tanımlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz değerleri üzerine farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi (P12ME-P13MD=*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, P5MRF-P4MRH=*Lactobacillus plantarum*, P2TB-P2TD-S10TG-S10TA=*Enterococcus faecalis* ve P3TF-P3TC-P7TG-P3TA=*Enterococcus faecium*)

Farklı tuz konsantrasyonları, tanımlanan laktik asit bakterilerinin otolitik aktivitelerine olan etkisi bakteri tür ve suuna bağlı olarak değerlendirilmektedir. Bazı bakterilerde (P4MRH *Lactobacillus plantarum* ve P3TF *Enterococcus faecium*) tuz konsantrasyonundaki artış, otolizite vadederken bazıları,nda (P5MRF *Lactobacillus plantarum*) ise otoliz oranı, düşürmü tür.



**ekil 4.10.** Tanımlanan laktik asit bakterilerinin % otoliz değerleri üzerine farklı tuz konsantrasyonları, etkisi (P12ME-P13MD=*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, P5MRF-P4MRH=*Lactobacillus plantarum*, P2TB-P2TD-S10TG-S10TA=*Enterococcus faecalis* ve P3TF-P3TC-P7TG-P3TA=*Enterococcus faecium*)

Ramirez-Nunez vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada 10 farklı *Lactococcus lactis* suyunun iki farklı pH'da (5,4 ve 7,0) farklı konsantrasyonlarda NaCl (10 ve 30 g/L) içeren tampon ortamındaki otoliz davranışları, çalışılmıştır. Çalışmada 7 bakteri suyunun asidik pH'da (pH=5.4) tuz konsantrasyonu arttıkça suyunun % otoliz oranları, azaldı, 2 su ta otoliz oranı arttı, ve 1 su ta ise de i med i belirlenmi tir. Nötr pH'da yapılan çalışmada ise tuz konsantrasyonu arttıkça 5 suyun otoliz oranı, arttı, 5 suyun ise azaldı, görülmü tür. Ara tırma sonucunda otolitik davranış, n çalışmamızda oldu u gibi

su a ba l, oldu u de erlendirilmi tir. Farkl, evre ko ullar,nda otolitik davran, n bakteri tür ve su una ba l, oldu u ile ilgili benzer bulgular ba ka al, malarda da gösterilmi tir (Kozakova vd. 2010; Haz,r-Dalca, 2015).

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışında Burdur, Antalya, Isparta ve Afyon illerinden toplanan 16 çıi süt ve 16 farklı peynir örneğindeki laktik asit bakterileri izole edilmiş ve izole edilen laktik asit bakterilerinin otolitik özellikleri incelenmiştir. İzole edilen toplam 878 izolattan genel olarak yüksek otolitik aktiviteye sahip 29 izolat tanımlanmıştır. Söz konusu 29 izolattan 12 adedinin laktik asit bakterisi olduğu belirlenmiş ve yüksek otolitik aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin farklı çevre koşullarında (pH, inkübasyon sıcaklığı, ve tuz konsantrasyonu) otolitik davranışları araştırılmıştır.

Genel olarak bakterilerin otoliz oranları artan pH ve sıcaklıkla artmış, belirlenirken, farklı tuz konsantrasyonlarında bakterilerin otolitik davranışları su başlıca değişimleri gösterdiği görülmüştür. Çalışımızda çevresel faktörlerin etkisi birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Ancak peynir matriksinde pH, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığı parametreleri kombine olarak mikrobiyal faaliyetleri etkileyeceğinden bu çalışımızda tanımlanan izolatların otolitik davranışları üzerine çevre faktörlerinin kombinasyonlarının etkileri de çalışılmaktadır.

Çalışımızdaki bulgular, genel olarak değerlendirildiğinde %35.70 otoliz oranına sahip *Lactobacillus plantarum* P530MRSF (P5MRF) izolatının peynir üretiminde hızlı lezzet gelişiminin sağlanmasında destek kültür olarak kullanılması için önemli bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Söz konusu bakterinin pilot ve/veya endüstriyel koşullarda destek kültür olarak peynir üretiminde kullanılması ile ilgili çalışmaların yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2015. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6), 8 Ekim 2015 Tarih ve 29261 Sayılı, Resmi Gazete, Ankara.
- Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Second Edition, Salminen, S., von Wright, A. (Editors), Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 1-72.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Boutrou, R., Sepulchre, A., Gripon, J.C., Monnet, V., 1998. Simple tests for predicting the lytic behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 2321-2328.
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C., Gaiani, C., 2014. Lactic acid bacteria in dairy foods: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213, 21-35.
- Cibik, R., Chapot-Charter, M.-P., 2000. Autolysis of dairy leuconostoc and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 862-869.
- Cibik, R., Chapot-Charter, M.-P., 2004. Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 459-463.
- Cibik, R., Cetinkaya, F., Gunes, N., Ozakin, C., Soyutemiz, G.E., 2006. Autolysis of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and clinical specimens. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(11), 1242-1244.
- Çökmü , C., 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çev. Ed: Prof. Dr. Cumhur Çökmü , Onbirinci Baskıdan Çeviri, 2010 (Brock Biology of Microorganisms, M.T. Madigan, J. M. Martinko, 11th Ed., 2006).
- De Vuyst, L.D., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Messens, W., 2002. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6059-6069.
- Deutsch, S.M., Neveu, A., Guezenc, S., Ritzenthaler, P., Lortal, S., 2003. Early lysis of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303 in Swiss Cheese is not prophage-related. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 147-157.
- El-Kholy, W., El-Soda, M., Ezzat, N., El Shafei, H., 1998. Autolysis and intracellular enzyme release from cheese related dairy lactobacilli. *Lait*, 78, 439-452.

- El Soda, M., Awad, A., 2011. Accelerated cheese ripening. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, Fuguay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Editors), Elsevier Ltd., UK, pp.795-798.
- El Soda, M., Ahmed, N., Omran, N., Osman, G., Morsi, A., 2003. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emirates Journal of Agricultural Sciences*, 15(2), 51-71.
- Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P. (2007). Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 17, 316-327.
- Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A., Beresford, T.P., 2003. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 13, 313-323.
- Hazır Dalca, S., 2015. Denizli linden Toplanan Çi Süt ve Peynirlerden Otolitik Laktik Asit Bakterilerinin zolasyonu, Tanımlanması, ve Otolitik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli.
- Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., Wessner, F., Foster, S.J., Chapot-Chartier, M.P., 2004. Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: identification of a third N-acetylglucosaminidase, AcmC. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3493-3499.
- Humann, J., Lenz, L.L., 2008. Bacterial peptidoglycan-degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *Journal of Innate Immunity*, 1, 88-97.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Gripon, J.C., Benbadis, L., Chapot-Chartier, M.P., 2000. Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 209-213.
- Kawabata, S., Vassal, L., Le Bars, D., Cesselin, B., Nardi, M., Gripon, J.C., Chapot-Chartier, M.P., 1997. Phage-induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Lait*, 77, 229-239.
- Kenny, O., FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K., 2006. Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16, 797-804.
- Kılıç, S., 2010. *Süt Mikrobiyolojisi*. Sidas Medya Ltd. ti., zmir, 643s.
- Kozakova, D., Solichova, K., Ondrackova, I., Svirakova, E., Plockova, M., 2010. Effect of some environmental factors on autolysis of lactococci used for cheese production. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49(1), 1-9.



- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.
- Lemee, R., Lortal, S., Cesselin, B., van Heijenoort, J., 1994. Involvement of an N-acetylglucosaminidase in autolysis of *Propionibacterium freudenreichii* CNRZ 725. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4351-4358.
- Lemée, R., Lortal, S., van Heijenoort, J., 1995. Autolysis of dairy propionibacteria: isolation and renaturing gel electrophoresis of the autolysins of *Propionibacterium freudenreichii* CNRZ 725. *Lait*, 75, 345-365.
- Lortal, S., Lemée, R., Valence, F., 1997. Autolysis of thermophilic lactobacilli and dairy propionibacteria: a review. *Lait*, 77, 133-150.
- Lortal, S., Chapot-Chartier, M.-P., 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 857-871.
- Masuda, T., Hidaka, A., Kondo, N., Ura, T., Itoh, T., 2005. Intracellular enzyme activities and autolytic properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *Food Science and Technology Research*, 11, 328-331.
- Mäyrä-Mäkinen, A., Bigret, M., 1998. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Second Edition, Salminen S, von Wright A. (Editors), Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 73-102.
- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- McSweeney, P.L.H., 2011. Biochemistry of cheese ripening. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, Fuguay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Editors), Elsevier Ltd., UK, pp.667-674.
- Nájera-Domínguez, C., Gutiérrez-Méndez, N., 2013. Autolytic and proteolytic properties of strains of *Lactococcus lactis* isolated from different vegetables, raw-milk cheeses and commercial starter cultures. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 21-26.
- Østlie, H.M., Vegarud, G., Langsrud, T., 1995. Autolysis of Lactococci: detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3598-3603.
- Oumer, A., Gaya, P., Fernandez-Garsia, E., Mariaca, R., Gadre, S., Medina, M., Nunez, M., 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *Journal of Dairy Research*, 68, 117-1219.
- Ouzari, H., Cherif, A., Mora, D., 2002. Autolytic phenotype of *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional Tunisian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 812-820.

- Ramirez-Nunez, J., Romero-Medrano, R., Nevarez-Moorillion, G.V., Gutierrez-Mendez, N., 2011. Effect of pH and salt gradient on the autolysis of *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1495-1499.
- im ek, Ö., Gürsoy, O., Hazır Dalca, S., Yılmaz, Y., 2016. Laktik asit bakterilerinde otoliz ve peynir teknolojisindeki önemi. *Akademik Gıda*, 14(3), 293-301.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2016. *Microbiology: An Introduction*, 12th Edition, Pearson Ltd., USA.
- Valence, F., Deutsch, S-M., Richoux, R., Gagnaire, V., Lortal, S. 2000. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Research*, 67, 261-271.
- Weinrichter, B., Luginbühl, W., Rohm, H., Jimeno, J., 2001. Differentiation of facultatively heterofermentative Lactobacilli from plants, milk and hard type cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, energy source utilization and autolysis type. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 34, 556-566.
- Yvon, M., Rijnen, L., 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.
- Zambonelli, C., Chiavari, C., Benevelli, M., Coloretto, F., 2002. Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, 40(4): 347-351.



## ÖZGEÇM

Ad, Soyad, : Gözde GÜL DEN Z

Do um Yeri : Salihli

Do um Tarihi : 23.10.1989

Yabancı, Dili : İngilizce

### E itim Durumu

Lise : Menemen Lisesi, İzmir / 2007

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta / 2013

Yüksek : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda

Lisans Mühendisliği Anabilim Dalı, Burdur / 2017