

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YEREL PEYNİRLERİMİZDEN İZOLE EDİLEN LAKTOKOKKUS SUŞLARININ
BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa ERSOY

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2009



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YEREL PEYNİRLERİMİZDEN İZOLE EDİLEN LAKTOKOKKUS SUŞLARININ
BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa ERSOY

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Doç. Dr. Recep ÇIBİK

Bursa-2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	5
Laktik asit bakterileri	5
Laktokok cinsi ve bu cinse ait türlerin özellikleri	14
Süt ürünleri üretiminde starter kültürler	21
Laktokokların peynir olgunlaşmasındaki rolü	23
Laktoz fermentasyonu	28
Proteolitik aktivite ve proteoliz	31
Lipolitik etki	35
Sitratın parçalanması ve oluşan metabolitler	35
Bakteriyoliz ve peynir olgunlaşmasındaki önemi	37
Laktokokların diğer önemli özellikleri	42
Bakteriyosin üretimi	42
Bakteriyosinlerin sınıflandırılması ve laktokoklarca üretilen bakteriyosinler	43
Nisin	44
Kimyasal yapısı	44
Etki mekanizması	45
Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanımı	47
Laktokoklar ve probiyotik özellikleri	50
Laktokokların fajları ve direnç sistemleri	53
GEREÇ VE YÖNTEM	60
Çalışmada kullanılan izolatlar	60
Kullanılan alet ve ekipmanlar	62
İzolatların canlandırılması	62
Glikolizisin belirlenmesi	62
M17 laktoz ortamında glikolizisin belirlenmesi	62

Yağsız süt tozundan hazırlanan sütte glikolizisin belirlenmesi	63
Sütte üreyen laktokokların sayısal değerlendirilmesi	63
Fast-Slow Differentiation Agar'da (FSDA) izolatların proteolizlerinin ve laktoz kullanımlarının değerlendirilmesi	63
FSDA'nın hazırlanması	64
İzolatların bakteriyolizlerinin belirlenmesi	64
Bakteriyofajların belirlenmesi	65
İstatistiki Analizler	65
BULGULAR	66
Glikolizin belirlenmesi	66
M17-laktoz sıvı besiyerinde pH değişiminin belirlenmesi	66
Yağsız süt tozundan hazırlanan sütte pH değişiminin belirlenmesi	68
İzolatların proteolitik aktivitelerinin FSDA besiyerinde değerlendirilmesi	73
Bakteriyolitik aktivitelerinin değerlendirilmesi	75
Bakteriyofaj aranması	78
TARTIŞMA VE SONUÇ	79
KAYNAKLAR	84
TEŞEKKÜR	102
ÖZGEÇMİŞ	103

ÖZET

Geleneksel tekniklerle üretilen Beyaz peynir (23 suş) ve Kaşar peynirlerinden (19 suş) izole edilmiş olan 37 adet *Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve 5 adet *L. lactis* ssp. *cremoris* suşu glikolitik, proteolitik ve bakteriyolitik özellikleri ile bakteriyofaj bulundurup bulundurmadıkları açısından test edildi.

Glikolizis, laktoz içeren M17 brotta ve yağsız süt tozundan hazırlanmış sütte 24 saatlik zaman biriminde pH'daki azalma olarak belirlendi. M17 brotun tampon etkisine bağlı olarak pH düşmesi belirli bir seviyede sınırlanırken sütte düşüş çok daha belirgin şekillendi ve suşlar yüksek, orta ve düşük asidifikasyon grupları olarak üçe gruba ayrıldı. Gruplar arasında istatistiki açıdan fark önemli bulundu ($p<0.05$). Glikoliz açısından Beyaz peynir izolatlarının Kaşar peynirlerinden elde edilenlere nazaran pH düşüşünde daha etkin olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

FSDA'da (Fast-Slow Differentiation Agar) suşların çoğu proteaz (+) özellik gösterdi. Bakteriyoliz 100 mM potasyum fosfat ortamında (pH 7), 30°C'de 24 saat boyunca turbidimetrik azalma olarak test edildi. Süre sonunda suşların %37-70 arasında değişen oranlarda bakteriyoliz gösterdikleri saptandı. Bakteriyofaj varlığı sadece 10 adet suş üzerinde yapıldı ve test edilen suşlardan bir tanesinin faj içerdiği belirlendi.

Bu tez çalışması ile *Lactococcus lactis* suşlarının bazı teknolojik özelliklerini inceledik. Bu özelliklere göre seçilen suşların endüstride kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için peynir yapım çalışmalarının da ilave olarak yapılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: Peynir, laktokok, glikoliz, proteoliz, bakteriyoliz

SUMMARY

Characterization of some technological properties of lactococcus strains isolated from traditionally made cheeses.

Thirty seven *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and five *L. lactis* ssp. *cremoris* strains isolated previously from White Picled Cheeses (23 strains) and Kasar Cheeses (19 strains) that were produced according to traditional techniques were analyzed for their glycolytic, proteolytic and bacteriolytic properties. Some of the strains were also tested for the presence of bacteriophages.

Glycolysis of strains was assessed by measuring the decrease in pH over 24 h incubation of bacteria in lactose containing M17 broth and reconstituted skim milk. The decrease in pH was limited to certain extent in M17 broth because of the tampon effect of the media whereas the decrease was much more important in reconstituted skim milk in which the isolates were divided into high, media and low acidifying groups according to acidification rates. Statistical importance was noted among the groups ($p < 0.05$). Comparison of isolates from White Picled and Kasar Cheeses provided evidence on the fact that the isolates obtained from White Pickled Cheese were more glycolytic than the others ($p < 0.05$).

On FSDA (Fast-Slow Differentiation Agar) majority of the strains exhibited protease (+) phenotype. Bacteriolysis was tested in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7) at 30°C for 24 h. Bacteriolytic variability among the strains was between 37-70% at the end of the incubation period as determined by the percentage of turbidimetric decrease. Only one isolate among the tested 10 isolates gave positive result for the presence of bacteriophages.

In this thesis we studied some technological characters of *Lactococcus lactis* strains. Cheese making experiments are necessary to better understand the effects of the selected strains.

Key Words: Cheese, Lactococcus, glycolysis, proteolysis, bacteriolysis

GİRİŞ

Dünyada en fazla çeşidi olan besin peynirdir. Peynirin ilk yapıldığı tarih ve yöre kesin olarak bilinmemektedir. Bununla beraber peynirin bazı hayvanların evcilleştirilmesinden sonra, günümüzden yaklaşık 6000-7000 yıl önce orta veya güney-batı Asya'da, sütün hayvan (muhtemelen keçi) mide veya derilerinde taşınması sırasında tesadüfen oluşan ekşi süttten yapıldığı tahmin edilmektedir. Peynir ancak, 18. yüzyıl sonlarına doğru elde edilen araştırma sonuçlarının uygulamaya konulmasıyla endüstriyel düzeyde üretilmeye başlanmıştır. Üretimde 1930'lü yıllarda kısmen mekanizasyona geçilmesi ve mikroorganizmaların rolünün anlaşılmasıyla üretim teknolojisinde önemli gelişmeler olmuştur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından peynir, "süt, krema, yağsız veya kısmen yağı alınmış süt, yayık altı ayranı veya bu ürünlerin karışımının pıhtılaştırılmasından sonra süzülmesiyle elde edilen taze veya olgunlaştırılmış ürün" olarak tanımlanır. Ancak bu tanım, peynir altı suyundan ve yeni tekniklerle (ters ozmoz) yapılanları kapsamamaktadır (1).

Kullanılan süt türünden ve üretim metodlarındaki farklılıklardan dolayı günümüzde dünyada 2000'den fazla değişik isimle bilinen 400 peynir çeşidinin üretildiği bildirilmektedir (2). Ülkemizde ise bu sayının 250'ye yakın olduğu bilinmektedir. Ancak sadece özde farklı 12 peynir çeşidinin olduğu kabul edilmektedir. Bunlar arasında başlıca salamura Beyaz peynir, Kaşar peyniri, Tulum peyniri ve Mihaliç peyniri üretilmektedir (1, 3, 4, 5).

Peynir, sütün peynir mayası veya zararsız organik asitlerin etkisiyle pıhtılaştırılması, değişik şekillerde işlenmesi, süzülmesi, şekillendirilmesi, tuzlanması, bazen tat ve koku verici zararsız madde katılması ve çeşitli süre ve derecelerde olgunlaştırılması sonucunda elde edilen besin değeri yüksek bir süt ürünüdür (6).

Peynirin gruplandırılıp sınıflandırılmasında çoğunlukla; kuru madde, olgunlaşma durumu, kuru maddede yağ, yağsız peynir kitlesindeki su oranı esas alınmakta ayrıca, sınıflandırmada hammadde çeşidi, tuzlama şekli ve yapıldığı ülke yani orijini göz önünde bulundurulmaktadır. Son yıllarda peynirlerin sınıflandırılmasında geçerli en yaygın yöntem, yağsız peynir kitlesindeki su oranının belirlenmesidir (7).

Tablo 1: Türkiye’de çeşitli peynir türlerinin tüketimdeki payları (1).

Peynir Çeşidi	Tüketimdeki Payı (%)
Beyaz peynir	60
Kaşar peyniri	17
Tulum ve Mihaliç peyniri	12
Diğer peynirler	11

Beyaz salamura peynir, ülkemizde en fazla üretilen çeşittir. Yurdumuzda sütün yaklaşık 6:10’u bu peynire işlenmektedir. İyi kaliteli olanları tam yağlı koyun sütünden yapılabilmektedir, ancak son yıllarda bu peynirin yapımında inek sütü kullanımı hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu peynir çeşidi Balkan ve Orta Doğu ülkeleri ile Ukrayna’da da üretilmektedir. İyi kaliteli Beyaz Salamura peynirin başlıca nitelikleri; lezzeti kendine özgü, tekstürü orta sertlikte, homojen, lekesiz ve deliksiz, rengi parlak beyaz ve homojendir. Türk tipi Beyaz Salamura peynir; çiğ süt temini, rennetin katılması, pıhtının toplanması ve baskıya alınması, telemenin kesilmesi, kalıpların tuzlanması, kalıpların ambalajlanması aşamaları izlenerek üretilir.

Kaşar peyniri; haşlanarak ve yoğrularak yapılan, deliksiz ve bakterilerle olgunlaştırılan peynirlerin tipik bir örneğidir. Yapım ve kimyasal bileşimleri yönünden bazı italyan (Caciocavallo, Provolone, Mozzarella) ve Balkan ülkeleri (Kashkaval, Kaskaval, Kasseri) peynirlerine benzer. Kaşar peyniri, yapımındaki belli başlı özellikleri (rennet ile koagüle edilmesi, telemenin pişirilmesi, elle şekillendirilmesi ve baskıya alınması) göz önüne alınarak yapılan sınıflandırmada "Pasta Filata" (plastik teleme), rutubet miktarına göre de yarı sert peynirler grubuna girer. İyi kalitede Kaşar peynirinin duyu nitelikleri; lezzeti kendine özgü (keskin, hafif yakıcı, aromatik), tekstürü homojen, düz, pürüzsüz, sıkı, görünümü temiz, iyi şekillenmiş ve homojen, kabuğu sert, ince, kirli saman sarısından koyu saman sarısına kadar parlak bir renktedir.

Türk tipi Kaşar Peyniri; çiğ sütün temini, rennetin katılması, pıhtının oluşumu, toplanması ve baskıya alınması, telemenin kesilmesi, telemenin fermentasyonu, telemenin doğranması, telemenin haşlanması, telemenin şekillendirilmesi ve kalıplanması, kalıpların çevrilmesi, tuzlanması ve olgunlaştırılması, ön olgunlaştırma, kabuk bağlama, peynirin muhafazası aşamaları izlenerek üretilir.

Gelişmiş ülkelerde peynir üreticileri 20. yüzyılın başlarına kadar mikroorganizmaların önemini bilmeden sütte doğal kontaminasyon sonucu her zaman mevcut mikroorganizmaların aktivitelerine dayanarak peynir yapmışlardır. Peynir yapımında mikroorganizmaların önemine ilk defa Avrupa’da 1890’da Danimarkalı Storch, ABD’de ise 1895’de Conn tarafından değinilmiştir (1).

Pastörizasyonla öldürülmeyen ısıya dayanıklı bakteriler ya da üretim aşamalarında yeniden bulaşabilen çeşitli mikroorganizmalar, kolaylıkla gelişerek ortama egemen olmakta ve peynirde çeşitli kusurlara yol açmaktadırlar. Bu nedenle alışlagelen tat ve aromada, standart ve istenilen kalitede ürün elde edebilmek için süte pastörizasyon ile yitirilen laktik asit bakterilerinin (LAB) koagulum parçacıklarını içermeyen saf ve karışık kültürlerinin katılması teknolojik bir zorunluluk arz etmektedir. Pıhtısı 40°C ve altında pişirilen peynir çeşitleri için mezofilik, telemesi yüksek ısıda pişirilen peynirler için de termofilik LAB kullanılır. Genel olarak sert ve yarı sert peynirler için yavaş asitlendiren, buna karşın yumuşak tip peynirlerde hızlı asit geliştiren LAB kullanılmaktadır (7,1).

Peynir kalitesini ilgilendiren kıvam ve lezzetin olabildiğince düzeltilmesi, geliştirilmesi ve halk sağlığının dikkate alınması doğrultusunda, peynir yapımında pastörize süt kullanımı teşvik edilmektedir. Diğer taraftan yaygın ve kabul edilen düşünceye göre çiğ süttten üretilen peynirlerde, olgunlaşma aşaması daha çabuk şekillenir, tat ve lezzet ise pastörize süttten imal edilen peynirlere göre çok daha güçlü bir şekilde gelişir. Her ne kadar pastörizasyon işlemi süttün doğal mikroflorasını değıştirirse de çiğ ve pastörize süttten imal edilen peynirlerde tat ve lezzet oluşumunda şekillenen biyokimyasal olaylar benzerdir. Farklı çalışmalar göstermiştir ki çiğ süttün doğal mikroflorasındaki enzimatik sistem, starter kültür ilavesiyle üretilen peynirlere göre daha komplekstir. Bu yüzden doğal mikroflora, peynir proteolizinde çok güçlü etkiye sahiptir (8).

Fermente süt ürünleri birçok ülkede tüketicilerin günlük diyetlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Söz konusu ürünler, ilk olarak süttün uzun süre muhafaza edilmesi ve istenilen duyuşsal özelliklerin kazandırılması amacıyla ortaya çıkmıştır. Süttün mikrobiyal starter kültürler tarafından fermente edilmesi ile ürünün raf ömrünü arttıran laktik asit oluşmakta ve ürüne istenilen duyuşsal özellikler ve yapı kazandırılmaktadır (9).

Laktokoklar (*Lactococcus (L.) lactis* alttür *lactis*, *L. lactis* alttür *cremoris* ve *L. lactis* alttür *lactis biovar. diacetylactis*); laktozu fermente ederek laktik asit oluşturma, kazein hidrolizi (proteolitik aktivite) ve bakteriyosin üretimi başta olmak üzere, üretim teknolojisi ve üretim tipine bağılı diğer biyokimyasal özellikleri de saptanmak suretiyle,

starter kültür suşları olarak tanımlanmakta ve fermente süt endüstrisinde kullanılmaktadır (10, 11, 12, 13).

Peynir aroması tek başlarına peynir lezzetini etkilemeyen yüzlerce uçucu bileşiğin meydana getirdiği kompleks bir karışımdır (14). Söz konusu bileşikler özellikle mikrobiyal enzimlerin etkisiyle peynirdeki protein, yağ, laktoz, laktat ve sitratın farklı ve karmaşık biyokimyasal yollar ile parçalanmaları sonucu oluşan uçucu metabolitlerdir. Dolayısıyla peynir mikroflorası, üretilen peynirlerin aroma ve lezzetini etkileyen çok sayıda uçucu bileşiğin oluşumunda önemli bir yere sahiptir (15).

Bu çalışma ile geleneksel tekniklere göre üretilen Beyaz peynir ve Kaşar peynirinden izole edilen laktokok izolatlarının bazı teknolojik niteliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda izolatların hem besi yerinde hem de rekonstitüe sütte asidifikasyon nitelikleri, Fast-Slow Differentiating Agar'da proteolitik nitelikleri, tamponlanmış ortamda bakteriyolizis oranları ayrıca bakteriyofaj bulundurup bulundurmadıkları test edilmiştir.

GENEL BİLGİLER

Laktik Asit Bakterileri (LAB)

LAB; gram pozitif, spor oluşturmeyen, düşük guanin (G) ve sitozin (C) bazlarına sahip, katalaz ve oksidaz negatif, aerotolerant (mikroaerofilik koşullardan anaerobik koşullara kadar değişen geniş bir spektrumda gelişebilen), aside dayanıklı, fermentatif, şeker fermentasyonu sonucunda başlıca laktik asit üreten, nitratı nitrite indirgemeyen mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar gelişebilmek için aminoasitler ve B grubu vitaminler gibi besin öğeleri ile pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar ve çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları, 5°C'nin altında, termofilik türler ise optimum 45° C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilirler. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum pH 4,0-4,5'da gelişebilmelerine rağmen bazıları 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'larda da gelişebilirler. Bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptir (16,17,18).

LAB'nin taksonomisi uzun yıllardan beri bakterilerin fenotipik özelliklerini baz almaktadır. Bu tip bir değerlendirmeye göre LAB; "*Thermobacterium*", "*Streptobacterium*" ve "*Betabacterium*" olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir (19). Gelişmiş moleküler tiplendirme teknikleri LAB'nin fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan bu alt gruplandırmanın uygun olmadığını göstermiştir. Örneğin; Hammes ve Vogel (20), laktobasilleri hücre duvarı peptidoglikan tipi ile pentoz ve hekzozları fermentasyon şekillerine göre gruplandırmıştır.

Günümüzde laktobasillerin 60'ın üzerinde türü bilinmektedir (20,21). Genel olarak laktobasillerin proteolitik aktiviteleri ile asitleştirme yetenekleri arasında net bir ilişki yoktur (22).

Morfolojik ve fizyolojik özellikler, bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterlerdir. LAB'nin genus ve türlere göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere üç farklı morfolojik görünümleri vardır. LAB'ni tanımlamada ilk olarak kullanılan karakterler; sütte ve diğer besi ortamlarına alındıklarında oluşturdukları laktik asit miktarı, karbonhidratları fermentasyon biçimleri, minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklığı, oksijene tolerans, farklı NaCl konsantrasyonuna gösterdikleri tolerans, gaz ve uçucu aroma bileşikleri üretme yetenekleri ile pH'ya tolerans ve antibiyotiklere karşı dirençtir. Bununla birlikte şimdilik LAB'nin sütü asitleştirme yeteneği artık ayırıcı bir kriter olarak dikkate alınmaktadır. Çünkü laktik asit oluşturma yeteneği potansiyel olarak stabil olmayan ekstra kromozomal elementlerden

olan plazmidlere kodlanabilir. Bakterilerin ayırımında önemli bir ipucu da gelişme sıcaklıklarıdır. Sıvı besi yerinde 50°C’de gelişme, *Enterococcus (Ent.) faecium*’u diğer enterokoklardan ayırmaya yarar. *L. lactis* alttür *cremoris* de diğer laktokoklardan 40°C’de gelişmeme özelliğiyle ayrılır. 1873 yılında Fischer ilk bakteri kültürünü izole etmiş, bu çalışmalardan sonra saf LAB kültürü Joseph Lister tarafından, *Bacterium lactis* olarak izole edilmiştir. LAB’nin sınıflaması son 10-20 yıl içerisinde değişim göstermektedir. Çünkü bu süreç öncesinde, orijinal bakteri sınıflaması bakterilerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre yapılmaktaydı. Bunlara ilaveten hücre duvarı kompozisyonu, hücre yağ oranı ve hücrenin diğer özellikleri sınıflamada kullanılmıştır (23,19). Büyüme kondüsyonu hücre morfolojisini önemli derecede etkilemektedir. pH 4.5 laktobasiller ve pediokoklar ile leukonostoklar’ın ayırıcı tanısında kriter olarak kullanılabilir. Belirtilen pH’nın altında laktobasiller ve pediokoklar üreyebilirken leukonostoklar üreyemez (18).

LAB, karbonhidrat fermentasyonu sonucu laktik asit oluşturan bakterilerdir. Farklı optimum büyüme sıcaklıklarına ihtiyaç duymakta olan LAB’nin uygun büyüme için kompleks bir besi yerine ihtiyacı vardır. Bu yüzden LAB’nin besin maddesine zengin besi ortamlarında kültüre alınmaları zorunluluk arz etmektedir. LAB, genellikle fermente gıda üretiminde kullanılmaktadır. Örneğin, yoğurt yapımında *Streptococcus (Str.)* ve *Lactobacillus (Lb.)* türleri, peynir yapımında Laktokoklar, sucuk yapımında pediokoklar gibi farklı LAB yaygın olarak kullanılmaktadır.

LAB’nin pek çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlarda bulunurlar. Belirli bir çevreye adapte olmuş gibidirler ve hemen hemen her doğal habitatta bulunurlar (örneğin süt, sıcakkanlıların bağırsak florası, dışkı, ağız, meyve ve sebzeler). Bu alandaki bilgiler eksik olmasına rağmen şöyle bir genelleştirmeye gidilebilir. *Streptococcus* cinsine ait türlere; insan, hayvan ve kuşlarda rastlanabilir. *Lactobacillus* cinsine ait türler ise daha çok insan, hayvan ve bitkilerle beraber bunların bulunduğu doğal ortamlarda bulunabilir. *Pediococcus (P.)* cinsine ait türler ancak bitkilerde bulunurlar. *Leuconostoc*’lar (*Leu.*) süt ürünlerinden ve sebzelerden izole edilebilir. Bazı LAB’nin alt türleri insan sindirim sisteminde ve fermente gıdalarda bulunur (19). Laktobasiller insan ya da hayvanların mukozal membranları (ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, bağırsak sistemi ve vajina), bitkiler ya da bitkisel materyallerin üzeri, gübreler, lağım pisliği, fermente olan ya da bozulan gıdalar gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler (20).

LAB, doğada ve çevremizde insan ve hayvan vücutlarında, fermente süt ürünleri yapımında (süt, et, balık vb), veya bitkiler (sebzeler, şarap, yağlar vb) gibi çok geniş bir alanda varlıklarını sürdürürler. Fermente ürünlerin organoleptik kalitelerinin

şekillenmesinde çok kritik rol oynarlar ve gıda transformasyon prosesinde düşük maliyetli ingredientler olarak tanınırlar (24).

Peynir, üzerinde en çok bilimsel çalışma yapılan süt ürünüdür. Uygun şartlarda üretilen ve depolanan bir çok süt ürünü, biyolojik ve kimyasal olarak oldukça stabil olduğu halde, peynir biyokimyasal açıdan dinamik bir üründür. Bu nedenle organik kimya, analitik kimya, biyokimya, mikrobiyoloji, reoloji, kolloid bilimi, moleküler biyoloji ve beslenme gibi çok farklı alanlarda çalışan araştırmacılar peynirde geniş çalışma alanları bulmuşlardır. Peynir dinamizm kazandıran ve birçok bilimsel disipline çalışma olanağı sağlayan unsurlardan biri peynir üretimi ve olgunlaşması sırasında son derece önemli rolleri olan LAB'dir (25, 26).

Çeşitli fermente süt ürünlerinin endüstriyel kullanımında önemli olan özellik LAB (starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri) tarafından asit üretimidir. Bazı fermente süt ürünlerinde pH değerinin 4.6 - 4.8 aralığına düşmesi önem arz ederken (kalsiyum tamamen kazein misellerine bağlanıp parakazeinlere dönüşür), bazı ürünlerde pH'nın 5.0 -5.2 aralığında olması son derece önemlidir. Bu şekilde üretilen süt ürünlerinde kalsiyumun bir kısmı kazein misellerine tutunmaktadır (27).

Tablo 2: LAB; işlevi ve kullanıldığı ürünler (28).

Bakteri türü	İşlevi	Kullanıldığı ürünler
<i>Lb. acidophilus</i>	Asidifikasyon	Fermente süt ürünleri
<i>Lb. delbrueckii</i> alttür <i>bulgaricus</i>	Asidifikasyon ve aroma	Yoğurt, kefir, kıyma, bazı peynirler
<i>Lb. delbrueckii</i> alttür <i>lactis</i>	Asidifikasyon ve aroma	Yoğurt, kefir, kıyma, bazı peynirler
<i>Lb. helveticus</i>	Asidifikasyon ve aroma	Yoğurt, kefir, kıyma, bazı peynirler
<i>Lb. helveticus</i> alttür <i>jugurti</i>	Asidifikasyon ve aroma	Yoğurt, kefir, kıyma, bazı peynirler
<i>Lb. kefir</i>	Asidifikasyon	Kefir
<i>Str. thermophilus</i>	Asidifikasyon, tekstür, aroma	Yoğurt, Cheddar, Mozzarella peynirleri
<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	Asidifikasyon	Peynir çeşitleri
<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Asidifikasyon	Peynir çeşitleri
<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i> (biovar <i>diacetylactis</i>)	Asidifikasyon ve aroma	Tereyağı ve peynir çeşitleri
<i>Leu. lactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> alttür <i>dextranicum</i> , <i>Leu. paramesenteroides</i>	Aroma	Tereyağı ve peynir çeşitleri
<i>Bifidobacterium (B.) bifidum</i> , <i>B. Breve</i> , <i>B. longum</i>	Asidifikasyon ve aroma	Bifido yoğurtlar, fermente sütler

Mikrobiyolojik anlamda fermentasyon; mikroorganizmalar tarafından bir seri oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile karbonhidratların yıkıma uğratılmasıdır. Bu anlamda fermentasyon " karbonhidratlar ve ilgili bileşiklerin herhangi bir dış elektron alıcısının bulunmadığı durumda enerji açığa çıkaran bir seri oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları zinciri" olarak da tanımlanabilir. Fermentasyon sonucu oluşan bileşikler substrata kıyasla daha düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyeline sahip oldukları için aradaki fark enerji olarak açığa çıkar. Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmalar, örneğin LAB elektron transport sistemine veya sitokromlara sahip olmadıkları için karbonhidratların oksidasyonu sırasında substrat düzeyinde fosforilasyonla enerji üretirler. Fonksiyonel bir kreps döngüsüne sahip değildirler. Sonuç olarak fermentasyonda meydana gelen ürünlerin bazıları diğerlerine kıyasla daha indirgenmiş formdadır ancak reaksiyonun tümü göz önüne alındığında net bir oksidasyon veya redüksiyon söz konusu değildir.

LAB, çeşitli fermente süt ürünleri (yoğurt, peynir vb.), fermente sebzeler (çeşitli turşular) ve fermente et ürünlerinin (sucuk) üretiminde yaygın olarak kullanılır. Laktik asit fermentasyonu yanında, alkol fermentasyonu, propionik asit fermentasyonu, çeşitli bakteri ve küfler tarafından gerçekleştirilen fermentasyonlar da yer almaktadır.

Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların aktiviteleri, mikrobiyal gelişmede etkili olan iç ve dış faktörlere bağlıdır. Örneğin, şeker oranı yüksek bitkisel kaynaklı bir gıdada asitliğin birçok bakterinin gelişmesini engelleyecek düzeyde olması durumunda bu ortamda LAB'nin gelişmesi söz konusu olabilir (29). Gıda maddelerinin fermentasyon işlemine tabi tutularak işlenmesi uzun yıllardır bilinen ve uygulanan bir tekniktir. Et, süt, bitkisel ürünler, balıklar, sebze ve unlu mamüllerin dayanımını, lezzetini ve besleyici değerini arttırmak amacıyla dünyanın her yerinde yaygın bir şekilde fermentasyonda rol oynayan bakterilerden yararlanılmaktadır (30).

Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan ya da birçok peynir çeşidinin starter olmayan mikroflorasında dominant mikroorganizmalar olarak bulunabilen homofermentatif ve heterofermentatif LAB, birçok peynir çeşidinin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (31, 32). Destek kültürler veya starter olmayan laktik asit bakterileri (NSLAB) çoğunlukla laktobasillerden oluşan, peynirde lezzet oluşumunu hızlandırmak ve peynir lezzetini arttırmak amacıyla standart mezofilik starterlere ilave olarak kullanılan ve genellikle ilgili peynirin starter olmayan mikroflorasında bulunabilen mikroorganizmalardır (33).

Birçok peynir çeşidinin mikroflorası bakteri, küf ve mayaları içeren çok sayıda mikroorganizmadan oluşan kompleks bir yapıdadır. Bu mikroflora peynir üretimi ve

olgunlaşması için gerekli esansiyel metabolitlerin üretiminde rol oynar. Peynirin yapısında bulunan starter LAB ve ikincil florayı oluşturan NSLAB'lar, peynirin olgunlaşması aşamasında bir seri kompleks biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda sütte tat, lezzet, ve tekstür gelişiminden sorumludur (34). Her iki grup ta temelde peynir olgunlaşma prosesi süresince aroma ve tekstür gelişimine katkıda bulunurken, laktik starterler peynir üretimi sırasında laktozu fermente ederek laktik asit başta olmak üzere organik asitleri üretirler ve bu sayede peynirin pH'sını düşürürler (35).

LAB; şekerler, alkoller ve organik asitler gibi hidrokarbonlu maddelerin varlığında gelişebilirler (20) ve bu maddeleri kullanarak organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit, bazı tat ve aroma maddeleri, bakteriosin veya bakterisidal proteinleri gibi farklı bileşikleri oluştururlar (36).

Laktozu farklı mekanizmalarla fermente eden LAB, homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki gruba ayrılır. Homofermentatif bakteriler; fermentasyon sonucu % 99 oranında laktik asit, % 1 oranında diğer maddeleri meydana getirirken; heterofermentatif bakteriler, % 70 oranında laktik asit, % 30 oranında asetik asit, etil alkol, CO₂ oluştururlar (37, 38, 39, 40).

Homofermentatif LAB'nin başlıca karbon kaynağı glikozdur ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Heterofermentatif LAB ise glikoz molekülünü laktat, etanol ve karbondioksit parçalarlar (18,41).

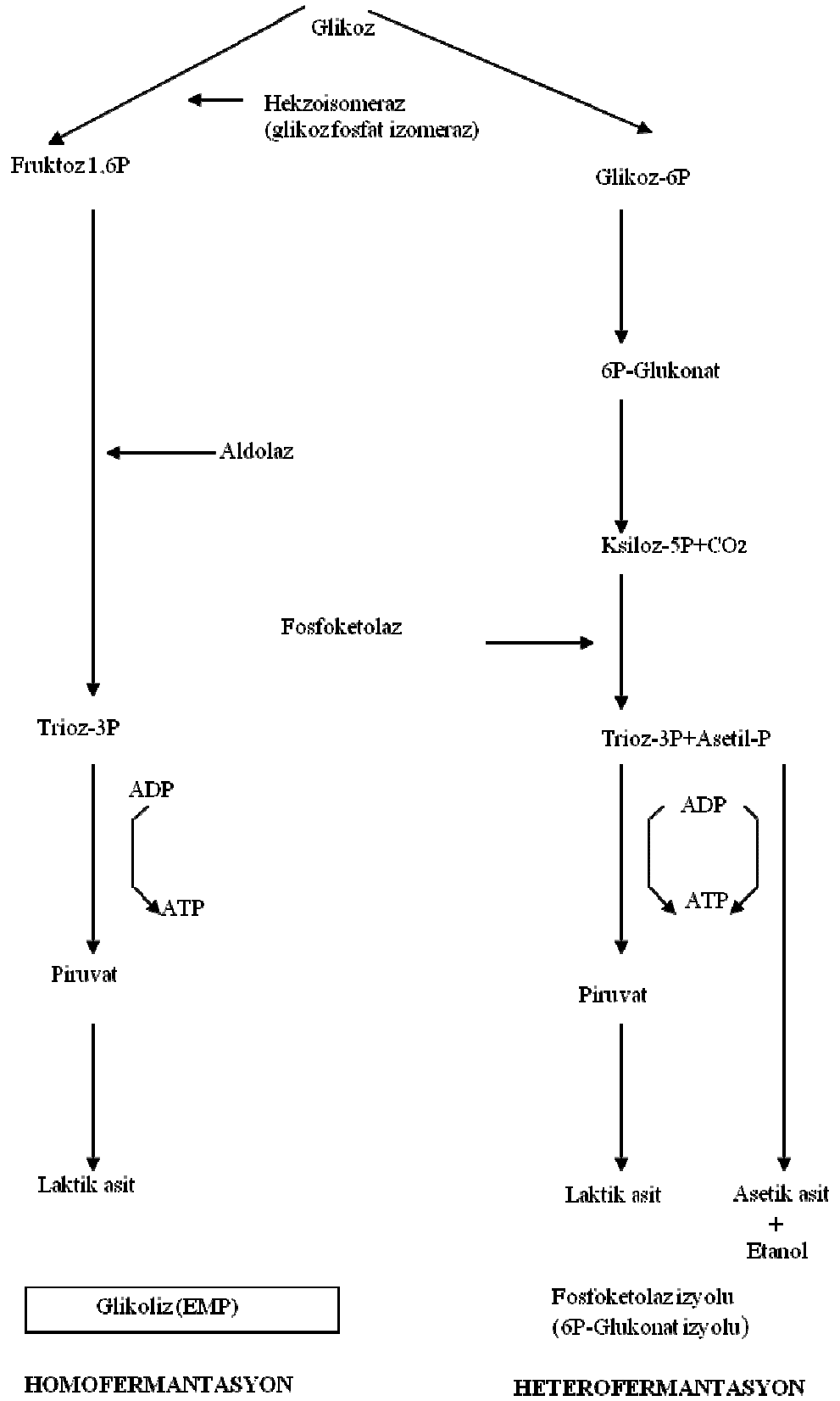
LAB, gıdaların bozulmasında rol oynayan mikroorganizmalar ve insanlarda hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde de ürettikleri asit ve bazı antimikrobiyal maddeler nedeniyle antogonistik etkiye sahiptirler. LAB'nin faaliyetiyle üretilen fermente gıdalar, gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyonları düşünüldüğünde insan sağlığı açısından daha güvenilir gıdalar olarak kabul edilebilir.

Süt endüstrisinde, yaygın olarak *Lb. delbrueckii* alttür *lactis*, *Lb. delbrueckii* alttür *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* alttür *casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri* ve *Lb. brevis* kullanılmaktadır. *Lb. brevis* hariç, diğerleri homofermentatif olup laktozdan süt asidi meydana getirirler. Oluşturdukları süt asidi miktarı diğer süt asidi bakterilerinden daha fazladır. *Lb. casei* alttür *casei*, özellikle Parmesan ve Cheddar peynirlerinde aromanın gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (42, 43, 44). *Lactococcus* cinsinde başlıca *L. lactis* alttür *lactis*, *L. lactis* alttür *cremoris* ve *L. lactis* alttür *lactis* serovar *diacetylactis* bulunmaktadır. Bunlar mezofilik kültürler olup optimal 30°C civarında gelişirler. Birçok süt mamülü için hazırlanan starter kültürlerde yer alırlar. Bu ürünlerde lezzetin oluşumunda *L. lactis* alttür *lactis* biovar *diacetylactis*'in

katkısı vardır. *Streptococcus* cinsinde bulunan en önemli tür *Str. salivarius* alttür *thermophilus*'tur. Bu bakteri termofilik olup, optimal üreme derecesi 37-45°C'dir. *Lactococcus* ve *Streptococcus* soyunda bulunan mikroorganizmalar homofermentatiflerdir. Yani glikozdan yalnız laktik asit üretirler. *Leuconostoc* soyunda ise *Leu. mesenteroides* alttür *cremoris* (*Leu. cremoris* ya da *Leu. citrovorum* diye bilinen), *Leu. mesenteroides* alttür *dextranicum* ve *Leu. lactis* (*Str. kefir*) en önemli starter kültürlerdir. Bunlar da heterofermentatif olup, sütte bulunan sitratı fermente ederek diasetil ve diğer doğal C₄ bileşimlerini oluştururlar. Diasetil; yayık altı, tereyağı kreması, Cottage peyniri gibi peynirlerde ve diğer kültürlü süt ürünlerinde aroma ve lezzetin en önemli kaynağıdır. Bunların dışında süt endüstrisinde propiyonik asit bakterileri, çeşitli mayalar ve küfler de kullanılmaktadır (4, 44, 45, 46, 47, 48).

Süte katılan starter kültürlerde laktokoklara, leukonostoklar da eşlik ederse leukonostokların sütte gelişimi laktokoklar tarafından teşvik edilir ve laktokoklar tarafından üretilen peptit ve aminoasitler, leukonostoklar için hayati öneme sahiptir (49).

Homofermentatif ve heterofermentatif LAB, genetik ve fizyolojik farklılıklarından dolayı glikozu farklı metabolik yollar izleyerek kullanmakta ve farklı son ürünler üretmektedirler. Şekil 1'de laktik asit bakterilerinin izlediği iki farklı glikolitik yol (homofermentatif ve heterofermentatif glikolitik yollar) görülmektedir. Homofermentatif LAB, heksoizomeraz (glikoz fosfat izomeraz) ve aldolaz enzimine sahipken, fosfoketolaz enzimi içermezler ve Embden-Mayerhoff- Parnas (EMP) metabolik yolunu izleyerek bir molekül glikozdan iki molekül laktik asit üretirler. Homofermentatif olanlar, aldolaz enzimi sayesinde heterofermentatif olanlara nazaran direkt olarak laktik asit oluştururlar Heterofermentatif LAB ise heksoizomeraz ve aldolaz enzimi yerine 6 karbonlu şekerleri (heksoz), 5 karbonlu şekerlere (pentoz) dönüştüren ve bu esnada da aldehit ve diasetil gibi aroma bileşiklerinin oluşmasını sağlayan fosfoketolaz enzimine sahiptirler. Bu gruba giren LAB, glikozun yıkımında EMP metabolik izyolu yerine fosfoketolaz glikolitik izyolunu kullanırlar (29,18).



Şekil 1: LAB'nin izlediği 2 farklı glikolitik yol (50).

Tablo 3: Homofermentatif ve heterofermentatif LAB ve oluşturdıkları laktik asit konfigürasyonları (51).

Homofermentatif	Laktik asit konfigürasyonu	Heterofermentatif	Laktik asit konfigürasyonu
Laktobasiller			
<i>Lb. acidophilus</i>	DL	<i>Lb. brevis</i>	DL
<i>Lb. bulgaricus</i>	D(-)	<i>Lb. buchneri</i>	DL
<i>Lb. casei</i>	L(+)	<i>Lb. cellobiosus</i>	DL
<i>Lb. coryniformis</i>	DL	<i>Lb. confusus</i>	DL
<i>Lb. curvatus</i>	DL	<i>Lb. coprophilus</i>	DL
<i>Lb. delbrueckii</i>	DL	<i>Lb. hilgardii</i>	DL
<i>Lb. jugurti</i>	D(-)	<i>Lb. fermentum</i>	DL
<i>Lb. helveticus</i>	DL	<i>Lb. sanfrancisco</i>	DL
<i>Lb. jensenii</i>	D(-)	<i>Lb. trichodes</i>	DL
<i>Lb. lactis</i>	D(-)	<i>Lb. viridescens</i>	DL
<i>Lb. leichmannii</i>	D(-)		
<i>Lb. plantarum</i>	DL		
<i>Lb. salivarius</i>	L(+)		
Pediokoklar		Leukonostoklar	
<i>P. acidilactici</i>	DL	<i>Leu. mesenteroides</i>	D(-)
<i>P. cerevisiae</i>	DL	<i>Leu. paramesenteroides</i>	D(-)
<i>P. pentosaceus</i>	DL	<i>Leu. lactis</i>	D(-)
		<i>Leu. gelidum</i>	D(-)
		<i>Leu. carnosum</i>	D(-)
Streptokoklar			
<i>Str. bovis</i>	D(-)		
<i>Str. thermophilus</i>	D(-)		
Laktokoklar		Karnobakteriler	
<i>L. lactis alttür lactis</i>	D(-)	<i>C. divergens</i>	
<i>L. lactis alttür cremoris</i>	D(-)	<i>C. mobile</i>	
<i>L. lactis alttür diacetylactis</i>		<i>C. gallinarum</i>	
<i>L. lactis alttür hordniae</i>		<i>C. piscicola</i>	
<i>L. garvieae</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. raffinolactis</i>			
Vagokoklar			
<i>V. fluvialis</i>			
<i>V. salmoninarum</i>			

Geçmişte LAB'nin sınıflandırılmasında gram reaksiyonu, katalaz reaksiyonu, laktik asit konfigürasyonu (D, L, DL) ve çeşitli karbonhidratları fermente edebilme yetenekleri gibi özellikler kullanılmaktaydı. Ancak son yıllarda yapılan detaylı genetik çalışmalarla DNA baz kompozisyonları, rRNA dizilişleri (sekansları) hücre duvarı mukopeptid tipleri

ve enzimlerin immünolojik spesifik yapıları gibi özellikler de tanımlama ve sınıflandırmada kullanılmaya başlanmıştır.

Genel olarak LAB grubuna *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri dahil edilmekte iken son yıllarda yapılan taksonomik ve genetik çalışmalar sonucu, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* cinsleri de dahil edilmiştir. Weissella 1993 yılında yapılan çalışmalarla ortaya konmuş yeni bir cinstir. Bunlara ilaveten bazı kaynaklarda; *Aerococcus*, *Qenococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranum*, *Tetragenococcus*, *Alloiococcus* ve *Gemella* gibi bahsedilen cinslerden farklı cinslere de rastlanmaktadır. Ancak bu mikroorganizmalar gıdalarda önem taşımayan cinsler olarak bildirilmekte ve henüz bu cinslerle ilgili taksonomik çalışmalar tamamlanmadığı için kesin sınıflandırılmaları yapılamamaktadır. Hatta bazı araştırmacılar hem genetik, hem de biyokimyasal açıdan LAB ile büyük farklılıklar gösteren EMP, fosfoketolaz veya heksozmonofosfat glikolitik iz yolunu kullanmayan ve son ürün olarak asetik ve laktik asit üreten *Bifidobacterium* cinsini dahi laktik asit bakterileri grubuna dahil etmektedirler (29). Ancak, son yapılan çalışmalarda bifidobakteriler, “*Actinomyces*” grubuna dahil edilmiştir (52).

Bununla birlikte son yapılan bazı klasifikasyon çalışmalarına göre LAB'nin en önemli cinsleri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Melissococcus*, *Aerococcus*, *Qenococcus* ve *Vagococcus* olarak belirlenmiştir (17, 19, 23, 41, 53, 54).

Süt endüstrisi açısından en önemli türler; *Str. thermophilus*, *L. lactis*, *Lb. helveticus* ve *Lb. delbrueckii* alttür *bulgaricus*'tur (55).

1985 yılında Bergey's sistematik bakteriyoloji el kitabında; Gram pozitif, fakültatif anaerob koklarda sadece 7 cins tanımlanmıştır. El kitabının yayımlanmasından önce 16S rDNA gen dizilimindeki benzerlik ve farklılıklar değerlendirilerek *Streptococcus* cinsi 3 cinse ayrılmıştır. *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* (56,57).

TABLO 4: Gram pozitif, fakültatif anaerob kokların katalaz reaksiyonu ve hücre yapısı (58).

Cins	Sitokrom/Katalaz ^a	Hüresel dizilim
<i>Staphylococcus</i>	+/+	Demet/salkım
<i>Micrococcus</i>	+/+	Demet/salkım
<i>Stomatococcus</i>	+/-	Demet/salkım
<i>Streptococcus</i>	-/-	Zincir
<i>Globicatella</i>	-/-	Zincir
<i>Enterococcus</i>	-/-	Zincir
<i>Lactococcus</i>	-/-	Zincir
<i>Vagococcus</i>	-/-	Zincir
<i>Leuconostoc</i>	-/-	Zincir
<i>Aerococcus</i>	-/+ w	Zincir
<i>Alloiococcus</i>	+/+ w	Çift veya dörtlü
<i>Gemella</i>	-/-	Çift veya dörtlü
<i>Pediococcus</i>	-/-	Çift veya dörtlü
<i>Tetragenococcus</i>	-/-	Çift veya dörtlü

(^a + pozitif reaksiyon, - negatif reaksiyon, +/w zayıf reaksiyon)

Enterokoklar ve laktokoklar genellikle serogrup D, serogrup N antijenlerine göre birbirinden ayrılırlar. Serogrup D antijen % 80 dolayında enterokoklarda bulunmuştur, ayrıca laktokokların % 60 civarında serogrup N antiserumu ile reaksiyona girdiği görülmüştür (59). Laktokoklar mannitol pozitif, sorbitol negatif, arabinoz negatif, raffinöz (% 10-90 oranında pozitif), % 0.04 tellurit negatif, piruvat negatif (<%10 pozitif) özellikleriyle enterokoklardan ayrılır. Tellurit toleransı, piruvat kullanımı, sorbitolden asit üretimi yönünden her ikisinin ayırımı yapılabilmektedir.

***Lactococcus* Cinsi ve Bu Cinse Ait Türlerin Özellikleri**

Daha önceleri laktokoklar, streptokok cinsi içerisinde sınıflandırılıyordu ve maltoz fermentasyonundaki farklılık göz önüne alınarak *Str. lactis* ve *Str. cremoris* olmak üzere iki türe ayrılmışlardı (60). Laktik streptokoklar olarak adlandırılan bu türler arasında pH 9.2'de, 40°C'de ve % 4 NaCl'de gelişebilmeleri açısından farklılıklar tespit edilmiştir. Sonunda, arjininden amonyak oluşturma özelliği bu iki türün ayırt edilmesinde (alttür *cremoris* arjinini kullanmaz) ayırıcı bir kriter olarak kabul edilmiştir. Ayrıca bazı *Str. lactis*

suşlarının süt ürünlerinde lezzet oluşumunda önemli bir özellik olan sitratı; asetoin, diasetil ve CO₂'e metabolize etme yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır (61).

Son yıllarda yürütülen enzim analizleri (özellikle süperoksit dismutaz varlığının tanımlanması) lipit ve lipoteik asit kompozisyonlarının belirlenmesi ve 23S ribozomal RNA-DNA hibridizasyonları sonucu elde edilen veriler doğrultusunda *Streptococcus* cinsinden ayrılan bazı türler *Lactococcus* cinsi altında sınıflandırılmıştır. 1985 yılından önce katalaz negatif, fakültatif anaerob, serogrup N koklar (karbonhidratların fermentasyonu sonucu laktik asit üreten koklar) olarak *Streptococcus* cinsi içinde yer alıyordu. Bu bakteriler fizyolojik olarak serogrup D fekal streptokoklara ve enterokoklara benzerlik göstermektedirler. Genetik DNA-DNA ve DNA-RNA üzerine yapılan çalışmaların artması sonucu laktik streptokoklar alt türlere ayrılmıştır (62,63). Fekal streptokoklar *Enterococcus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. *Lactococcus* cinsi ise *Streptococcus* sınıfından ayrılarak farklı bir cins olarak yeniden tanımlanmıştır (17, 64). Ayrıca *Streptococcus* cinsinin üyeleri modern sınıflandırma teknikleri ve serolojik çalışmalar ile *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* olarak 3 alt gruba ayrılmıştır (65).

Eski sınıflandırmada *Streptococcus* cinsinin N Lancefield grubundaki yer alan laktokoklara ilişkin son yıllarda yapılan taksonomik çalışmalara göre bu cinse ait tür ve alttürler şunlardır:

1. *L. lactis* alttür *lactis* (eski adı *Str. lactis* alttür *lactis* ve *Lb. xylosus*)
2. *L. lactis* alttür *cremoris* (eski adı *Str. lactis* alttür *cremoris*)
3. *L. lactis* alttür *hordniae* (eski adı *Lb. hordniae*)
4. *L. plantarum* (eski adı *Str. plantarum*)
5. *L. raffinolactis* (eski adı *Str. raffinolactis*) (29, 64)

Laktokoklar, süt ve süttten yapılan ürünlerden, bitkisel materyallerden (fermente sebze, bitki ve içecekler), balıkların bağırsaklarından ve böceklerden izole edilmiştir (66).

LAB; diğer peynir bakterilerine göre daha yüksek a_w değerinde gelişebilirler. *L. lactis*'in gelişmesi için gerekli olan minimum su aktivitesi değeri (a_w) 0,965, *L. lactis* alttür *lactis*'in ise 0.950'dir. *Str. thermophilus* için; 0.985, *Lb. plantarum* için; 0,945'tir (34).

Tablo 5: Laktokokları diğer Gram (+) koklardan ayıran fenotipik özellikler (58).

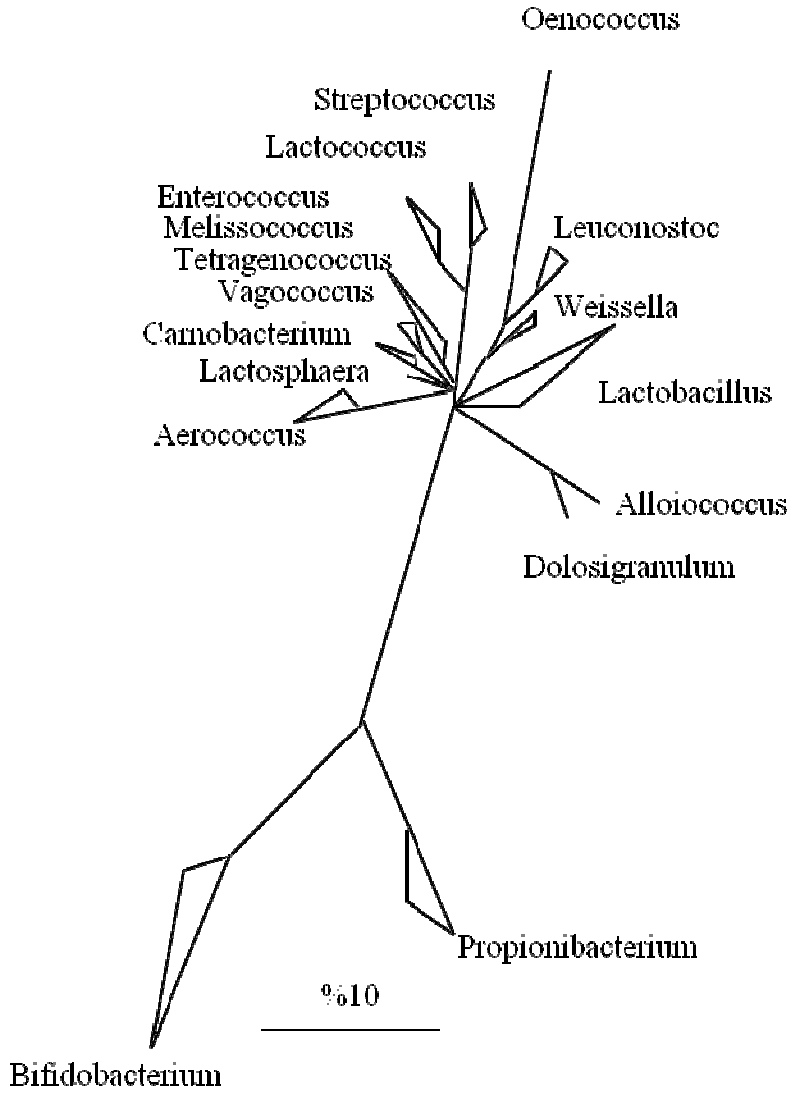
Fenotipik karakteristik özellikleri	(% pozitif)
Vankomisin duyarlılığı	100
Gaz oluşturma (MRS agarda glikozdan gaz oluşturma yeteneği)	0
NaCl (% 6.5 NaCl içeren brothda üreme özelliği)	70
Safra tuzu-Eskulin reaksiyonu	98
10°C' de gelişme	90
45°C' de gelişme	43
Hareket	0
Alfa Hemoliz (% 5 koyun kanı içeren Trypticase Soy Agar' da)	40

Laktokokların patojenik olduğuna ilişkin değişik veriler mevcuttur. *L. lactis*, alttür *lactis* ve *L. garvieae*; nozokomiyal insan ve hayvan enfeksiyonlarından izole edilmişlerdir. *L. garvieae*, *L. piscium* balık türleri için patojenik özellik gösterebilirler. Ayrıca, *L. garvieae*, ruminantlarda mastitise neden olabilir (67).

Lactococcus cinsi, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. piscium* ve *L. raffinolactis* türlerini içermektedir (52). Bunlardan *L. garvieae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum* ve *L. hordniae* fermente süt teknolojisinde kullanılmamaktadır. *L. lactis* suşları arasında ise *L. lactis* alttür *lactis*, *L. lactis* alttür *cremoris* ve *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*; peynir, yoğurt, tereyağı gibi fermente süt ürünleri yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadır (68).

Hücreler küresel veya ovoid yapıdadırlar (0.5-1.2× 0.5-1.5 µm). Gram pozitif, kemoorganotrofik, sıvı besi ortamlarında tek, çift veya kısa zincirler halinde üreme gösterirler, endospor oluşturmazlar, bir takım karbonhidratları fermente ederek laktik asit oluştururlar ancak gaz oluşturmazlar, katalaz ve oksidaz negatiftir, fakültatif anaerobtur (flavoprotein peroksidaz enzimlerinin sınırlı oksidasyon redüksiyonundan dolayı) optimum üreme sıcaklıkları 30°C'dir. % 0.5 tuz içeren ortamda ve pH 9.6'da üreyemezler. Hem bağımlı katalaz sistemi içermemektedirler (69). Homofermentatif özelliktedirler ve ana enerji kazanım mekanizmaları şekerlerin fermentasyonu ile gerçekleşmekte ve başlıca

son ürün olarak L(+) laktik asit ve aroma maddeleri oluşturmaktadırlar. Hareketsiz olup hemolitik reaksiyon göstermemektedirler. Sadece bazı *L. lactis* alttür *lactis* suşları zayıf α hemoliz yeteneğine sahiptir. N grup antisera ile aglutine olmayan nadir suşlar hariç, tümü N grup antijen içermektedir. Gelişmeleri için başta azot kaynakları olmak üzere çok sayıda besin maddesine gereksinim duyarlar. 10°C'de inkübasyon sıcaklığında gelişme gösterirken, 45°C'de gelişememe özellikleri, bu cinsi hem streptokoklardan hem de enterokoklardan ayırmaktadır.



Şekil 2: Laktokoklar ve yakın türlerin filojenetik yapısı (70).

(16S rRNA gen dizilişlerine göre karşılaştırma yapılmıştır.)

L. lactis türüne ait mikroorganizmalar (*L. lactis* alttür *lactis*, *L. lactis* alttür *cremoris* ve *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*) peynir, tereyağı ve kefir gibi çok sayıda fermente süt ürününün üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'in sitrat fermentasyonu sonucu diasetil ve asetoin oluşturma yeteneği *lactis* alttüründen tek farklılığıdır. Son yıllarda yürütülen araştırmalarda bazı *L. lactis* alttür *lactis* biovar *diacetylactis* mutantlarının glikozun fermentasyonu sonucunda da diasetil ve asetoin üretebildikleri saptanmıştır (71). Tüm laktokok türleri insan ve hayvan tüketimine güvenilir (GRAS) mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (69,72).

Fizyolojik aktivitelerine göre *Lactococcus*'ların 7 ayrı türü ve alt türünün tanımlanması yapılmıştır (73, 74, 75). Tablo 7 de de görüldüğü gibi bu 7 türün birbirine yakın reaksiyonlar verdiği görülmektedir. Belirtilen türlerin ayırımında ayrıca; moleküler ayırım, DNA ve RNA analizleri, protein analizleri kullanılmaktadır (76, 77, 78, 79).

Tablo 6: Laktokok türlerini ayırıcı biyokimyasal testler (58).

TÜRLER	Lakt.	Malt.	Mann.	Raff.	Sükr.	Sorbit	Treh.	Arji.	Hipp.	Pyr.	V.P.
<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	91	100	100	0	82	0	100	91	0	55 ^b	82 ^b
<i>L. garvieae</i>	61	95	100	0	50	0	100	100	0	100	100
<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>L. lactis</i> alttür <i>hordniae</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>L. plantarum</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>L. raffinolactis</i>	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. xyloso</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+

^a % pozitif sonuçlar (asit formasyon), +; pozitif, -; negatif, v; değişken

^b *L. lactis* PYR ve Voges-Proskauer testlerinde negatif sonuç vermiştir.

Son yıllarda yürütülen genetik ve biyokimyasal analizler sonucu *Streptococcus* cinsinden ayrılan ve *Vagococcus* olarak adlandırılan cinse dahil edilen türler, laktokoklarla büyük oranda benzerlik gösterdiği için sınıflandırma çalışmalarında sorun yaratmaktadır.

Bu cinslerin üyelerinin ayırımında, yağ asidi kompozisyonu farklılıkları ve vagonokların bazı suşlarında görülen hareket etme yetenekleri kullanılmaktadır (80,81).

Tablo 7: *Lactococcus* cinsine bağlı türlerin başlıca özellikleri (64).

Karakteristik Özellikleri		<i>Lactococcus lactis</i> subsp.			<i>L. garvieae</i>	<i>L. raffinolactis</i>	<i>L. plantarum</i>
		<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>diacetylactis</i>			
Gelişim	10°C	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	-	+	-	v
	45°C	-	-	-	-	?	-
	NaCl %2	+	+	+	?	?	?
	NaCl %4	+	+	+	+	-	+
	NaCl %6.5	-	-	-	?	?	?
Arjinin hidrolizi		+	v	-	+	v	-
Şeker kullanımı	arabinoz	v	-	-	-	v	-
	ksiloz	v	-	-	-	v	-
	laktoz	+	+	+	+	+	-
	maltoz	+	+	-	v	+	+
	sakkaroz	v	-	-	v	+	+
	trehaloz	v	v	-	+	+	+
	raffinoz	v	+	-	-	+	-
	mannitol	v	v	-	v	v	+
	eskulin	+	+	-	+	+	+
	salisin	+	+	-	+	+	+
Peptidoglikan tipi		Lys-D-Asp			Lys-Ala-Gly-Ala	Lys-Tyr-Ala	Lys- Tyr-Ala
G C% oranı		34-36			38-39	40-43	37-38

Dünya genelinde yılda 10^7 tonun üzerinde peynir üretildiği göz önüne alındığında *L. lactis*'in ne derece büyük ekonomik öneme sahip olacağı görülecektir (82,83). LAB'nin birincil rolü; çıkardıkları laktaz (β -galaktozidaz) enzimi ile süt şekerini parçalayıp süt asidi oluşturmalarıdır. Bunun sonucunda pH düşer ardından proteoliz şekillenmesi sonucunda kısa zincirli peptitler ve serbest aminoasitler oluşur. Bu bileşikler tat ve lezzet oluşumunda rol oynarlar (84, 40).

Çiğ süt ve pastörize süttten imal edilen peynirlerdeki duyuşal kalite farklılıkları, süttün genel mikrobiyolojik yapısındaki farklılığa dayanmaktadır (8, 85, 86). Peynir üretim

endüstrisinde çok geniş bir yer alan *Lactococcus* türleri aminoasitler üzerindeki enzimatik aktiviteleri sonucunda çok farklı duyuşsal lezzet oluşumuna neden olmaktadır. *L. lactis*'in aminoasitler üzerindeki transaminasyon özelliği sonucunda, peynirin lezzetinde değişimler şekillenmektedir (α -keto asitlerin dekarboksilasyonu sonucu aldehitler oluşur). Farklı suşlar arasındaki enzimatik aktivite de farklılıklar gösterir (87).

Lactococcus suşları; starter kültür olarak peynir yapımında, peynirin yapısının olgunlaştırılmasında, tadıyla ilgili farklılaşmanın sağlanmasında, geleneksel peynir çeşitlerinin karakteristik özelliklerinin gelişmesinde rol oynamaktadır (88,89).

L. lactis suşları, starter kültürlerde, sert ve yarı sert peynir yapımında yaygın bir şekilde kullanılırlar. Farklı şekillerde kullanılan suşlar, peynirde tat ve lezzet gelişimine katkıda bulunurlar. Çiğ süt ve pastörize süttten elde edilen peynirlerdeki duyuşsal kalite farklılıkları, çiğ sütteki mikrobiyal flora farklılığına ve kompleks yapısına bağlıdır (85).

Laktokokların enzim aktiviteleri sonucunda sitrat, tat ve lezzet bileşiklerine dönüşür (diasetil ve asetoin gibi). Bu enzimler maksimum aktivitelerini pH: 5.5'te gösterirler (90).

Laktokokların laktoz fermentasyonu, proteoliz, diasetil oluşturması ve faj direçliliği gibi moleküler fonksiyonları plazmidlerde kodlanmıştır. *L. lactis* suşlarında fermente gıda endüstrisi açısından önem taşıyan özelliklerin genellikle plazmidler tarafından kodlandığının belirlenmesi, bu bakterilerde genetik analiz çalışmalarına büyük bir ivme kazandırmış ve endüstriyel suşların bilinçli müdahaleler ile istenilen doğrultuda düzenlenmelerini olası hale getirmiştir. Zira, plazmid DNA moleküllerinin kromozomal DNA'ya oranla çok küçük olmaları ve genellikle bakteriler arasında aktarımlarının sağlanabilmesi yetenekleri, yapısal analiz ve yeniden düzenleme çalışmalarına büyük kolaylık sağlamaktadır. Bakterilerde, plazmidler yanında, kromozomal DNA kökenli genlerin de rekombinasyonuna olanak tanıyan doğal ve yapay genetik aktarım sistemlerinin başlıcaları; konjugasyon, transdüksiyon, transformasyon, protoplast transformasyonu ve elektroporasyondur. Bu sistemlerin tümü genetik analiz çalışmalarında kullanılmakta, ancak endüstriyel suş geliştirme çalışmalarında yapay genetik aktarım sistemlerinden yararlanılmasına izin verilmemektedir. Laktokoklarda doğal süreçlerde gerçekleşen gen aktarım sistemleri sadece konjugasyon ve transdüksiyondur. Ancak transdüksiyon, kullanılacak suşlarda faj duyarlılığını zorunlu kıldığı için, endüstriyel uygulamalarda tercih edilmemektedir. Yüksek sıklıkta aktarım oranı içeren sistemlerin kullanımı, arzu edilen özelliklere sahip rekombinantların oluşturulması ve seçimini önemli ölçüde kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle laktokoklarda

doğal gen aktarım sistemlerinin genetik ve biyokimyasal esası üzerinde yoğun araştırmalar sürdürölmektedir (91).

Lactococcus cinsi üyelerinde saptanan stabil plazmid profilleri, belirli bir türe ya da alt türe ait suşların ayırımında en yaygın olarak kullanılan kriterlerin başında gelmektedir. Türler ya da alt türler ve biyovaryeteler arasında yapılan genetik tanımlamalarda ise, kromozomal DNA ya da ribozomal RNA (rRNA) spesifik sondaların geliştirilmesi ve kullanımı esas alınmaktadır (92).

Lactococcus cinsi üyesi bakterilerde laktik asit fermentasyonu özelliğini belirleyen plazmidler, genellikle bu bakterilerin içerdii 20 kb'den büyük plazmidlerdir. Bu güne kadar değişik suşlarla yürütölen araştırmalarda, laktokok suşlarında laktoz plazmidlerinin büyüklükleri 25-60 kb arasında saptanmıştır (93,94). Bazı araştırmacılar, değişik *L. lactis* alttür *lactis* ve *L. lactis* alttür *cremoris* suşlarında 95 kb büyüklüğüne kadar ulaşabilen laktoz plazmidlerini tanımlamıştır. Ancak, söz konusu plazmidlerin genetik analizleri sonucu; bu büyük moleküllerin, iki farklı plazmidin birleşmesi ile oluştuğu belirlenmiştir. Laktoz plazmidi ile birleşen plazmidler nadiren stabil entegrasyon yapıları oluşturabilmekte, çoğu kez birleşmeden kısa bir süre sonra ayrılma meydana gelmektedir (95,96). Plazmid büyüklükleri tamamen çakışan tüm suşların aynı moleküler büyüklükte laktoz plazmidine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu; *Lactococcus* cinsi üyelerinin, plazmid profilleri esas alınarak suş düzeyinde ayırımının güvenilirliğini destekleyen önemli bir delildir. Diğer yandan plazmid içerikleri çakışmayan bazı suşlarda ortak büyüklüklerde laktoz plazmidlerinin saptanmasının, bu suşların evrimi ile ilişkili olduğu düşünölmektedir.

Ayrıca, 16S rDNA zincirine ilişkin spesifik problemlerin geliştirilmesiyle *L. lactis* alttür. *cremoris* ile *lactis* alttürlerinin moleküler olarak ayırımı mümkün olmuştur (97).

Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültürler

Starter kültür; peynir, tereyağı, fermente süt ürünlerinde beğenilen tat, aroma ve tekstürün oluşumunu sağlamak amacıyla bu ürünlerin üretimleri sırasında kullanılan mikroorganizma kültürleridir. Bu mikroorganizmalar belirli özelliklere sahip suşlardır. Standart kalitede ürün üretmek amacıyla starter kültür kullanmak zorunludur. Süt endüstrisinde starter kültür kullanımının tarihi oldukça yenidir. Günümüzde en fazla starter kültürün kullanıldığı süt ürünü olan peynir, yaklaşık 6000 yıldan beri bilinmesine rağmen bunun üretiminde ticari starter kullanımına yaklaşık 120 yıl önce başlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 1890 yılında Danimarka'da Chr. Hansen, 1906 yılında

ABD’de Marschall laboratuvarı tereyağı ve peynir için ticari starter kültür üretip pazarlamışlardır. Tam anlamıyla starter kültür üretimi, yıllar sonra süt asidi bakterilerinin özellikleri ve fonksiyonlarının belirlenmesi ile gerçekleşmiştir. Çeşitli peynirler, yoğurt üretimi ve krema olgunlaşması için gerekli mikroorganizmalar saptanmıştır.

Peynir üretiminde gerek fermentasyon ve gerekse olgunlaşmanın arzu edilen yönde olmasını sağlayacak starter kültür adı verilen bazı mikroorganizmaların saf ve karışık kültürleri süte belirli oranda katılmaktadır. Bu amaçla *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium* soylarına ait çeşitli türlerden faydalanılmaktadır (42, 43, 98, 99).

Peynir yapımında ve peynirin olgunlaşmasında rol oynayan mikroorganizmalar, başlıca 2 büyük gruba ayrılabilir;

- i) starter bakteriler
- ii) non-starter laktik asit bakterileri.

Grup 1, kendi içinde ilave olarak 2 gruba ayrılır (primer ve sekonder starterler). Bu iki grubun özellikleri ve oynadıkları rol, birçok makalede dökümanite edilmiştir. Primer starterlerin (birincil starterler) görevi, peynir yapımında istenilen asit gelişiminin sağlanmasıdır. Bu grupta yer alan mikroorganizmalar, proteinlerin ve yağın indirgenmesinde rol oynarlar (olgunlaşma sırasında). Bu gruba ait kültürler, üretimde biyolojik değişimlerin gerçekleşmesi açısından önemli rol oynarlar (düşük pH, bakteriyosin üretimi). İkincil starterler ise, örneğin İsviçre peynirinde gaz üretimi, yüzeysel renk değişimi vb. amaçla kullanılırlar. İkincil starterler, bazı peynirlerde tipik tat ve lezzetin oluşumunu sağlarlar (Roquefort, Emmental, Camembert, Limburger).

Grup 2 nonstarter LAB, bazı peynir türlerinde tat ve lezzet gelişimine katkıda bulunurlar (100).

Peynir tiplerine göre değişmekle birlikte olgunlaşmanın başında 10^6 - 10^{10} kob/g seviyelerinde olan starter laktokokların sayısı genellikle 2-16°C’de gerçekleşen olgunlaşmanın ilk haftalarında düşmektedir. Starter laktokokların sayısı; peynirdeki düşük pH, fermente edilebilen karbonhidratların yetersizliği ve düşük olgunlaşma sıcaklığı gibi nedenlerle azalmaktadır. Starter kültürlerin azalma oranı, kültürlerin otolitik özellikleri, tuz toleransı ve fajlara karşı direnç gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. İkincil mikroflorayı bakteri, maya ve küflerin karışımı oluşturmaktadır. Starter olmayan mikroflora olarak da adlandırılan ikincil mikrofloranın (özellikle bakterilerin) peynire giriş şekli tam olarak bilinmemekle beraber, bunların üretim aşamalarında peynir sütüne bulaşabileceğine, peynir sütünün pastörizasyonu sonrasında da belli seviyelerde

canlılıklarını sürdürebileceklerine ya da pastörizasyon sonrası süte bulaşabileceklerine inanılmaktadır. Peynir çeşitlerinde starter olmayan mikroflora; propiyonik asit bakterileri, küfler, yüzeysel olgunlaştırılan peynirlerde önemli olan bakteri ve mayalar, starter olmayan LAB (başlıca mezofilik laktobasiller, pediokoklar, enterokoklar ve leukonostok türü bakteriler) olmak üzere başlıca 4 gruptan oluşmaktadır (35). Çeşitli literatürlerde söz konusu LAB'nin peynir kalitesi üzerinde negatif (kalsiyum laktat kristalleri oluşumu, yarık ve çatlak oluşumu) ve pozitif (proteolizi artırarak bazı peynir tiplerinde lezzet üzerinde olumlu etki) etkileri olduğu bildirilmektedir (101).

Starter kültürler özellikle *L. lactis* suşları süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar. Starter kültürler; peynir yapımında 4 önemli fonksiyona sahiptir: i). laktozdan laktik asit üretimi ii) kazeinlerin indirgenmesi (degradasyon) iii) aroma bileşiklerinin oluşumu iv) arzu edilmeyen mikroorganizmaların inhibisyonu (sütteki asidifikasyon ve bakteriyosinlerin üretimine bağlı olarak). Tüm bu fizyolojik özellikler; peynirde istenilen, arzu edilen tekstür, tat ve lezzetin oluşumuna katkıda bulunurlar. *L. lactis* sütte 109 CFU/ml seviyesinde bulunmalıdır (102).

Starter kültürler sert ve yarı-sert peynir üretiminde kullanılmaktadır. Bu kültürler içinde en yaygın olarak kullanılanı ise, *L. lactis*'tir. Endüstriyel süt fermentasyonunda bu kültürler özellikle peynirde karakteristik tat ve lezzet oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılır (85). Endüstriyel suşlarına göre tanımlanmamış laktokokal suşlar farklı tat ve lezzet oluştururlar (aminoasit değişiminde çok daha güçlü enzimatik aktivite gösterirler (103). Son yıllarda araştırmacılar çalışmalarını doğal yaşamdan izole ederek elde ettikleri suşları geleneksel çiğ süttten yapılan peynirlerde ne şekilde kullanabilecekleri üzerinde odaklanmışlardır. Bu suşlar başlıca; peynir üretiminde bio çeşitliliğin artırılması, farklı tat ve lezzet oluşumunu sağlamada ve geleneksel peynir çeşitlerinin karakteristik özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılabilir (89).

Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan laktokokların olgunlaşma sırasında trigliseritlerin hidrolizinde önemli rol oynamadıkları öne sürülmüştür (104).

Laktokokların Peynir Olgunlaşmasındaki Rolü

Olgunlaşma, her peynir çeşidinin kendine özgü koku, tat, renk, kıvam gibi özellikleri alabilmesi için belirli şartlar altında ve belirli bir dönem içerisinde geçirdiği değişikliklerin toplamıdır (105).

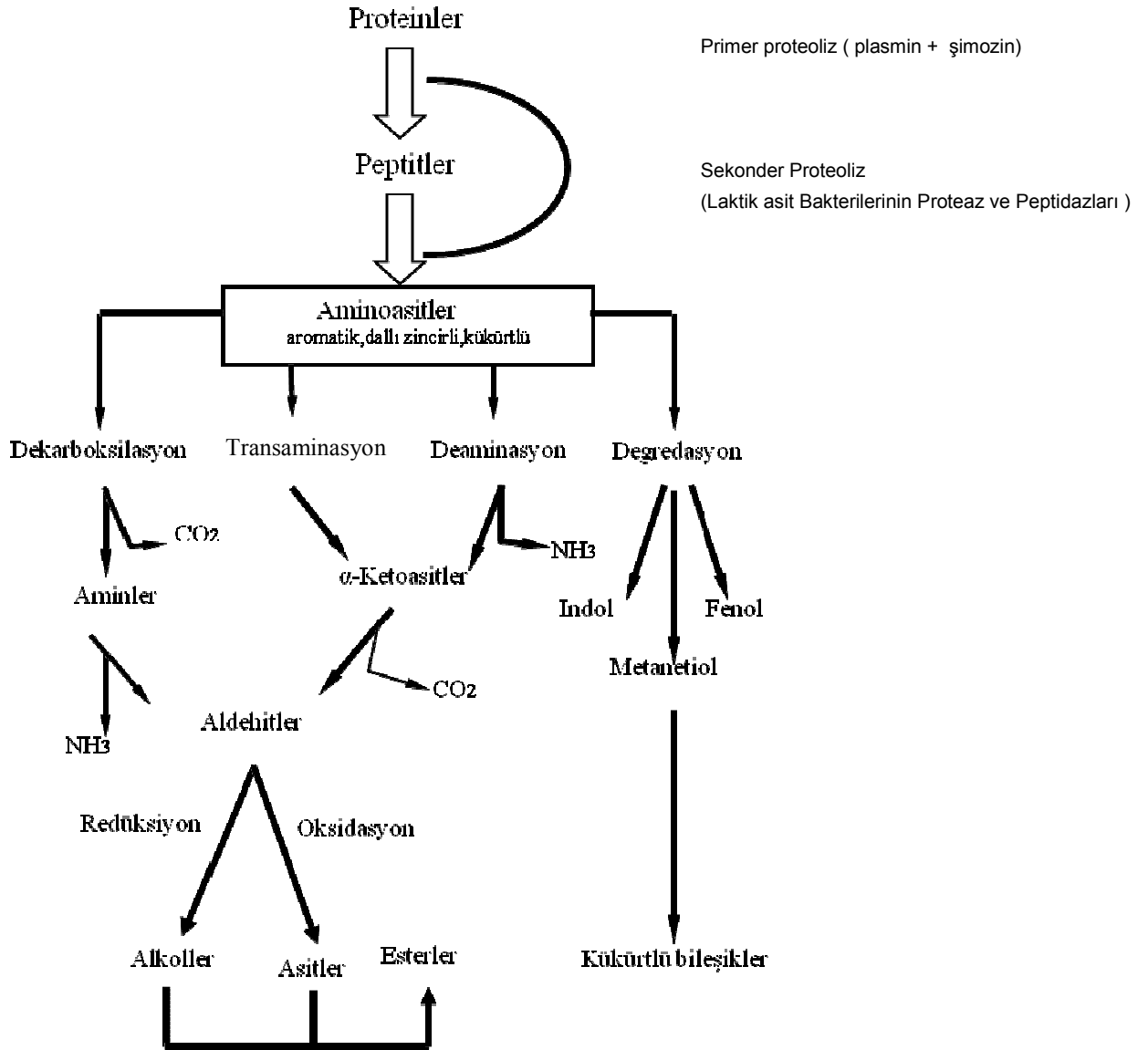
Peynirin olgunlaşması esnasında tat ve lezzet oluşumu şekillenir. Bu oldukça kompleks bir prosestir. Bu oluşum başlıca 3 katabolik yolla oluşur. Glikolizis, lipolizis, proteolizis. Proteolizisin özellikle birçok yarı-sert peynirlerde tat ve lezzet oluşumunda katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Son araştırmalar göstermiştir ki dışarıdan serbest aminoasit ilavesi bile peynirde aroma gelişimine katkıda bulunmamıştır. Serbest aminoasitlerin aroma bileşiklerine dönüşümü aroma, tat ve lezzet oluşumuna katkıda bulunur (106). Peynirin olgunlaşma prosesinde, kazeinin proteolizisi, serbest aminoasitlerin aroma bileşiklerine dönüşümü, süt yağının lipolizisi, olgunlaşma prosesinde gerekli olan basamaklardır (107).

Peynire işlenecek sütün pastörize edilmesi, sütteki patojen ve diğer zararlı mikroorganizmaların yanı sıra, işlem sırasında asitliği arttıracak ve peynirin olgunlaşmasını sağlayacak LAB'nin de ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Bu durumda, istenilen kalitede peynir imalatı güçleşmektedir. Ayrıca pastörizasyonla öldürülmeyen, ısıl işleme dirençli bakteriler, ya da üretim aşamalarında yeniden bulaşabilen mikroorganizmalar, kolaylıkla gelişerek ortama egemen olmakta ve peynirde çeşitli kusurlara yol açmaktadırlar. İşte bu nedenle, alışlagelen tat ve aromada ürün elde edebilmek için süte, pastörizasyon ile yitirilen LAB'nin saf kültür halinde katılması teknolojik bir zorunluluk olmaktadır.

Starter kültürlerin temel işlevi; işlem parametrelerinin uygulanabilmesi için öngörülen sürede asit üretmektir. Asit üretiminin; pıhtı oluşumu, peynir suyunun ayrılması, tat ve lezzet oluşumunun başlatılması, patojenlere karşı ürünün korunması ve dayanıklılığının artırılması üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Kültürlerin teknolojik yönden diğer bir işlevi de proteolizdir. Proteoliz; starter bakterilerin hem asit oluşturma işlevi, hem de ürünün duyuşal nitelikleri açısından önem taşımaktadır. Laktik asit bakterileri, sadece asit üretmeyip, protein parçalanması ve aroma oluşumuna da katıldıkları için kültürün bileşimi, son ürünün kalitesine önemli etki yapmaktadırlar. Türk tipi Beyaz salamura peyniri için seçilecek kültürlerdeki mikroorganizmaların, yüksek asit oluşturma yeteneğine sahip olmalarına, normal düzeyde proteolitik aktivite göstermelerine, tuza ve antibiyotiklere dirençli olmalarına özen gösterilmektedir.

Katılacak starter miktarı, peynirin çeşidine göre değişmekle birlikte genelde;

- (a) Sert peynirler: % 0.2
- (b) Yarı sert peynirler: % 0.5-1.0
- (c) Yumuşak peynirler için: % 1.0-2.0 kadardır (7).



Şekil 3: LAB tarafından aminoasitlerin parçalanma yolları (108).

Starter kültürlerin teknolojik yönden önemli diğer bir işlevi de proteolizdir. Proteoliz, starter bakterilerin hem asit oluşturma işlevi, hem de ürünün duyuşal nitelikleri açısından önem taşır. Starter bakterilerin gelişerek yüksek hücre konsantrasyonuna ulaşabilmesi ve dolayısıyla hızlı asit üretebilmeleri için, süt proteinini parçalayarak küçük molekülü peptit ve aminoasitlere dönüştürmesi gereklidir. Starter kültürlerin proteolitik enzimleri özellikle peynirlerin duyuşal niteliklerine de katkıda bulunur. Hücrelerin otolizi sonucu serbest hale geçen bakteriyel proteinaz ve peptidazlar, peynir mayası enzimleri ile birlikte kazeini kısmen hidrolize ederek, peynirde duyuşal değişimlere neden olurlar.

Ayrıca bu etkinlik sonucu oluşan aminoasitler katabolize olarak peynir lezzetine katkıda bulunan yeni bileşikler oluştururlar (7, 109).

Süt endüstrisi geliştikçe starter kültür kullanımı yaygınlaşmış, kültür üreten laboratuvarların sayısı artmış ve kültür üretim teknolojisinde önemli gelişmeler olmuştur. Ticari olarak sıvı, toz (liyofilize) ve dondurulmuş kültür üretimi yapılmaktadır. Bu kültürler optimum çoğalma sıcaklıklarına göre;

- Mezofil starter kültürler
- Termofil starter kültürler

Kültürlerdeki mikroorganizma suşlarına göre;

- Tek suşlu starter kültürler
- Çok suşlu starter kültürler
- Karışık starter kültürler olarak gruplara ayrılırlar.

Ticari olarak ilk üretilen starter kültürler, sıvı kültürlerdir. Son yıllarda doğrudan doğruya peynir ve yoğurt yapılacak süte katılan konsantre liyofilize ve konsantre dondurulmuş starter kültür kullanımı artmaya başlamıştır. Ülkemizde genellikle DVS (Direct Vat Set) kültür kullanılmaktadır. Türkiye’de süt ürünleri üretiminde starter kültür kullanımı 1970’li yıllarda başlamıştır. Almanya ve Hollanda’dan önce sıvı, sonra liyofilize kültürler ithal edilmiştir. Ancak ülkemizde starter kültür üretimi yapılmamaktadır. Sadece bazı laboratuvarlarda özel sıvı stok kültürler hazırlanmaktadır (39).

Peynir üretiminde starter kültür kullanımının yararları;

- Rennet ile pıhtılaşmayı çabuklaştırması ve pıhtıyı sertleştirilmesi,
- Pıhtı oluşumundan itibaren peynirde asitliği arttırmak,
- Peynir suyunun çıkışını hızlandırmak,
- Salamuradan tuz alımını azaltmak,
- Peynir suyuna kaçan yağ ve protein miktarını azaltmak,
- Peynirde zararlı mikroorganizmaların gelişimini önlemek,
- Olgunlaşma sırasında tat ve aroma meydana getirmek,
- Peynirde olgunlaşmayı hızlandırmak (110, 1).

Tunail (110), literatür incelemelerine ve kendi araştırmalarına dayanarak proteolitik aktiviteleri olan *Lb. casei* ile asit üretme yeteneği olan ve böylece diğer yabancı

mikroorganizmaların gelişimini inhibe edecek *L. lactis* alttür *lactis* ve *cremoris*'in Beyaz peynir üretiminde starter kültürde yer almasının gerekli olduğunu bildirmiştir.

L. lactis alttür *lactis* ve *cremoris* homofermentatif süt asidi bakterileri olup, proteolitik aktiviteleri çok düşük bakterilerdir ve peynirde esas olarak süt asidi oluştururlar. Günümüzde Beyaz peynir üretiminde kullanılan ithal starter kültürler genellikle laktis ve kremoris içermektedir. Bu starterler Avrupa'da bazı peynirlerin üretimi için kullanılmaktadır. Beyaz peynir ve Kaşar peyniri için özel starter kültür üretilmelidir. İthal kültürlerin bu peynirlere tam uygun olmadığı görülmüştür. Balkan ülkelerinde Beyaz peynir üretiminde kullanılan starter kültürlerde *Lb. casei* bakterileri bulunmaktadır (39).

Peynirin olgunlaşmasında rol oynayan direkt etkenler arasında sütün doğal enzimleri (proteinaz, lipaz), peynir mayası (rennet), starter bakteriler ve bunların enzimleri, starter olmayan bakteriler ve enzimleri, sekonder starterler ile peynire hızlı olgunlaşma amacıyla katılan enzimler yer almaktadır. Bu etmenlerin aktivitelerinde etkili olan indirekt faktörler ise çevre şartlarıdır. Bunlar gerek peynirin kendisi ile (çiğ/pastörize süten yapılıp yapılmadığı, peynirde nem oranı, pH ve tuz vb) ve gerekse peynirin depolandığı ortam (depo sıcaklığı, nem vb) ile ilgili faktörlerdir (111). Starter kültürler başta, laktoz fermentasyonu olmak üzere, peynirde protein parçalanması ve aroma üretimi gerçekleştirmektedirler. Starterler bu görevi gerek salgıladıkları farklı tip ekstrasellüler enzimlerle ve gerekse otolizden sonra ortama yaydıkları intrasellüler enzimlerle sağlamaktadırlar. Starter bakterilerin lipolitik parçalanmaya da katkıları olduğu bilinmektedir.

Peynir olgunlaşmasında rol oynayan her bir faktör kendi içerisinde geniş bir yer tutmaktadır. Bunlardan ilki sütte doğal halde, özellikle kazein misellerinde bulunan proteazlardır. İşte plazmin bu proteazlardan biridir ve buna aynı zamanda alkali proteaz da denilmektedir. Isıya dayanıklı bu enzim, β -kazeini γ -kazeine ve onu da proteaz peptonlara parçalamaktadır. Alkali proteaz α -s₂-kazeini oldukça hızlı hidrolize edebilmektedir. Asit proteaz ise α s₁-kazein üzerine etki etmektedir.

Olgunlaşmada etkili olan enzim grupları 4 başlık altında toplanabilir:

1. Proteolitik enzimler: Bu enzim grubu da iki alt gruba ayrılır. Endopeptidazlar (ya da proteazlar; görevleri proteinleri parçalayıp peptitleri açığa çıkarmaktadır) ve Ekzopeptidazlar (aminopeptidazlar, karboksipeptidazlar, dipeptidazlar; görevleri peptitleri aminoasitlere parçalamaktır).
2. Lipazlar: trigliseritleri yağ asitlerine ve kısmen gliseritlere parçalarlar.

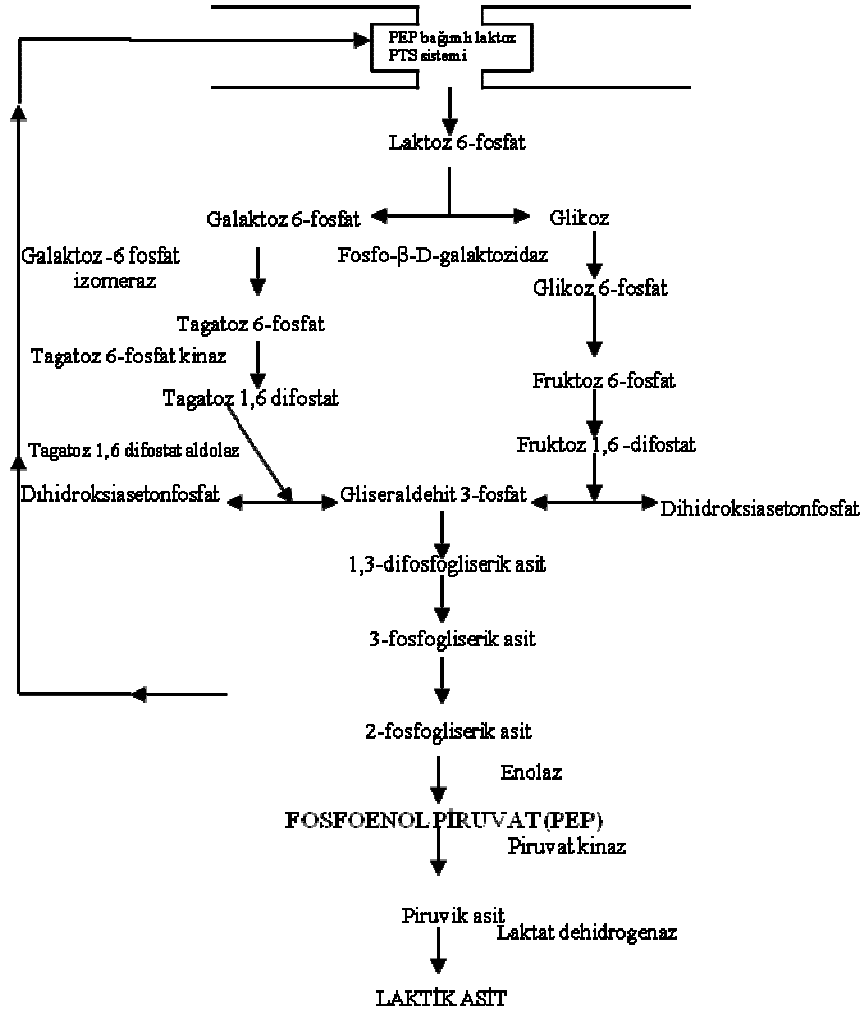
3. Aminoasitlere etki eden sistemler: dekarboksilazlar, deaminazlar, transaminazlar ve dimetiolazlar. Bunlar, ekzopeptidazlar tarafından salınan aminoasitleri dekompoze veya modifiye ederler.

4 Yağ asitlerine ve türevlerine etki eden sistemler (Dehidrogenazlar, dekarboksilazlar): Bunlar, β -ketonik asitler, metil ketonlar ve sekonder alkollerin oluşması için başlatma noktasıdır (39).

Laktoz Fermentasyonu

Laktokoklar süt şekeri laktozu fermente etme yeteneğindedir. Bu yolla hem gelişmeleri için gerekli enerjiyi, hem de hücrel sentezde zorunlu metabolitleri oluştururlar. Laktoz fermentasyonunun ana ürünü olan laktik asit ise, ürüne yapısal ve aromatik özelliklerini kazandırması yanında, patojenik veya bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı da koruyucu rol oynamaktadır (112). Laktoz fermentasyonu yeteneği stabil bir özellik değildir. Laktoz, sütte ve peynirde mevcut birçok mikroorganizma tarafından metabolize edilir. Süt endüstrisinde starter bakteriler olarak kullanılan mezofilik özelliğe sahip laktokok suşlarının fermentasyon süreçlerindeki en önemli rollerinden biri, süt şekeri laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır (85, 113). *L. lactis* alttür *lactis* suşlarının model sistem olarak seçildiği araştırmalarda, laktozun tutulması ve hücre içine transferinde PEP-PTS sisteminin daha yoğun olarak kullanıldığı saptanmıştır (114). PEP-PTS sisteminde laktoz hücre içerisine fosforile formda alınırken, permeaz sisteminin söz konusu olduğu reaksiyonlarda laktoz hücreye modifiye edilmeden alınmaktadır. Hücreye alınan laktozun daha ileri düzeyde parçalanmasında anahtar enzim, hücreye alınmada kullanılan sisteme bağlı olarak fosfo- β -galaktozidaz ya da β -galaktozidazdır. Laktokok hücreleri laktoz katabolizmasında tagatoz-6-fosfat, Leloir veya Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) yolunu kullanabilmektedir. Bu yollardan hangisinin kullanılacağı, laktoz transportunda aktif olan mekanizma tarafından belirlenmektedir. Laktokoklarda süt ortamlarında hızlı gelişen ve starter kültür olarak kullanılan suşlar genellikle fosfo- β -galaktozidaz aktivitesi yüksek ve dolayısı ile PEP-PTS sistemine sahip suşlardır (115,116). Bu starter bakterilerde laktoz metabolizması; ya laktoz permeaz sistemi ya da diğer gram pozitif bakterilerin çoğunluğunda bulunmayan, fosfoenol piruvata bağımlı fosfotransferaz sistemi (PEP-PTS) tarafından başlatılmaktadır. Bu sistemde laktoz, hücre içine fosforile formda alınmakta ve fosfo- β -galaktozidaz enzimi aktivitesi ile glikoz ve galaktoz 6-fosfata parçalanmaktadır. Bu aşamadan sonra glikoz Embden-

Mayerhof-Parnas (EMP), galaktoz 6-fosfat ise tagatoz 6-fosfat yolu ile katabolize edilmektedir (112, 115).



Şekil 4: Laktokok suşlarının laktoz metabolizması (112, 115).

Fosfotransferaz (PTS) sisteminin laktoz spesifik bileşenleri (EnzimII lac ve Faktör III lac), fosfo-β- galaktozidaz ve tagatoz-6-fosfat yolunun üç enziminin (galaktoz-6-fosfat izomeraz, tagatoz-6-fosfat kinaz ve tagatoz-1,6-difosfat aldolaz) gen kodunun, *L. lactis* suşlarında farklı plazmidler üzerinde bulunduğu saptanmıştır (114, 115, 116). *L. lactis* suşlarında laktoz metabolizmasını kontrol eden genlerin aktarımında rol oynayan en yaygın mekanizma konjugasyondur (117, 118, 119). Starter kültür suşlarında laktoz metabolizması özelliğinin plazmidler tarafından kodlanması, stabilite sorununu doğurmaktadır. Özellikle laktoz plazmidlerinin konakçı suşlarda düşük kopya sayısında

regüle edilmeleri, bu plazmidlerin eliminasyonu üzerinde etkili olmakta ve laktik asit fermentasyonu özelliğini kaybetmiş (Lac-) mutantların meydana gelme sıklığı artmaktadır (115, 116, 117, 120). Starter kültür suşlarının seçiminde bu mikroorganizmaların endüstriyel öneme sahip özelliklerinin stabil olması ve yüksek aktivite içermeleri esas alınmaktadır. Laktokok suşlarında, laktoz plazmidlerinin tanısı bu açıdan büyük önem taşımaktadır (121,122).

Starter mikroorganizmalar tarafından parçalanmış laktoz önce iki molekül monosakkarite, glikoz ve galaktoza ayrılır ve daha sonra da bu iki şeker glikolitik yol ile parçalanır. Bunlar arasında hegzosdifosfat ve pentozfosfat en önemli iki yoldur. Hegzosdifosfat glikolitik yolu piruvik asit oluşumuna yol açar. Homofermentatif LAB'nin kullandığı homolaktik yolda her bir molekül laktozdan 4 molekül laktik asit oluşmaktadır. Starterler arasında laktik streptokoklar ve laktobasillerin çoğu yer almaktadır. Pentozfosfat ya da heterolaktik yolda her bir molekül laktozdan 2 molekül laktik asit yanında CO₂, etanol ve asetik asit oluşmaktadır. Leukonostoklar ve heterofermentatif laktobasiller bu yolu takip etmektedir. Peynir üretiminde kullanılan laktik starter bakterileri daha çok homolaktik fermentasyon yaparlar. Hangi yol takip edilirse edilsin galaktoz yavaş, yavaş parçalanır ve peynirde biraz daha uzun süre kalır. Galaktozun metabolizması glikoz tarafından baskılanır. Oluşan laktik asit daha sonra peynirde bulunan maya ve küfler tarafından kreps siklusu ile CO₂ ve H₂O'ya dönüştürülür.

Bu işlemler esnasında laktat (laktik asidin tuzu veya esterine verilen ad) ana metabolik ürün olarak ortaya çıkar. Metabolik enerji; substrat düzeyinde fosforilasyonla üretilen ATP formunda elde edilir. ATP, biyosentez ve enerji gerektiren diğer metabolik işlemlerde bir enerji kaynağı olarak kullanılır. Laktoz fermentasyonunun son ürünü olan laktat, dış ortama salgılanmak zorundadır. Bu salgılanmaya membrana bağlı bir protein aracılık eder ve sitoplazmadan hücre dışı ortama protonların hareketiyle paralel gerçekleşir. Starter metabolizma; spesifik bileşikler (asetik asit, asetaldehit, aseton, asetoin, etanol, diasetil) gibi lezzete katkıda bulunan bir seri uçucu bileşiğin açığa çıkmasını sağlamakta üretmekte ve bu asit ortam güvenli gıda üretimine katkıda bulunurken, peynirin aromasına da katkıda bulunmaktadır. Bu ürünler karbonhidrat metabolizma ürünleridir, piruvat kullanımının alternatif basamağı tarafından oluşturulur. Bu yol, *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'in sitratı fermente etmesinde kullanılır (39, 123, 124).

Starter bakteriler, 6.6 olan normal pH'yı 30-37°C'de 6 saat içinde 5.3 ve altına düşürebildiği takdirde uygun bir izolat olarak kabul edilmektedir (125).

Herreros ve arkadaşları rastgele seçtikleri suşlar üzerinde yaptıkları çalışmada *L. lactis* alttür *lactis*'i asitleştirme özelliği bakımından en yüksek kapasiteli suşlar olarak tanımlamışlardır (126).

Proteolitik Aktivite ve Proteoliz

Proteinlerin hidrolizi, peynirin elastik (kauçuk) yapısının kırılabilir yapıya dönüşmesi için gereklidir. Peynirde yapı ve tekstür değişimleri başlıca α s1 kazeinin parçalanmasına dayandırılabilir. Çünkü proteinler diğer kazeinlerle yapısal bir "network" oluşturmak için güçlü interaksiyonlar oluşturur. Bu, α s1- kazein bağlarının bozulmasıyla zayıf düşer. Kazeinin parçalanması, olgunlaştırılan sert peynirlerde artan kırılabilirlik ile ilişkilendirilebilir. Çünkü parçalanmış peptid bağları suyu bağlayan yeni iyonik gruplarla karşılaşabilir ve peynir proteinlerini daha az çözünür hale getirir. Proteolizin daha sonraki safhalarında küçük peptitler ve aminoasitler üretilir. Bu peptitler ve aminoasitler peynir aromasının geliştirilmesinde, peynirin tamponlanmasında ve sekonder floranın gelişmesine ve beslenmesine yardımcı olur.

Kazeinin parçalanması için *L. lactis* alttür *lactis* birçok proteolitik enzimi ortama salgılamaktadır. *L. lactis* alttür *lactis* suşlarının intrasellüler aktivitesinden çok ekstrasellüler aktivite gösterdikleri bildirilmektedir. Kazeinin ilk parçalanma basamağı, ya ortama salgılanan enzim ile veya hücre membranına yapışık proteaz ile gerçekleşir. Membran proteaz β -kazeini C-terminalinden 5 ayrı peptite ayırmaktadır. Böylece ortamda hücrenin kolayca içeri alamayacağı büyük peptitler oluşur. Bu oligopeptitlerin daha ileri düzeyde parçalanması, farklı aktivite ve spesifisiteye sahip olan peptidazlarla sağlanır. Bu peptidazların kombine aktivitesi sonucu, hücre içerisine kolayca girebilecek peptitler ve aminoasitler oluşmaktadır. Hücre içine alınan peptitler, hücreye aminoasit kaynağı olacak şekilde hidrolize edilir. Bu amaç için hücre içinde yine birçok peptidaz bulunmaktadır. Proteinaz, eksternal peptidaz ve internal peptidazların ortak etkisi sonucu, kazeindeki hangi aminoasidin *L. lactis* alttür *lactis*'in gelişmesi için gerekli olduğu belirlenmektedir. Burada optimal gelişme için önemli olan ortamdaki aminoasit kompozisyonu değil, aminoasitlerin yeterli miktarda varlığıdır. Hatta ortamdaki bazı aminoasitler, diğer aminoasitlere dönüştürülmekte veya diğer metabolik faaliyetler için kullanılmaktadır. Ayrıca bazı aminoasitler de aroma bileşiklerine dönüştürülmektedir.

L. lactis alttür *cremoris* kompleks bir endopeptidaz sistemine sahiptir. Biri nötral biri de asidik olmak üzere iki proteaz enzimi hücre duvarına tutunmuştur, ayrıca iki tane de hücre içinde sıvı kısımda çözünür fraksiyonda bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda *L. lactis* alttür *cremoris*'te aminopeptidaz varlığı ortaya konmuş ve bu enzimlerin bazıları saflaştırılarak karakterize edilmiştir. *L. lactis* alttür *lactis* ve *L. lactis* alttür *cremoris*'in intrasellüler enzimleri süt proteinlerini şu sıraya göre hidrolize etmektedir; α -kazein, β -kazein, tam kazein, β -laktoglobulin, bovin serum albumin (39).

Teknolojik gelişimi sağlamak amacıyla LAB'ne ait suşların seçimi ve identifikasyonu yapılması, sütteki üreme kapasitelerine bağlıdır. *Lactococcus* suşlarının proteolitik aktivitelerinin yüksek olması sonucunda fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanımlarının yolu açılacaktır (127). LAB'nde proteolitik sistemde, hücreyi saran ve eşlik eden proteinaz yanında, özel peptitler ve aminoasit transport sistemleri yanında birçok sitoplazmik peptit de rol oynar (128).

Kazeinin indirgenmesinde ilk basamak PrtP (serin proteinaz) enzim aktivitesiyle şekillenir. Degredasyon basamağında, PrtP tarafından oluşturulan kazein peptitleri, muhtelif peptidazlar rol oynar. Ardışık nükleotid analizleri ile birlikte immunolojik çalışmalar göstermiştir ki bu enzimler intrasellüler olarak yerleşmiştir (129, 55, 39, 130).

Proteinlerin hidrolizasyon işlemi olan proteoliz, endopeptidazlar tarafından uzun peptidik zincirlerin parçalanması, karboksipeptidaz ve aminopeptidazlar tarafından da uç aminoasitlere ayrılması, daha sonra mikroflora, fizyokimyasal koşullar ve özellikle pH'ya bağlı olarak enzimatik yolla katabolizma ürünlerine dönüşümüyle oluşmaktadır (131).

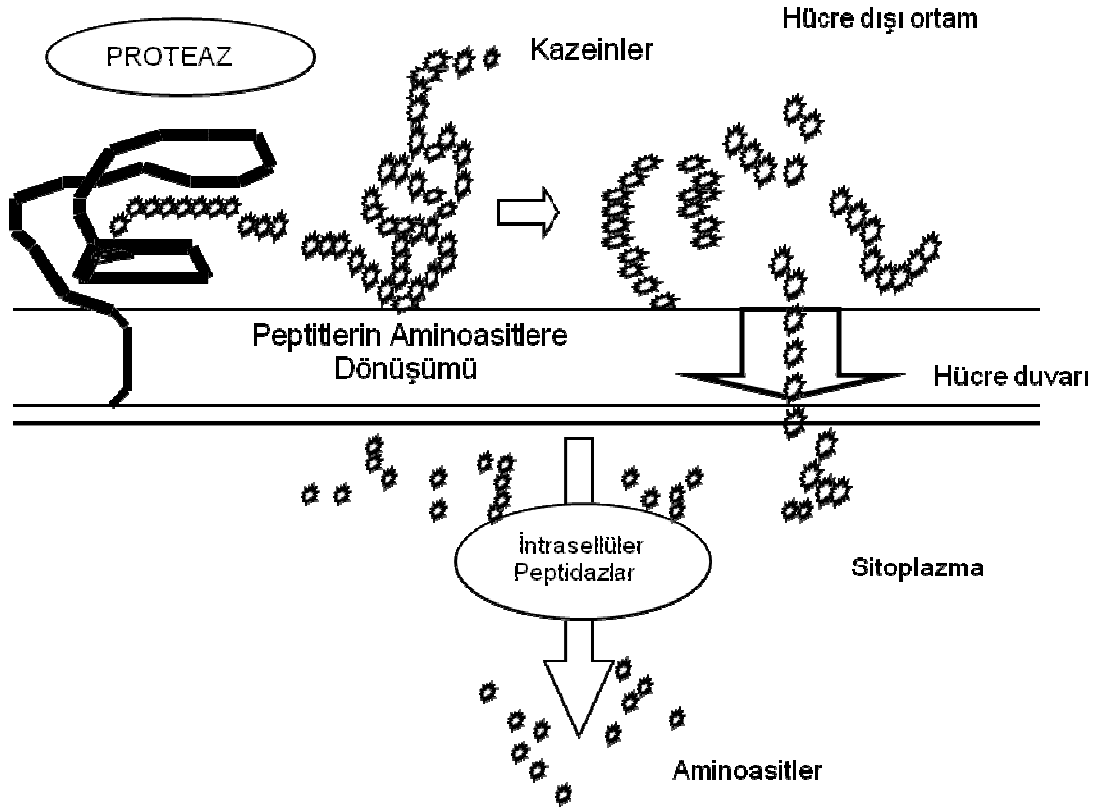
Laktokoklar sahip oldukları proteaz ve aminopeptidazlar sayesinde, süt proteinlerini birinci aşamada oligopeptitlere, ardından di-tri peptitlere ve sonrasında ise aminoasitlere ve daha alt birimlere parçalayarak ürünün olgunlaşmasını ve istenen aromanın şekillenmesini sağlarlar (103,132). Peynir pıhtısında bulunan kazeinler rennet ve sütte doğal olarak bulunan plazmin vasıtasıyla hidrolize edilerek peynir üretimi ve olgunlaşması sırasında büyük ve orta büyüklükteki peptitlere parçalanır. Bu peptitler starter LAB'nin peptidazları ile daha ileri seviyede parçalanarak küçük molekül ağırlığındaki peptitlere ve serbest aminoasitlere kadar parçalanmaktadır. Söz konusu bileşikler kısmen starter bakterilerin etkisiyle oluşur (133, 134). Pıhtıda bulunan ve sütün doğal yapısında yer alan enzimler de olgunlaşmanın göstergesi olarak değerlendirilen suda çözünen serbest azot miktarı ve proteoliz hakkında bilgi vermektedir (135).

Peynirde tat ve lezzet oluşumu peynirin olgunlaşması sırasında gelişen olaylara bağlıdır. Bu, oldukça kompleks bir süreçtir (106). Laktokoklar tarafından kazeinin

kullanımı, karmaşık bir proteolitik sistem sayesinde gerçekleşir (hücre zarına lokalize olan proteinazlar, çeşitli peptit transport sistemleri ve çok sayıda peptidin intrasellüler bölgeye lokalize olmasından ibaret olan kompleks bir sistemdir). Bununla birlikte laktokokların tüm tipleri kazeinden oligopeptitlerin oluşumunu sağlarlar. Proteinaz pozitif ve proteinaz negatif suşların karışık kültürleri peynir yapımında ve acılığın düşmesinde yaygın olarak kullanılırlar (136). Aminopeptidaz C (PepC) ve Aminopeptidaz PepN, PepX; *Lb. delbruecki*, *Lb. helveticus*, *L. lactis* ve *Str. thermophilus* suşlarında karakterize edilmiştir. PepA; *L. lactis* ve *Str. thermophilus* türlerinden izole edilmiştir. PepD; *Lb. helveticus*'ta, PepV; *Lb.* ve *L. lactis*'te, PepI; *Lb.* türlerinde, PepQ; *Lb.*, *L. lactis*'te, PepR, *Lb.* türlerinden izole edilmiştir (16).

Laktokoklar gelişmeleri için, doğal olarak sentezleyemedikleri ve sütte yeterli miktarda bulunmayan birçok aminoasite gereksinim duymaktadır. *L. lactis* suşları, içerdikleri proteinaz sistemleri ile sütteki proteinlerin yaklaşık % 70-80'ini oluşturan kazeini parçalayarak gelişmeleri için zorunlu ve gelişimlerini teşvik eden aminoasitleri oluştururlar. Ayrıca kazein parçalanma ürünlerinin peynirlerde tat ve aromanın gelişiminde de rol oynadığı saptanmıştır (137).

Sütte, α s₁, α s₂, β - ve K-kazein olmak üzere dört farklı tipte kazein bulunmaktadır. Laktokoklarda kazein metabolizmasının ilk aşamasında hücre duvarı yapısında bulunan proteinazlar (PrtP) görev almaktadır. Bu bakterilerde, kazein spesifitelerine göre P_I ve P_{III} olarak adlandırılan iki özel proteinaz aktivitesi tanımlanmıştır. P_I tip enzimlerin primer substratı β -kazeindir, ancak kazein de bu enzimler tarafından parçalanabilmektedir. P_{III} tip proteinazlar ise α s₁, β - ve K-kazeinleri parçalama yeteneğindedir. Her iki tip proteinaz da kazeinden oligopeptitler oluşturmakla birlikte, proteoliz ürünleri farklılık göstermektedir. Proteolitik aktivitenin ikinci aşamasında ise, oluşturulan peptitlerin hücre içine transportu gerçekleşmektedir. Laktokoklarda üç farklı transport sistemi belirlenmiştir (138). Ancak, kazeinin kullanımında, bu sistemlerden sadece oligopeptit transport sisteminin belirgin bir rol oynadığı saptanmıştır (139). Hücre içine alınan peptitler, son aşamada, peptidaz sistemleri tarafından serbest aminoasitlere kadar parçalanmaktadır (140). Kromozomal DNA kökenli proteolitik sistem içeren suşlar yanında, söz konusu özelliğin plazmidler tarafından kodlandığı değişik *L. lactis* suşlarında tanımlanmıştır (141, 142, 143). Detaylı analizler sonucu prtP ve prtM adı verilen genlerin proteolitik aktiviteden sorumlu olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen gen, 200 kDa büyüklüğünde, hücre duvarı ile ilişkili bir serin proteinaz kodlamaktadır (116).



Şekil 5: Laktokoklarda proteolizisin şematize edilmesi (139).

Peynir teknolojisinde, starter ve starter olmayan mikroorganizmaların proteolitik ve peptidolitik aktiviteleriyle ilişkili olan kazeinin parçalanması, peynir olgunlaşmasında önemli bir role sahiptir (144).

İzolöysin, löysin, valin, histidin ve metionin birçok *L. lactis* suşları için gerekli olan eksojen nitrojen kaynağıdır. Ancak, bu aminoasitlerin sütteki konsantrasyonları çok düşüktür. Özellikle izolöysin, löysin ve metionin (<1 mg/lt) seviyelerindedir. Kazein, nitrojenin ana kaynağı olarak karşımıza çıkar (*L. lactis*'in sütte üremesi sonucunda % 90 oranında kazeini nitrojenin ana kaynağı olarak kullanır) (145).

Cheddar ve Camembert peynirlerinde aroma profillerinin birbirine benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu bileşiklerin yarısının laktöz fermentasyonu ve sitrat kullanımı, çok küçük bir oranının lipolizis, diğer yarısının ise löysin ve metiyonin indirgenmesi sonucu oluştuğu belirlenmiştir (başlıca aroma bileşikleri; metiyonal, metanetiyoil ve onun oksidasyon ürünü dimetilsülfid (DMDS), dimetiltrisülfid (DMTS) ve löysin indirgenmesi sonucu oluşan izovalerik asit ve 3-metilbutanal'dir). Emmental peynirinde başlıca aroma bileşikleri, metiyonal ve 3-metilbutanal'dir. Bu peynirde tatlı karamel benzeri aromanın oluşumundan ise; furaneol ve homofuraneol sorumludur (146, 147).

Aminoasitlerin indirgenmesi aroma oluşumunda başlıca procestir. Bu aminoasitler; fenilalanin, tirozin, triptofan, dallı zincirli aminoasitler; löysin, izolöysin ve valin'dir. Bu aroma bileşikleri içinde başlıca prekürsör metionin'dir (148).

Lipolitik Etki

Peynir olgunlaşmasında rol oynayan starter bakterilerin yağların hidrolizinde de rol oynadıkları ve bunu sağlayan lipaz enzimlerinin hücre yüzeyine lokalize oldukları belirtilmektedir (149). Starter bakteriler, sütün yağını oldukça yavaş hidrolize ederler. Starter ve starter olmayan LAB tarafından salgılanan enzimlerin çok düşük konsantrasyonda uçucu serbest yağ asitleri ortaya çıkardıkları bildirilmektedir (5-10µg/g peynir) (150, 151). Mezofilik starter bakteriler mono ve digliseritleri hidrolize ettiği halde, trigliseritler üzerine çok düşük aktivite göstermektedirler. Bazı starterler, farklı peynirlerde farklı lipolize neden olmaktadır. Süt lipazı (lipoprotein lipaz) tarafından trigliseritlerin kısmi parçalanması ve ayrıca psikotrofların salgıladıkları lipazların trigliseritleri parçalaması, starter lipazlarına substrat olarak zemin hazırlamaktadır. *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'in aminoasitlerin oksidatif deaminizasyonu ile uçucu yağ asitleri ürettikleri bildirilmektedir. Termofilik starter bakteriler yeterli derecede lipolitik etkiye sahiptir (150).

Sitratın Parçalanması ve Oluşan Metabolitler

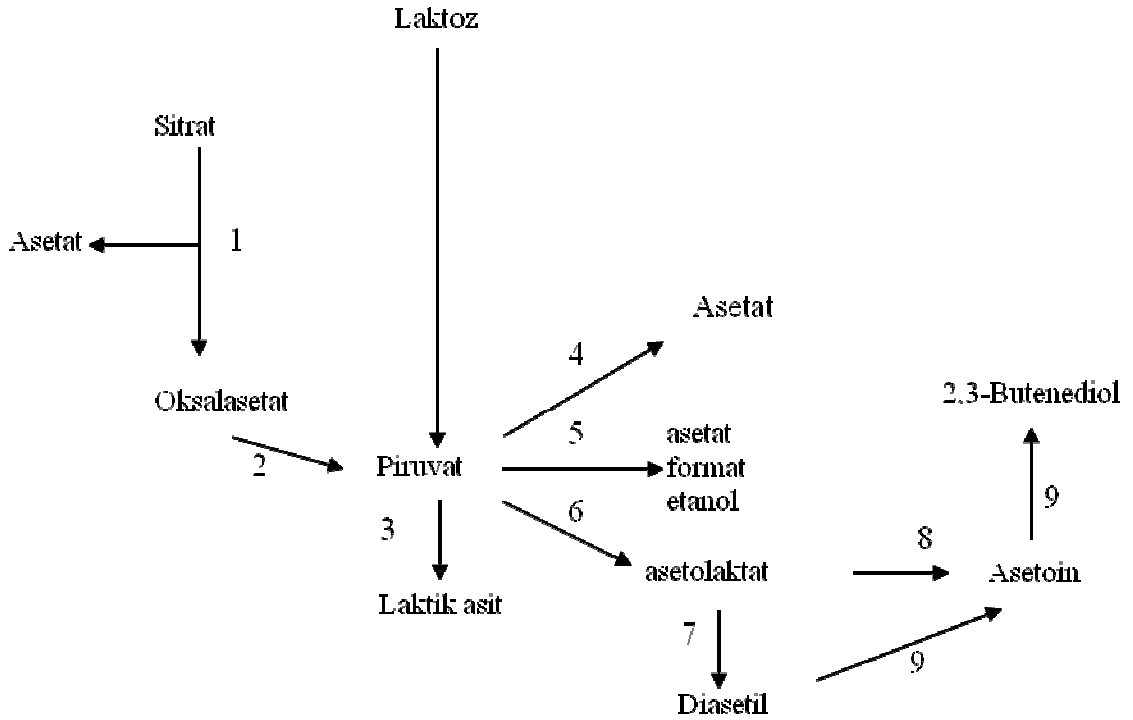
Sitrat, bakteriler için enerji kaynağıdır. Sitrat, tüm aerobik ve anaerobik koşullarda karbon olarak enerji kaynağı özelliği taşır. Aerobik koşullarda kullanımı, trikarboksilik asit siklusu yoluyla olur. Anaerobik koşullarda farklı bakteriyel fermentasyon yolları sitrat metabolizmasını içine alır. Sınırlı LAB, sitrat ve malat gibi karboksilik asitleri katabolize edebilir (152).

Diasetil; tereyağı, kültüre edilmiş krema ve quark gibi birçok fermente süt ürününde başlıca aroma ve tat bileşimidir. Diasetil, kimyasal bir ara ürün olan α -asetolaktat'ın oksidatif dekarboksilasyonu yolu ile meydana getirilmektedir. Sütte bulunan sitrat birçok LAB tarafından asetat, asetaldehit ve diasetil gibi lezzet bileşiklerine metabolize edilmektedir (153).

Süt fermentasyonlarında oluşan α -asetolaktat'ın çoğunluğu, LAB'nin sitratı fermente etmeleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Sitrat, LAB arasından *L. lactis* alttür *lactis*

biovar. *diacetylactis* ve bazı *Leuconostoc* türleri tarafından fermente edilebilmektedir (154). Yapılan çalışmalarda *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Leu. mesenteroides*'in benzer genetik yolla, sitratin piruvata dönüşümünde 3 aşamalı benzer yol izlendiğini göstermiştir (155). Oluşan diasetil miktarı ve stabilitesi; gelişme ortamı, sıcaklık, pH ve ortamda oksijen olup olmaması gibi koşullardan etkilenmektedir. Bu dış etkenlerin, fermentasyon ortamında kontrolü kolay olmadığından, starter kültürlerde diasetil üretme yeteneği yüksek suşların kullanımı esastır.

Sitratin metabolize edilmesi sonucunda diasetil ve CO₂ gibi bileşikler oluşmaktadır. *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'ten metalloproteaz ve dipeptidaz aktivitesi gösteren enzimler elde edilmiştir. *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'in proteolitik aktivite bakımından laktobasillere benzediği ifade edilmektedir. *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'ten elde edilen intrasellular endopeptidaz α s1 kazeini hidrolize ettiği halde, peyniraltı suyu proteinlerini hidrolize etmemektedir (39).



Şekil 6: Laktoz ve sitrattan diasetil oluşturulması (154).

Genetik araştırmalar sonucu, *L. lactis* alttür *lactis* biovar. *diacetylactis*'in tüm suşlarında sitrat permeaz aktivitesinin 8.0 kb büyüklüğünde bir plazmid tarafından kodlandığı saptanmıştır. Bazı suşlarda sitrat plazmidinin kendiliğinden kaybı yüksek

oranda meydana gelmektedir. Söz konusu plazmidin bakteriyel kromozoma entegrasyonu ile bu sorun aşılına çalışılmaktadır (122, 156).

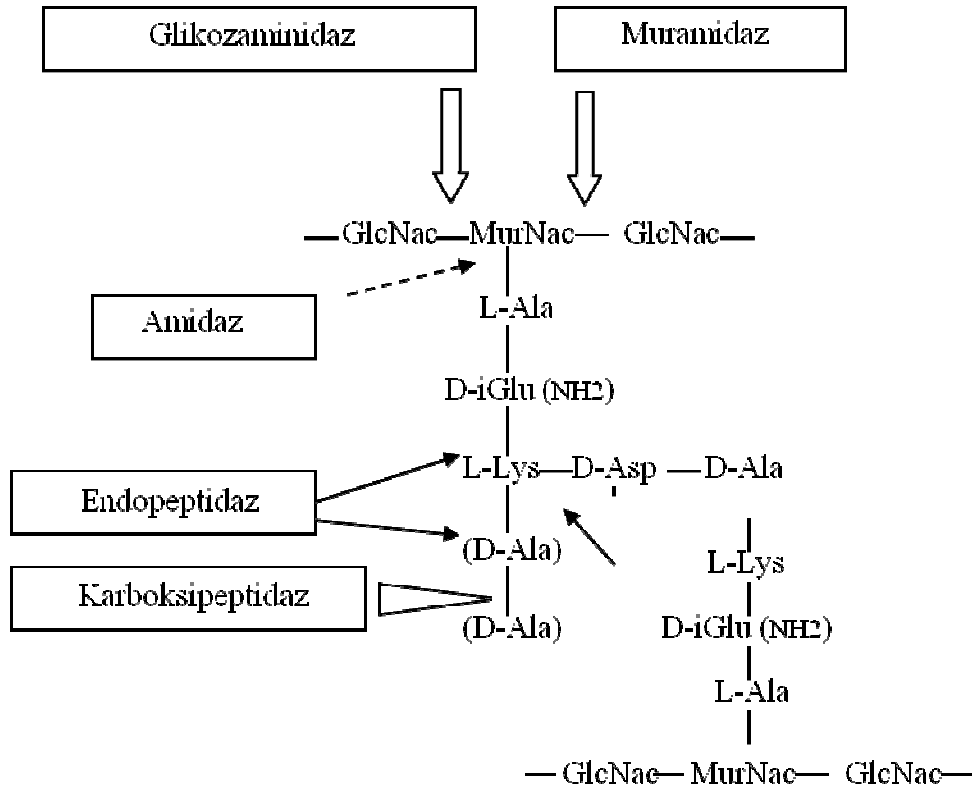
Bakteriyoliz ve Peynir Olgunlaşmasındaki Önemi

Bakteriyel otoliz; otolizin olarak adlandırılan endojen peptidoglikan hidrolazların (PGH) hücre duvarını enzimatik olarak yıkımlamasıdır (157). LAB lizisinin, aminoasitlerin aroma bileşiklerine dönüşümündeki etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (158).

Bakteriler, kendi hücre duvarlarını hidroliz edebilme yeteneğine sahip PGHs (peptidoglikan hidrolaz) üretirler ve bu sayede sahip oldukları koruyucu hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakası lize uğrar.

Gram pozitif bakterilerde, peptidoglikan hücre çevresinde güçlü 3 boyutlu bir ağ oluşturur. Bu yapı, glikan zincirleri (birbiri ardına sıralanan N-asetil muramik asit (Mur-Nac) ve N-asetil glikozamin (Glc-Nac) birlikte bir halka oluşturarak, kısa peptit zincirlerini teşkil ederler). Bu bağ, zincirsel yapı birbirinden ayrılabilir. Şekilde de görüldüğü gibi özdeş, benzer yapılar ve/veya farklı uygulamalar hücre duvarında birlikte görülebilir ve tümü PGHs'nin kompleks enzimatik yapısını oluştururlar.

Otolizinler (bakteriyolizinler) hücre bütünlüğü açısından tehlikelidir. Otolizinlerin aktivitesi ve işlevlerinin mutlaka kontrol altına alınması ve düzenlenmesi gereklidir. Peptidoglikan sentezinin durduğu ve/veya ara verildiğinde, hücresel lizis şekillenir ve kontrol edilemeyen aktivite ortaya çıkar. Birçok bakteride PGH aktivitesinin proteazlar tarafından düzenlenmesi konusu tartışılmaktadır. *L. lactis*, proteazlara eşlik eden hücre duvarını üretirler (PrtP, laktosepin olarak adlandırılır). Sütteki gelişimleri sırasında kazeinleri hidrolize eder. (159).



Şekil 7: *L. lactis*'te peptidoglikan yapısı ve peptidoglikan hidrolizinin özellikleri (157).

Bazı laktokokal hücreler peynirde lize olurlar ve starter olmayan laktik asit bakterilerinin, metabolize edilebilir karbonhidratların ilgili bakteriler tarafından metabolize edilmelerini sağlarlar (160).

L. lactis starterlerinin peynirde şekillenen lizisinin kontrolünde bir çok metod kullanılmaktadır (örneğin, doğal olarak yüksek otolitik özellikte suşların seçimi, lizizi teşvik eden genetik modifiye edilmiş suşların kullanımı ya da bakteriyosin üreten suşların starterde yer almasıyla veya eklenmesiyle dışardan lizinin başlatılması).

Lizis, otolizin veya faz endolizini gibi litik enzim karışımlarının aktiviteleri sonucunda şekillenen kompleks bir enzimatik prosestir. Tüm olaylar dinamik kompleks bir substrat olan hücre duvarındaki peptidoglikan üzerinde gerçekleşir. Çevresel koşullar ya da stres faktörleri lizisin gelişimini etkiler (karbon eksikliği, bakteriyosin üretimi, ısı işlem uygulaması, tuz vb.) (157). Lizisin teşvik edilmesi çevresel koşulların değişimiyle mümkün olabilir (ısı şoku, tuz konsantrasyonu, etanolün besi yerinde düşük miktarlarda tutulması). Örneğin, *L. lactis* alttür *cremoris* ısı şoku sonunda lize olmasıyla aminoasit üretiminde artış ortaya çıkmıştır (159).

Bakteriler, sahip oldukları hücre duvarını parçalayan, hücre duvarının yapısını bozan bir veya birden çok otolitik enzime sahiptir (161). Bu enzimler, sahip oldukları hidrolitik bağ, zincirlerin özelliklerine göre karakterize edilirler. Otolizinerler başlıca 4 tipe ayrılır,

1. N-asetilmuramidaz, N-asetilmuramik asidin salıverilmesini ve indirgenmesini sağlar.
2. N-asetilglikozaminidaz; N-asetilglikozamin'in salıverilmesini ve indirgenmesini sağlar.
3. N-asetilmuramyl-L-alanin amidaz; N-asetilmuramik asit ve L-alanin arasındaki bağı hidrolize eder.
4. Peptidaz; ana peptitleri ve köprü peptitleri hidrolize eder (162).

Lepeuple ve arkadaşları (163), *Lactococcus* kültürlerinde şekillenen erken lizisin, intrasellüler peptidazların salıverilmesine neden olduğunu ve bunun sonucunda da peynirde aktif hale geldiklerini teyit etmişlerdir. Serbest aminoasitlerin ve peptitlerin seviyesinin çok düşük olduğu ortamda *L. lactis*, aktif proteolitik sistemine bağlı olarak aminoasitlerin parçalanması ve salınması (süt proteinlerinden; α_1 -, β - ve k- kazeinler) gerçekleşir (164). Starterlerin otoliz oranı; peynirin olgunlaşması tat ve lezzet gelişiminin kontrolünde en önemli faktördür. Birçok starter enzimler peynirin olgunlaşmasına etki ederler. Örneğin, peptidaz, lipaz gibi enzimler aminoasitlerin indirgenmesini katalize ederler ve bu enzimler, hücre içine lokalize olmuşlardır. Bunların hepsi süte salınımlarından sonra fonksiyonel değildirler, hücre içi ko-faktörlere ihtiyaç gösterirler. Süt kazeininin başlangıçta laktokokal hücreyi saran proteinaz (laktosepin; EC 3.4.21.96) tarafından indirgenmesinden sonra, starterlerin otolizi sonucunda salınan bu enzimler genellikle faydalı sonuçların şekillenmesine neden olurlar (107, 165).

Pillidge ve arkadaşları (166), otolitik olmayan *L. lactis* alttür *cremoris* suşu (tip1- laktosepin içeren) kullanmışlar ve Cheddar peynirinde acı bir lezzet elde etmişlerdir. Bununla birlikte Cheddar peynirinde *L. lactis* alttür *cremoris* LW1484 otolitik suşu kullanıldığında (aynı tip laktosepin özelliklerini içeren) acı lezzetin oluşmadığını görmüşlerdir. Diğer taraftan yarı-sert otolitik starter olan *L. lactis* alttür *cremoris* RD251 suşundan yapılan Saint Paulin peynirinde total hücre içi peptidaz aktivitesinin düşük seviyede kalmasına bağlı olarak acı lezzetin değişmeden kaldığı tespit edilmiştir (132).

Genellikle starter otolizi faydalıdır. Ancak istenilmeyen sonuçlar da doğurabilir. Örneğin, otoliz olayı çok hızlı şekillenirse, yetersiz asit üretimi ve laktozun değişmeden

kalması gibi olumsuzluklar şekillenebilir. Pratikte; starter otolizin şekillenme derecesi ve dengeli şekilde oluşumu, Cheddar peynirinin olgunlaşmasında, tat ve lezzet gelişiminde son derece önemlidir (167). Genel olarak starter otolizin hesaplanmasında kullanılan genel metod, turbidimetrik tahlil yöntemi ya da intrasellüler marker enzimlerin ölçülmesidir (168).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki ticari *L. lactis* suşları içinde otolizisin şekillenmesi yönünden çok büyük farklılıklar vardır. Ticari starterlerdeki otolizisin şekillenmesindeki farklılıklara rağmen *L. lactis*'te otolizisi hücre ile ilgili faktörlerin ne derece etkilediği konusunda çok az çalışma vardır. Bu faktörler; hücre duvarının yapısal farklılıklarını ve otolizinleri içerir ve onlar peptidoglikan hidrolizine bağlı olarak şekillenen hücre duvarı bütünlüğünün bozulmasından sorumludur (166).

Şekil 7'de görüldüğü gibi; peptidoglikan üzerinde litik aktivite gösteren enzimlerin 5 tipi, Gram pozitif bakterilerde tanımlanmıştır. Bu şekil; *L. lactis*'te peptidoglikanın yapısını göstermektedir (5 ayrı şekilde peptidoglikanın indirgenme aşamalarını göstermektedir). Bunlardan sadece bir tanesi endo- β -N-asetilmuramidaz (AcmA) biyokimyasal olarak laktokokal suşlardan (*L. lactis* alttür *cremoris* AM2) izole edilmiştir. *L. lactis*'te başlıca otolizin AcmA'dır (166, 169, 170). Alternatif yaklaşımlarla doğal olarak bakteriyosin üreten *L. lactis* suşlarının süt üretiminde otolizisi etkilemesi amacıyla kullanımı yönünde çalışmalar yapılmıştır (171, 172). AcmA, *L. lactis*'te her zaman ana fonksiyon olarak, hücrenin parçalanmasında, peptidoglikanın indirgenmesi aşamasında rol oynar. Starter laktosepin aktivitesi, AcmA aktivitesini etkileyen bir faktördür. Yapılan çalışmalarda diğer laktosepin türleri içinde sadece laktosepin tipI, AcmA'yı indirgemıştır. *L. lactis* starterlerine ait suşlarda; diğer otolitik enzimler veya hücre bağlantılı faktörler, otoliz üzerinde AcmA'nın tek başına etkisinden çok daha kuvvetli bir etkiye sahiptir (166).

Ayrıca, AcmB, AcmC, AcmD'nin de ticari starter suşlar üzerindeki etkileri üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır. *L. lactis* ve *cremoris* alttürlerinde yapılan çalışmalarda hücre duvarının yapısının değiştirilmesinin otolizin şekillenmesi üzerinde ne derece etkili olduğu yönünde çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca, peptidoglikan içeriğinde yapılan değişiklikler, üreme periyodunda değişikliklere neden olmuştur. Genel olarak yapılan çalışmalarda *L. lactis* alttür *lactis* starterlerinin *L. lactis* alttür *cremoris* starterlerine göre daha fazla otolitik özellikte olduğu gösterilmiştir (167).

Bakterilerde otolitik sistem, bir veya birden fazla endojen peptidoglikan hidrolizini içerir ve sonuçta hücrenin otolizi şekillenir (173).

Hücre duvarındaki peptidoglikanın endojen peptidoglikan hidrolazlar tarafından enzimatik yıkılması sonucunda bakteriyel otoliz olayı gerçekleşir. Bakteriyel PGHs çok farklı hücre fonksiyonlarına sahiptir. Peptidoglikan ağ sisteminin modifikasyonunda, hücrenin gelişim ve bölünme aşamasında rol oynamaktadır (174).

Otoliz birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteride gözlemlenmiştir (175). Genel koşullar altında peptidoglikan sentezinde kesilme, durma gibi fasılalar şekillenir (mikroorganizmanın besin kaynaklarının azalması, elverişsiz çevre koşulları vb). Bu koşullar altında hücrenin yapısal bütünlüğü açısından gerekli olan peptidoglikanın hidrolizisi sonucunda hücresel lizis şekillenip hücre içeriği dışarı salınır.

Süt ürünlerinin fermentasyonunda, LAB'nin otolitik özellikleri, starter kültür olarak kullanım amaçlarından biridir. Peynirin olgunlaşmasının kontrolünün sağlanmasında starter LAB'nin lizisinin artması ve kontrolünün sağlanması oldukça önemlidir. Gerçekten de LAB starterleri intrasellüler enzim üretirler (peptidaz, lipaz ve aminoasit katabolizmasında rol oynayan enzimler). Bu enzimler olgunlaşma sırasında şekillenen tat ve lezzetin gelişiminde çok önemli rol oynarlar. Başlangıçta kazeinin rennetten çökmesinden sonra, sütteki endojen proteazlar ve bakteri hücre duvarına ait proteazlardan oluşan peptidazlar, peptitlerin aminoasitlere indirgenmesini sağlarlar (139). Serbest aminoasitler, sonradan birçok enzimatik yolla aroma bileşiklerine katabolize edilirler (148).

Ayrıca süt yağında bulunan serbest aminoasitleri; esteraz ve lipaz süt yağında bulunan trigliseritlerin hidrolizisini katabolize eder ve sonuçta aroma bileşikleri oluşur. Normal koşullarda alkoller ve gliseritlerden esterleri sentez edebilirler (176).

Hücresel lizis sonucu bakteriyel intrasellüler enzimler salınır ve bu enzimler peynirdeki zengin substratlara ulaşır. Laktokokların lizisi, çok net olmayan şekilde Saint-Paulin peynirinde ve Cheddar peynirinde gösterilmiştir (177, 178). Laktatdehidrojenaz (LDH), glikoz fosfat dehidrojenaz, früktoz 1,6-bifosfat aldolaz (FBP), X-prolil-dipeptidil-aminopeptidaz (PEPX), Lizil-aminopeptidaz ve dipeptidaz gibi birçok sitoplazmik enzimler, lizis markırı olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (179,180). Starter kültürlerde lizis şekillenmesiyle, proteolizis şekillenmesi artmaya başlar (bir kısım serbest aminoasitlerin miktarı olgunlaşma periyodunun sonunda artmaya başlar, acılık azalır ve peynirde istenen tat ve lezzet oluşur (163,181). Peynirin lezzeti üzerine etkili bileşiklerin önemli bir bölümü starter bakterilerin etkileriyle oluşmaktadır. Starter bakterilerin erken lizisi, hücre içi enzimlerin substratlara daha kolay ulaşmasını sağlamak ve bu durum peynir lezzetinin gelişimini hızlandırabilmektedir (180,182,133).

Laktokokların Diğer Önemli Özellikleri

Bakteriyosin Üretimi

LAB, ortamda bulunan diğer mikroorganizmaları inhibe ederek mikrobiyal açıdan güvenilir fermente gıdaların üretilmesine olanak tanımaktadır. LAB'nin geliştikleri ortamda diğer mikroorganizmaları inhibe edici özellikleri bu bakterilerin ortamda gelişmesi sonucu ürettikleri bazı antimikrobiyal maddelerden ve oluşan koşullardan kaynaklanmaktadır. Bunlar; düşük pH, organik asitler, bakteriyosinler, hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil, etanol, düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyelidir (29,183,184).

Bakteriyosinlerin üretim mekanizmaları, aminoasit dizilişleri, etki mekanizmalarını kodlayan genlerin DNA dizilimleri belirlenmiş ve genel olarak birçok ortak özelliklere sahip oldukları saptanmıştır. Bakteriyosinlerin daha çok plazmid kökenli oldukları ifade edilmesine rağmen, bir kısım bakteriyosinlerin kromozomal olduğu da ifade edilmektedir. Genel olarak bakteriyosinlerin üretimlerindeki temel prosesler aynıdır. Polipeptid dizisi kodlandıktan sonra öncü protein olarak ayrılıp bir moleküler sinyalizasyona uğrayıp, çeşitli modifikasyonların ardından sistein sayısına göre son şeklini kazanmakta, daha sonra "sec-dependent" gönderme mekanizması yardımıyla hücre dışına salgılanmaktadır (185).

Bakteriyosinler, bazı bakteriler tarafından üretilen protein ya da polipeptid yapısında genellikle üretici bakteriye yakın akraba türleri ya da tür içi suşları inhibe eden makromoleküllerdir. Bunlar doğal antibiyotikler olarak değerlendirilmekle birlikte, klasik antibiyotiklerden farklı olarak mide ve bağırsaktan geçerken proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanmaktadır. Bu nedenle vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak florasına ulaşmazlar (186,187,188).

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan LAB de değişik bakteriyosinler üretmektedir. Bu bakterilere ait bakteriyosinler veya bakteriyosin üreten suşlar, bozulma etmeni veya patojen bakterilerin gelişimlerini engelleme kapasitelerinden dolayı, son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca bakteriyosin üretimi ve bağışıklığına ait genetik determinantlar, genetik marker olarak büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir (189). Diplokoksın, genetik determinantları konjugatif bir plazmid üzerinde (81 kb) tanımlanan ilk laktokokal bakteriyosindir.

Gıda muhafazası açısından *L. lactis* tarafından üretilen nisin dikkat çekmektedir. Bazı kremoris suşları hücrelerle ilgili olan diplokoksın antibiyotiğini oluşturmaktadır. Bu

antibiyotik benzeri madde *Escherichia (E.) coli* üzerine inhibitör etki göstermezken, *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi değişkendir. Bazı diasetilaktis suşları da kremoris suşlarınıninkine benzer antibakteriyel bir madde üretmektedir.

LAB'nde en iyi tanımlanmış ve en yaygın kullanım alanına sahip bakteriyosin, bazı *L. lactis* alttür *lactis* suşları tarafından üretilen nisindir. Nisin, aralarında *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* (*Staph.*), *Clostridium* (*Cl.*) ve *Listeria* (*Lis.*) suşlarının da dahil olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriyosindir (187,190). Diğer laktokok bakteriyosinleri olan diplokoksin ve laktokoksin A, B, M ve G, *L. lactis* alttür *cremoris* suşları tarafından, laktokoksin 140 ve 972, laktisin 481 ve laktisin 3147 ise *L. lactis* alttür *lactis* suşları tarafından üretilmektedir (191,192). Diplokoksinler ve laktokoksinler sadece bazı laktokok suşları üzerinde inhibisyon etkisi gösterebilmektedir. Laktisinler ise, tür içi ve türler arası antibakteriyel aktiviteye sahip bulunmuştur. Laktisin 3147, nisin ile benzer bir şekilde, geniş bir etki spektrumu içermektedir. *L. lactis* suşlarında bakteriyosin üretimi ve bağışıklık genleri genelde plazmidler üzerinde bulunmaktadır. Bu güne kadar genetik analize tabi tutulan tüm nisin üreticisi *L. lactis* suşlarında, söz konusu özelliğin kromozomal DNA kökenli olduğu belirlenmiştir (192).

Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması ve Laktokoklarca Üretilen Bakteriyosinler

Bakteriyosinlerin tanımlanmasına yönelik ilk çalışma 1925 yılında *E. coli* tarafından sentezlenen *colicin*'in tespit edilmesiyle başlamıştır. Bakteriyosinlerin aynı ya da farklı bakteri grupları tarafında sentezlenen yüzden fazla çeşidi bulunmaktadır. *E. coli* suşlarının yanısıra *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi birçok mikroorganizma bakteriyosin üretmektedir (193). Ancak, daha çok gıdalarda güvenli olduğu düşünölen LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde araştırma yapılmakta ve gıdalarda bu bakteriyosinler kullanılabilir. Bu nedenle LAB ve özellikle *Lactobacillus*, *Lactococcus* tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde önemle durulmaktadır.

LAB'nin sentezlediği bakteriyosinler birbirinden farklı özellikte olup, etki spektrumları, biyokimyasal özellikleri ve genetik determinantları farklılık göstermektedir. Genellikle düşük moleköl ağırlığına (3-10 kDa) sahip olup hidrofilik ve hidrofobik kısımları bulunmaktadır. pH aralıkları geniş, izoelektrik noktaları yüksektir (194,195). Nisin ve pediosin AcH asidik koşullarda yüksek sıcaklığa daha dayanıklı olup, nisin

otoklavlandıktan sonra pH 5'te aktivitesinin % 40'ını, pH 6.8'de ise % 90'ını kaybetmektedir (196). LAB'nin ürettiği bakteriyosinlerin çoğu katyonik, hidrofobik veya amfilik moleküller olup, 20-60 aminoasit rezidüsü içerir (193). Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılmakla birlikte daha çok Klaenhammer'in özellikle gram(+) bakterileri dikkate alarak yaptığı sınıflandırma kullanılmaktadır (197). Biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada, bakteriyosinler molekül büyüklüğü, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelere göre genel olarak 4 sınıfa ayrılmışlardır. Ancak, biyokimyasal tanımlanması bakımından daha çok ilk 3 sınıf dikkate alınmaktadır (193). Sınıf 1, lantibiyotikler [ender rastlanan aminoasitleri (lantiyonin ve türevleri) içeren peptitler]; sınıf 2, düşük molekül ağırlığına sahip (<10 kDa), ısıya dayanıklı, lantiyonin içermeyen membran aktif peptitler; sınıf 3, yüksek molekül ağırlığına sahip (>30 kDa), ısıya hassas proteinler; sınıf 4 ise proteine ilaveten zorunlu lipid veya karbonhidrat grupları içeren kompleks bakteriyosinler.

Nisin

Nisin aktivitesi üzerine değişik proteolitik enzimlerin etkisi incelenmiştir. Buna göre nisin α -kimotripsin enzimi tarafından inaktive edildiği, pepsin, tripsin, proteinaz K enzimlerinin ise nisine etki etmediği saptanmıştır (198, 199, 200).

Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Nisin, lantibiyotik sınıfının en iyi bilinen üyesi olup, *L. lactis* tarafından üretilen ve ribozomlarda dönüştürülen bakteriyosindir. Nisin ilk olarak Rogers tarafından 1928 yılında bulunmuştur. 1944 yılında bu madde için nisin ismi kullanılmış ve 1950'li yıllarda üretimine ticari olarak başlanmıştır. O zamandan bu yana nisin, gıda sektöründe güvenle kullanılan koruyucu gıda katkı maddeleri arasında yerini almıştır (201,202). Nisin (E234), ilk olarak günümüzden yaklaşık 30 yıl önce İngiltere'de gıda katkı maddesi olarak kabul edilmiş ve daha sonra Avrupa'da 50 ülkede, Amerika ve Çin'de kullanılmaya başlanmıştır (203). Molekül ağırlığı 3354.25 Da'dır ve yapısında 34 adet aminoasit bulunmaktadır. Bu aminoasitlerden 8 tanesi kükürt içerir ve en önemlisi lantiyonin ve 3-metil lantiyonin'dir. Zira, lantibiyotik terimi içerdiği bu aminoasitten türetilmiştir. Ayrıca dehidroalanin ve dehidrobutirin gibi diğer aminoasit kalıntılarını içermektedir. Nisin, yapısındaki 27. aminoasidin türüne göre ikiye ayrılır. Eğer 27. aminoasit aspartik asit ise Nisin A, histidin ise Nisin Z olarak adlandırılır (203, 202). Aktif nisin molekülü, öncü nisin polipeptid

molekülündeki sıradan aminoasitlerin (serin, treonin, sistein) posttranslasyonel modifikasyonu ile oluşmaktadır (204).

Düşük pH daki çözeltilerde kolay çözülür ve stabildir; pH 4 ve üzerindeki çözeltilerde dekompoze olur. Isıya karşı dirençsizdir. Pankreatin, tripsin, tükürük enzimlerine ve rennet hariç sindirim enzimlerine karşı duyarlıdır (205, 206).

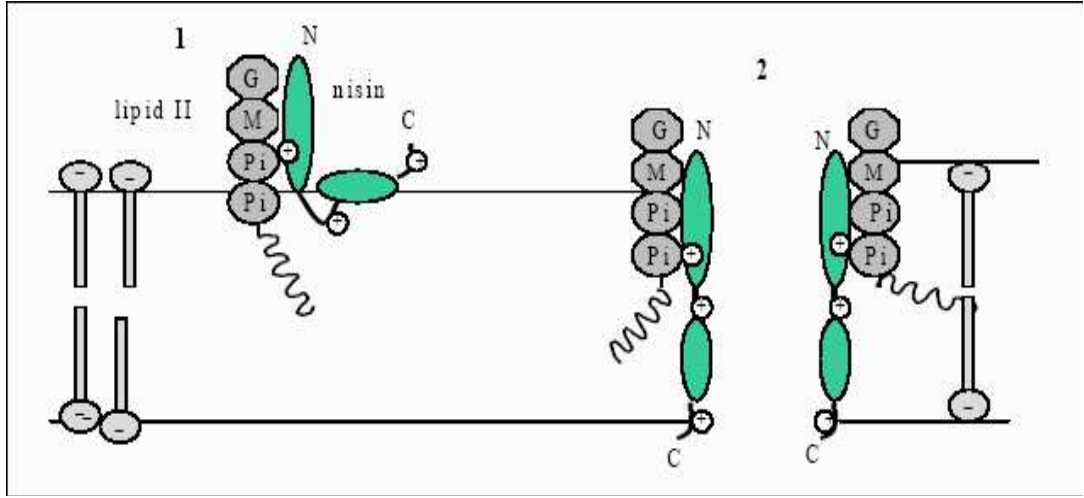
İnsanlar dahil tüm memeliler için toksik etkisi bulunmayan nisin, Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi tarafından “GRAS” (Generally Recognized as Safe- Genel Olarak Güvenli Kabul Edilebilir Ürün) statüsünde kabul edilmiş ve ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriosindir (207, 208).

Etki Mekanizması

Nisin bakterisidal etkisini, duyarlı hücrelerin membranlarını etkileyerek (yüzey aktif deterjan gibi davranarak), bakterilerin sitoplazmik membranı ile etkileşime girerek gösterir. Nisin molekülünün pozitif yüklü N- ve C-terminal uçları ile hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfolipidler reaksiyona girerek, membran fonksiyonlarını porlar oluşturmak suretiyle bozar. Oluşturduğu bu porlardan hücre içinde bulunan çeşitli aminoasitlerin, ATP'nin ve monovalent katyonların hızlı bir şekilde dışarı çıkmasına, bundan başka hücrelerde membran potansiyelinin hızlı bir şekilde azalmasına ve hücre lipozomlarında pH değerinin düşmesine neden olur (197, 209, 210, 211).

Bununla birlikte, iyonların, özellikle de ATP kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan K^+ iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır (212). Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi olan makromoleküllerin degradasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan sentezi gibi biyolojik proseslerin inhibisyonuna yol açmaktadır (194,213). Laktik asit bakteriyosinleri pozitif yüklü moleküller olup, sitoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunmaktadır (214,215). Böylece hidrofobik kısım zar yapısının içine girerek gözenek oluşumuna yol açmaktadır. Ancak, bakteriyosinler bütün duyarlı türler üzerinde aynı etkiye sahip olmayıp, ortam pH'sı ve kritik inhibisyon konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenirler (216). Nisin gibi bakteriyosinlerin bir çoğu hücre zarını etkilerken spesifik reseptörlere bağlanma ihtiyacı

duymadıklarından, farklı birçok bakteri türünü inhibe edebilme yeteneğine sahiptirler (193).



Şekil 8: Nisinin Lipid II molekülüne bağlanarak hücre membranında por oluşturması (217).

Nisinin bir diğer por oluşturma mekanizması ise lipozomal membranların fosfolipid kompozisyonuna bağlıdır. Son çalışmalar ışığında nisinin, fosfolipid komponentlerinden, hücre duvarı sentezinde bir prekursor olan Lipid II molekülüne bağlanarak etkisini gösterdiği belirlenmiştir. Nisin fosfatidilgliserol lipozomlarının anyonik yüzeyleriyle birleşerek ve fosfolipid gruplarında bulunan lipidlere olumsuz yönde etkiliyerek aktivitesini gösterir (217).

Nisinin sporlara olan etkisi bakterisidal etkiden çok bakteriyostatik etkidir. Diğer koruyuculardan farklı olarak nisin, sporların vejetatif forma dönüşüm aşamasında etkili olmaktadır. Nisinin çimlenen sporların membranlarındaki proteinin yapısında bulunan sülfidril gruplarına bağlanarak etki gösterdiği belirtilmiştir (218).

Nisin çok geniş bir yelpazede gram pozitif bakterilere, özellikle de çok önemli bir gıda patojeni olan *Lis. monocytogenes* ve diğer bazı *Listeria* türlerine oldukça etkilidir (219, 220, 221). Ayrıca, *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin sporlarına karşı bakterisidal ve antimikrobiyal etkiye sahiptir. Nisin, duyarlı hücrelerin spor oluşumunu önlerken, oluşmuş sporlara yapısında bulunan bir veya daha çok dehidro rezidülerinin, spor membranında bulunan sülfidril gruplarına kovalent şekilde bağlanmasıyla etki eder (203).

Yapılan çeşitli araştırmalara göre nisinin sitratlar, etilen diaminotetraasetik asit gibi şelat ajanlarıyla ayrıca, sodyum laktat, lizozim, EDTA, NaCl gibi maddelerle kombine

edilmesinin, *Salmonella* türleri ve *E. coli* gibi önemli diğer gıda patojenlerini de inhibe ettiğini ortaya konulmuştur (201, 222, 223).

Bakteriyosinlerin Gıdalarda Kullanımı

Yapılan araştırmalar sonucunda nisinin insanlar için tamamen güvenli bir katkı maddesi olduğu anlaşılmıştır. Nisin, vücuda alındıktan sonra sindirim enzimleri tarafından inaktif hale getirilmektedir. Nisinin toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar ışığında, yüksek miktarlarda nisin kullanımının toksik etki göstermediği belirlenmiştir (201,206). Nisin ilk olarak peynirlerde koruyucu olarak kullanılmış, ancak son yıllarda sadece peynirlerle sınırlı kalmayıp diğer süt ürünleri, et, kanatlı ve deniz ürünleri gibi çeşitli gıdalarda ayrıca, şarap ve bira sanayinde koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır (202, 207, 208).

Gıdalarda bakteriyosinlerden farklı şekillerde yararlanılmaktadır. Doğrudan gıda maddesine katılabildikleri gibi, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokülasyonu veya gıdanın koruyucu ambalaj materyali ile birlikte de kullanılabilirler. Bu amaçlarla koruyucu kültür olarak LAB, bakteriyosin olarak ise, yasal kullanımına izin verilen nisin kullanılmaktadır. Nisinin etki spektrumu diğer birçok bakteriyosine kıyasla daha geniş olup, asidik gıdalarda ve Gram (+) mikroorganizmalar üzerinde oldukça aktiftirler. Nisin, koruyucu katkı maddesi olarak günümüzde 47 ülke tarafından güvenli gıda koruyucusu olarak kabul edilerek kullanılmaktadır. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) yetişkinler için günlük kabul edilebilir nisin miktarını 2.9 mg olarak belirlemiştir (205).

1988 yılından beri FDA tarafından pastörize işlem görmüş peynirlerde *Cl. botulinum* sporlarının gelişmesini ve toksin oluşumunu önlemek amacıyla GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak kullanımına izin verilmiştir (187). Avrupa Birliği ülkelerinde ise irmik ve tapioka pudingler, olgunlaştırılmış ve işlem görmüş peynirler ile ekşitilmiş kremada nisin (E 234) kullanımına izin verilmektedir (41).

Martinez ve arkadaşları, keçi sütünden üretilen peynirde *Lb. curvatus* tarafından üretilen bakteriyosinin, *L. lactis* alttür *lactis* ve *Lb. casei* alttür *casei*'nin otolizinde ne derece litik etki gösterdiği üzerinde bir araştırma yapmışlar ve çıkan sonuçlara göre bakteriyosin üreten kültürlerin erken hücre lizisi amacıyla kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (224).

Bakteriyosin üreten laktik kültürlerin kullanımı, ortamda bulunan proteolitik, lipolitik bakterilerin lizisine sebep olmakta ve proteolizisin daha hızlı bir şekilde

oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Bu amaçla *Ent. faecalis* ve *L. lactis* alttür *lactis*'in kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (225).

Bilindiği gibi gıda güvenliği açısından, patojen mikroorganizmaların gıdalarda gelişiminin önlenmesi gerekmektedir. Gıdalarda gelişen patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik mikroorganizmaların ve bakteriyosin gibi metabolik ürünlerinin etkili olması nedeniyle, gıda güvenliğinde bakteriyosin kullanımının önemi oldukça artmıştır. Bakteriyosinlerin gıdalarda antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, doğal olmaları, renksiz, tatsız ve kokusuz olmaları da ürün özellikleri açısından oldukça önemlidir. Peptid veya protein yapılarında olmaları ise pankreas kaynaklı proteolitik enzimlerden, mide salgılarından etkilenebildiklerini ve insan vücudunda sindirilebileceklerini göstermektedir. Ayrıca bazı bakteriyosinlerin (Grup II) ısı stabilitelerinin olması, yüksek sıcaklıkta işlem gören birçok gıda maddesinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır (194, 226). Hatta bazı bakteriyosinler otoklavlama sıcaklığında bile stabil kalabilmektedir. Dolayısıyla bakteriyosinlerin et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır.

Nisin et ve et ürünlerinde birçok mikroorganizma üzerinde etkilidir. Bununla birlikte, en önemli özelliklerinden birisi, hastalık ve ölümlere yol açabilen *Lis. monocytogenes*'i inhibe edebilmesidir (219). Yine nisin, et ve et ürünlerinde oldukça tehlikeli bir patojen olan *Cl. botulinum* üzerinde etkilidir. Nisin, antimikrobiyal olarak nitrit için belli düzeylerde alternatif oluşturabilmektedir. Ayrıca nisinin *Brochothrix* (*Br.*) *thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* ve *Lis. innocua* üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, karkas yüzeyine spreyleneceği, bu mikroorganizmaların sayısını önemli düzeyde azaltmaktadır. *Br. thermosphacta* üzerinde etkili nisin seviyesinin 400 IU/ml olduğu da bildirilmektedir (227).

Tablo 8: Bazı bakteriyosinlerin kullanıldığı gıdalar ve etkileri (216).

Bakteriyosin	Uygulanan gıda	Etkileri
Nisin A	Yeniden şekillendirilen et ürünleri (formed meat products)	Bakteriyel inaktivasyon
Nisin A	Ricotta peynirinde <i>Lis. monocytogenes</i> 'in kontrolü için kullanılmıştır	<i>Lis. monocytogenes</i> 'i 8 hafta etkili bir şekilde inhibe etmiştir
Pediocin AcH	Pediocin AcH sentezleyen <i>L. plantarum</i> WHE 92, olgunlaşmanın başlangıcında Munstar peynirinin yüzeyine spreyleneştir	<i>Lis. monocytogenes</i> 'in gelişimini engellemiştir
Enterocin 4	Enterocin sentezleyen <i>E. faecalis</i> INIA4, Manchego peyniri üretiminde kullanılmıştır	<i>Lis. monocytogenes</i> Ohio 'yu inhibe ederken, <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A 'yı inhibe etmemiştir
Linocin M-18	<i>B. lines</i> kırmızı peynir üretiminde starter olarak kullanılmıştır	<i>Lis. ivanovi</i> ve <i>Lis. monocytogenes</i> 'te 2 log düşüşe neden olmuştur
Piscicolin 126	Jambonda <i>Lis. monocytogenes</i> kontrolü için kullanılmıştır	Ticari bakteriyosinlerden daha etkili bulunmuştur
Leucocin A	<i>L. gelidium UAL187</i> vakum paketlenmiş sığır etinde bozulma kontrolü için kullanılmıştır	<i>Lb. sakei</i> 'nin de etkisiyle bozulma 8 haftaya kadar geciktirilmiştir.
Lactocin 705	Kıyılmış sığır etinde <i>Lis. monocytogenes</i> ' in gelişimini önlemek için kullanılmıştır	<i>Lis. monocytogenes</i> ' in kıyılmış etlerde gelişimini önlemiştir.
Pediocin AcH	Tavuk eti sosisinde <i>Lis. monocytogenes</i> 'i inhibe etmek için pediosin üreten <i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) kullanılmıştır	Etkili bir şekilde <i>Lis. monocytogenes</i> sayısını azaltmıştır.
Pediocin	Şarap ve fırıncılık ürünlerinde kullanım potansiyeli araştırılmıştır	Bu tür ürünlerde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir
Pediocin AcH	Tavuk etine pediosin preparatı ilave edilmiştir	5 °C'de 28 gün <i>Lis. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir
Pediocin PA-1	Fermente sosiste starter olarak <i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) kullanılmıştır	<i>Lis. monocytogenes</i> 'i etkili bir şekilde kontrol etmiştir.
Enterocin	Jambon, domuz eti, tavuk göğüs eti, pate ve sosis'te kullanılmıştır	Çeşitli şartlar altında <i>Lis. monocytogenes</i> gelişimini kontrol etmiştir.

Tüketici ve halk sağlığını ciddi şekilde tehdit eden *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Salmonella* türleri, *Lis. monocytogenes* ve *Cl. perfringens* gibi önemli gıda patojenlerini elemine etmek için, günümüzde çeşitli antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. Gıdalara nitrat, nitrit, sorbat gibi antimikrobiyal maddelerin izin verilen dozların üzerinde katılmasının, insan sağlığı üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler, bu gibi maddelerin gıdalarda serbestçe kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle, Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi tarafından "GRAS" statüsünde kabul edilen ve yapılan araştırmalar sonucunda insanlar için tamamen güvenli olduğu tespit edilen nisin, özellikle çeşitli maddelerle kombine edildiğinde, antimikrobiyal spektrumunun daha da genişlemesi, gıdalarda kullanımını yaygın hale getirmektedir (228).

Bakteriyosinlerin etki spektrumlarının sınırlı olması nedeniyle gıdalardaki etkileri de sınırlı kalabilmektedir. Özellikle gram (+) mikroorganizmalar üzerinde etkili olmaları nedeniyle, genellikle Gram (-) mikroorganizmalara karşı fazla etkili olamamaktadırlar. Dolayısıyla Gram (-) olan patojen mikroorganizmaların da olduğu düşünüldüğünde, sadece nisin kullanımıyla gıda güvenliğinin sağlanamayacağı açıktır. Bu nedenle, nisinle birlikte diğer gıda koruyucu katkıların veya proseslerin kullanılması gerekmektedir. Gram (-) bakterilerin dış zarlarının bütünlüğü bozulduğunda bakteriyosinlere karşı oldukça hassasiyet göstermektedirler. Bu nedenle nisinle beraber hücre zarını bozabilecek trisodyum fosfat veya EDTA gibi şelatların kullanılmasının inhibisyon etkisi yapabileceği bildirilmektedir (229).

Nisinin etkisini artırmak için koruyucu katkıların yanısıra yüksek basınç ve yüksek voltaj elektrik alan pulslarının (PEF) uygulanması önemli katkı sağlamıştır. Örneğin 100 IU/ml nisinle birlikte 155-400 MPa basınç uygulamasının *E. coli*, *S. Enteridis*, *S. Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staph. aureus*' u inaktive ettiği saptanmıştır (230).

Nisinin gıdaların korunmasında uygulanan kullanım şekillerinden birisi de gıda yüzeyine uygulanan filmlerde kullanımıdır. Bu tür antimikrobiyal biyofilmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyal gelişimi etkileyebilmektedir. Nisin, kullanıldığı biyofilmlerden gıda yüzeyine belli oranlarda geçerek, yüzeyde mikrobiyal gelişimi engelleyebilmektedir (231). Nisin, protein yapısındaki biyofilmlerin polimer yapısına doğrudan katılarak veya polietilen materyallerin polimer yapısının yüzeyine adsorblanarak kullanılabilirdiği gibi, farklı şekillerde de kullanılabilir. (232).

Bakteriyosinlerin gıdalarda kullanım potansiyeli her geçen gün artmaktadır. Ancak, gıdalarda kullanım amacıyla henüz yeterince karakterize edilememişlerdir. Ayrıca bazı koruyucu madde ve proseslerle birlikte kullanımlarının, gıdaların mikrobiyolojik kalitesi üzerinde daha fazla etkili olması nedeniyle bu konuda daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır (232).

Laktokoklar ve Probiyotik Özellikleri

Probiyotik Yunanca'da "yaşam için" anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir. Bir probiyotik en basit şekilde "sağlık için yararlı canlı bir mikrobiyal gıda ingredienti" olarak tanımlanabilir (233). MC Naught ve Macfie (234) tarafından probiyotikler; "Tüketici sağlığına, bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini

koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır” şeklinde tanımlanmıştır.

Dünyada değişik yörelerde farklı fermente ürünlerin üretiminde kullanılan probiyotik bakterilerin insan sağlığı ve beslenmesi açısından oldukça önemli terapötik ve diyetetik özellikleri olduğu bilinmektedir. Probiyotik bakteriler kullanılarak yapılan süt ürünlerinin; antimikrobiyal aktivite, kolesterol düşürücü etki, laktoz intoleransı hafifletici etki, immün sistemin aktivasyonu, karaciğer rahatsızlıklarında olumlu etki, antikarsinogenik etki, L(+) laktik asit üretimi gibi yararlı etkisinin olduğu da çok sayıda literatürde bildirilmektedir (235). Probiyotikler, patojen olmayan mikroorganizmalardır ve laktobasiller, bifidobakteriler, enterokoklar gibi insanların sindirim sisteminde doğal olarak bulunmaktadır (236).

Bazı LAB'nin gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme gibi ilginç fizyolojik karakterleri onların probiyotik olarak kullanımlarına olanak sağlamaktadır. LAB'nin gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme kabiliyetleri bu mikroorganizmaların düşük pH ve/veya safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme yetenekleriyle ilgilidir (19).

Tablo 9: Probiyotiklerin başlıca özellikleri (237 238, 239).

Özellik	Yarar
Pankreatik enzimler, asit ve safra tuzlarına direnç	<ul style="list-style-type: none">• İntestinal sistemde canlılığını sürdürebilme
İntestinal mukozaya tutunabilme	<ul style="list-style-type: none">• İmmün sistemin modülasyonu• Patojenlerin tutunmasını önleme• Hasarlı mukozanın iyileştirilmesi• Kısa süreli kolonizasyonun uzatılması
İnsan orijinli olma	<ul style="list-style-type: none">• Konakçı ile spesifik interaksiyonlar
Dökümanite edilmiş sağlık yararları	<ul style="list-style-type: none">• Olası sağlık etkilerinin doğrulanması
Güvenlik	<ul style="list-style-type: none">• Tüketici için sağlık riskinin olmaması
İyi teknolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none">• Stabilite• Endüstriyel düzeyde üretilebilme• Oksijene tolerans

Probiyotik terimi genellikle fermente süt ürünleri ya da diyet katkısı olarak alınabilen biyolojik aktiviteleri ve intestinal sistemde canlılıklarını sürdürme ve yaşama kabiliyetleriyle tanımlanan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* türleri gibi seçilmiş LAB'ni ifade etmek için kullanılmaktadır (240). Laktobasiller, bifidobakteriler probiyotik süt ve süt ürünleri pazarında en çok kullanılan mikroorganizmalardır ve bu mikroorganizmalar kullanılarak yapılan ürünler pazarda en iyi ve en çok bilinen ürünlerdir (237). LAB ve özellikle laktobasiller 1915 yılından beri bağırsak florasını düzenlemek ve enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadır (241). Holzapfel ve Schillinger (2002) *Lb. paracasei*'nin immun sistemin modulasyonu ve gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde (zellikle diyareler) probiyotik olarak olumlu sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir (242). Probiyotik bakteri kültürlerinin kullanımına başlanmasından bu yana taşıyıcısı olarak kullanılan en popüler gıda sistemleri; yoğurt ve fermente süt gibi taze fermente olmuş ürünler ya da yeterli sayıda canlı probiyotik kültür ilave edilmiş fermente olmamış ürünlerdir. Yapılan son çalışmalar probiyotik bakterilerin birçok peynir çeşidinin üretiminde başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir. Probiyotik bakterilerin ürünlere ilavesindeki başarı, kullanılan tür ve suş, üretimde kullanılan LAB'nin aktivitesi, peynir kompozisyonu, üretim ve olgunlaşma koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (243).

Yine FAO/WHO tarafından insan tüketimi için kullanılacak probiyotik mikroorganizmaların sağlığa yararlı etkilerinin gösterilmesi ve bunların GRAS (Genel olarak güvenli bilinen) statüde olması gerektiği bildirilmektedir (244).

İnsanların sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde tükettikleri gıdaların güvenilir olması oldukça önemlidir. Bu gıdaların birçoğu bildiğimiz temel gıda kaynaklarından üretilmekte ve fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması için çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak bu katkı maddelerinin bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak kanserojenik ve toksik etki yapabilmeleri, doğal ve güvenilir katkıların elde edilmesi ve kullanımını oldukça önemli hale getirmiştir.

Gıdaların güvenliğinin sağlanması mümkün olduğunca proses uygulamalarından kaçınılması ve doğal katkı maddelerinin kullanımı gerekmektedir. Bu amaçla biyokontrol yöntemi önerilmektedir. Bu yöntemde, antagonistik mikroorganizmaların ve metabolitlerinin kullanımıyla patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaların inaktive edilmesi sağlanmaktadır. Gıdaların biyokontrolnde

LAB'nin ayrı bir önemi vardır. Bu bakteriler fermentasyon teknolojisinin tipik bakterileri olup, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılmaktadırlar (194, 195, 193).

Mide-bağırsak sisteminde laktokokların uzun süre canlılıklarını koruyamamaları nedeniyle probiyotik özelliklerinin düşük olduğu bildirilmektedir (245). Şimdiye kadar laktokokların üzerinde yapılan araştırmalarda probiyotik aktiviteleri gösterilmemiştir. Kimoto ve arkadaşları (66), bitkisel materyallerden izole edilen suşların, probiyotik karakteristik özellikleri üzerinde araştırma yapmışlardır ve bu suşların probiyotik aktivite gösterdiklerini bulmuşlar ve deneysel araştırmalarda kolesterolü ortadan kaldırdıklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu araştırmalar Avrupa ve Amerika probiyotik gıda pazarında, sebze ve bitkilerden elde edilen laktokok suşlarının probiyotik olarak kullanılabilceği üzerinde yapılan araştırmalardır (246).

Birçok LAB, mide-bağırsak sisteminin asitliğine zayıf direçlilik göstermesinden dolayı probiyotik kabul edilmemekle birlikte son yıllarda organizmaların probiyotik olarak kabul edilmesinde β -galaktozidaz enzimine sahip olup olmadığı baz alınmaktadır. *Str. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* alttür *bulgaricus* bu enzimi salgılamalarından dolayı probiyotik mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (247).

Son yıllarda fonksiyonel gıdalar alanında çeşitliliğin artması ile birlikte probiyotik bakterilerin ürünlerin besleyici ve sağlığı destekleyici özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla fermente süt ürünlerine ilavesi üzerine olan araştırma ilgisi de artmıştır. Avrupa probiyotik pazarının 2010 yılında 118.5 milyon euroya ulaşacağı tahmin edilmektedir (248).

Laktokokların Bakteriyofajları ve Direnç Sistemleri

Bakteriyofajlar, özellikle peynir endüstrisinde bakteriyel fermentasyonda büyük sorunlara neden olmaktadır (249, 250).

Çiğ süt, fermentasyon prosesi sırasında aseptik koşullara sahip olmayabilir. Fajlar, çiğ süt ya da hava yoluyla bulaşarak peynirde bulunabilmektedir. Lizogenik starter suşlarda çevresel, havadan, çalışanlardan ve çalışılan ortamdan kaynaklanan bakteriyofaj enfeksiyonları görülebilir. Starter kültürler bir kez enfekte olursa fajlar hızlı bir şekilde çoğalır, bakteri hücrelerine her defasında daha şiddetli bir şekilde saldırır. Bu tip ataklar, ürün kalitesinde düşmeye, fermentasyonun uzamasına ya da oluşmamasına neden olabilmektedir (251, 252).

Endüstriyel süt fermentasyon ortamlarına bulaşan fajlar, starter kültürlerin biyolojik aktivitesini olumsuz yönde etkilemekte ve faj bulaşmasının tipik belirtisi olan düşük asit gelişimi sonucu fermentasyon yavaşlamakta ya da tamamen durmaktadır. Fajlar halen tüm dünyada fermente süt endüstrisinde meydana gelen ürün kayıplarının başlıca etmenlerinden biri olma özelliğini korumaktadır (253, 254, 255, 256).

L. lactis suşları, bakteriyofaj infeksiyonlarına oldukça duyarlıdır. Bu nedenle yapılan çalışmalar bakteriyofajlar üzerine odaklanmış ve bakteriyofaj ve etkiledikleri bakteri hücresi ilişkisi ve genetik yapıları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bakteriyofajlar, serolojik, morfolojik ve etkiledikleri hücre yayılımına göre sınıflandırılmıştır (256, 257). Moleküler teknolojiye bağlı olarak bakteriyofajlar, DNA ve yapısal protein temellerine göre sınıflandırılmaya başlanmıştır (258). PCR yöntemi kullanılarak laktokokal 936 türüne ait bakteriyofajların tanımlanmasında, sahip oldukları farklı reseptör proteinlere bağlanan genlere (RBP) göre tanımlanmıştır (259).

LAB fajları ve özellikle laktokokal fajlar üzerinde yapılan çalışmalar daha çok Siphoviridae cinsi ve bu cinste bulunan 12 tip üzerinde yoğunlaşmıştır. Belirtilen 12 tip içinde süt endüstrisinde daha fazla yoğunlukla karşılaşılanlar, c2, 936 ve P335'tir. En önemli 2 faj türü P335 ve c2'dir (251, 252, 260, 261). Bu kuyruklu fajlar, 17-700 kb büyüklüğünde bir genoma, 10-800 nm büyüklüğünde kuyruğa sahiptir (261). Siphoviridae cinsi, Myoviridae ve Podoviridae ile birlikte Caudovirales familyasında yer almaktadır. Podoviridae cinsi, laktokokal fajların daha az öneme sahip cinsini oluşturmaktadır (262).

Şanlıbaba ve arkadaşları (263), Türkiye'de değişik yörelerden çiğ süt ve peynir altı suyundan 24 bakteriyofaj izole etmişler, yapısal protein kompozisyonu ve faj DNA restriksiyon endonukleaz fragmentleri kullanılarak karakterize etmişlerdir. 24 virulent laktokok bakteriyofajında 6.5-208,9 kDa moleküler büyüklükte 24-31 adet arasında değişen sayıda yapısal protein ve 6.5-38 kDa moleküler büyüklükte 2-8 adet arasında değişen major yapısal protein saptanmıştır. 24 laktokok bakteriyofajının toplam genom büyüklüğü 19.6-39 kb arasında tanımlanmıştır. Laktokok bakteriyofaj genomlarında restriksiyon endonukleaz enzim tanıma ve kesim bölgelerinin benzerliğine göre 8 farklı faj grubu oluşturulmuştur. Ayrıca, yaptıkları çalışmayla laktokokal bakteriyofajların benzer veya özdeş major ve minor protein kompozisyonuna sahip olduklarını daha öncesinde yapılan çalışmalara benzer şekilde teyit etmişlerdir (258, 264).

ELISA tekniği ile 936, P335, c2 faj türlerinin spesifik tanımlanmasında kullanılmaktadır (265). Ayrıca Labrie ve Moineau (266), 936, c2, P335 türlerinin tanımlanmasında PCR metodunu geliştirmişlerdir.

Chandry ve arkadaşları (267), 936 grubuna bağlı 2, c6A grubuna bağlı 2 ve p335 grubuna bağlı 1 adet laktokokal fajın DNA dizilimini tanımlamıştır. Polonya’da Cottage ve sert peynir yapımında karşılaşılan teknolojik ürün bozukluklarının % 60-70 ‘inin laktokokal suşlara bağlı bakteriyofaj enfeksiyonlarından kaynaklandığı belirlenmiştir (258).

Peynir endüstrisinde faj problemlerinin engellenmesinde, farklı kültür türlerinin kullanımı metodu uygulanabilir. Dolayısıyla aynı faj tarafından saldırı  nlenebilir (268). Sütte ya da peynir altı suyunda bulunan bu fajların ısı ya da yüksek basınç uygulamalarıyla inaktivasyonu sağlanabilir veya gelişimleri minimal d zeyele çekilebilir. Isı ve yüksek basınca dayanıklı fajlar bulunabilmekte ve bu fajlar kısa süreli pastörizasyona (72-75 C’de, 15-30 saniye) dayanmaktadırlar. Bu nedenle inaktivasyon kinetikleri genellikle laktokokal suşlar dikkate alınarak yapılmaktadır (249).

Peynir altı suyu fajların en önemli rezervuarıdır (269). Daha sonrasında şekillenebilecek ürün kaybı ve fermentasyonun gecikmesi problemlerini engellemek adına, peynir altı suyunda litik fajların varlığı ya da yokluğu, standart mikrobiyolojik metodlar (aktivite testi), pH indikat r nde renk değişimi, iletkenlik  l c m , plak testi gibi yöntemlerle belirlenebilir. Ancak, bu metodlar fermentasyonun gecikmesine neden olan faj türleri hakkında fikir vermez. İmmunolojik moleküler tekniklerin gelişimi faj türlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (270).

Starter kültür aktivasyonunu etkileyen çok sayıda etmen içinde en önemlisi ve  z m  en g c olanı bakteriyofaj kontaminasyonlarıdır. Fermentasyon ortamlarının laktik fajlarla kontaminasyonu, starter kültürlerin hızlı bir şekilde kontaminasyonu ve parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Faj kontaminasyonları, fermentasyon ortamlarında % 15-20 oranına varan ürün kayıplarına neden olabilmektedir (271). Günümüzde faj sorununu bertaraf etmek için faj dirençlilik sistemlerini içeren ve aynı zamanda fajlarla interaksiyon vermeyen suşların tanımlanması, başlıca  z m yolu olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde süt endüstrisinde kullanılan starter kültürler yurt dışından sağlanmaktadır. Özellikle Avrupa’da süt endüstrisinde sorun yaratan dominant faj tipinin, ülkemizdeki dominant faj tipinden farklı oluşu söz konusu starter kültürlerin ülkemiz koşullarında faj dirençlilik özelliklerini sürdürmelerini büyük  l de engellemektedir (272, 273, 274). Nitekim Türkiye kökenli fajların bu starter kültürlere karşı % 50 oranında litik

etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sebeplerden dolayı, fajlara dirençli suşların saptanıp, kültür kolleksiyonlarının oluşturulması ve bu kültür kolleksiyonlarından kendi starter sistemlerimizin kurulması büyük önem taşımaktadır (275).

Laktokok suşlarının özgül fajları ile karşılaşmaları rastlantısal bir süreçtir. Ortam hareketleri ile fiziksel temas sağlandığında fajın bakteriye adsorbsiyonu (hücre yüzeyindeki özel faj almaç bölgeye geri dönüşsüz bir şekilde tutunma) gerçekleşmektedir. Bu aşamadan sonra, faj DNA'sı hücre içine enjekte edilmektedir. Bakterilerin fizyolojik koşulları ile ortamdaki faj bakteri sayısının oranı gibi kriterlere bağlı olarak, litik ya da lizogenik yaşam döngüsü başlatılmaktadır. Lizogenik yaşam döngüsünde faj DNA'sı replikasyon ve faj elemanlarının sentezi yapılmaksızın bakteri kromozomuna bağlanır ve onun bir parçası gibi ardışık döllere aktarılır. Litik yaşam döngüsünde ise, faj DNA'sının konakçı sistemlerini kullanarak replikasyonu, faj proteinlerinin sentezi, baş-kuyruk ve kuyruk fibrilleri gibi yapıların montesi ile olgun faj partiküllerinin oluşturulması ve salınma aşamaları tipiktir. Bakteriler, faj yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında faj gelişme sürecini kesintiye uğratabilecek dirençlilik sistemleri geliştirmiştir. *L. lactis* suşlarında bu güne kadar saptanan doğal faj dirençlilik sistemleri dört ana mekanizma ile karakterize edilmektedir. Bunlar; faj adsorbsiyonunun engellenmesi, faj DNA enfeksiyonunun engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon sistemleri ve abortif faj enfeksiyon sistemleri olarak tanımlanmaktadır (276, 256, 253).

Faj adsorbsiyonunun engellenmesi; faj enfeksiyon döngüsünde ilk aşama, fajın konakçı hücre yüzeyine tutunmasıdır. Bu aşama oldukça spesifik olup faj tipine, konakçı hücrenin biyokimyasal özelliğine, sitoplazmik membranın elektriksel potansiyeline, faj reseptör materyalinin yoğunluğuna ve fajlar tarafından kullanılabilirliğine bağlıdır (279). Laktokok suşlarında almaç bölgeler çoğunlukla hücre duvarında bulunmaktadır. Bununla birlikte, faj almaç bölgeleri hücre membranı üzerinde bulunan suşlar da tanımlanmıştır. Almaç bölgeler, lipoproteinlerle kombine olmuş proteinler ya da protein moleküllerinden oluşmaktadır.

Laktokoklarda faj dirençlilik mekanizmalarının genetik determinantları genellikle plazmidler üzerinde yer almaktadır. Ancak adsorbsiyonunun engellenmesi tipte dirençlilik sistemine ait ilk bulgular, bu direnç mekanizmasının kromozomal mutasyonlar sonucunda meydana gelebileceğine işaret etmiştir. Söz konusu mutantların stabil olmaması nedeniyle, faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte dirençliliğe yol açan kromozomal mutasyonların genetik doğasına dair detaylı bilgiler elde edilememiştir (276, 256). *L. lactis* suşlarında faj adsorbsiyonunun engellendiği dirençlilik sistemlerinin plazmidler tarafından kodlandığına

dair ilk bulgular Sanders ve Klaenhammer tarafından yayımlanmıştır (277). Bu araştırmada *L. lactis* alttür *lactis* ME2 suşunda ϕ 18 fajının adsorbsiyonunun pME0030 olarak adlandırılan 31 Mda büyüklüğündeki bir plazmidin varlığında engellendiği saptanmıştır. Bu suşta faj direçlilik sisteminin etki mekanizmasının analizine yönelik çalışmalar sonucu (278, 279), pSK11 plazmidini içeren doğal suş *L. lactis* alttür *cremoris* SK110 ile, bu suşun pSK11 plazmidini içermeyen ve sk11G fajına duyarlı mutan SK112'nin hücre yüzey karakteristiklerinin farklı olduğu kanıtlanmıştır.

Faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte direçlilik sisteminden sorumlu olduğu tespit edilen ilk plazmid, *L. lactis* alttür *lactis* ME2 suşunda tanımlanan 48 kb büyüklüğündeki pME0030'dur. Söz konusu suşta bu plazmid varlığının faj adsorbsiyon etkinliğini % 80-90 oranından, % 20-40 oranına kadar indirgediği saptanmıştır. Günümüzde laktokoklarda faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipte direçlilik sistemlerinin temel mekanizmasının, plazmid kodlu proteinler tarafından yönetildiği kesinlik kazanmıştır.

Restriksiyon/Modifikasyon Sistemleri; Restriksiyon/modifikasyon tipte direçlilik sistemi, laktokoklarda belirlenen ilk plazmid kodlu faj direçlilik sistemidir (277). Restriksiyon endonükleazlar, plazmid ya da faj gibi yabancı DNA saldırılarına karşı konakçı hücrenin doğal savunma mekanizmalarıdır. Bu enzimler, hücreye giren yabancı DNA molekülünü belirli serilerden tanıma ve kesme aktivitesi göstermektedir. Laktik starter olarak kullanılan suşlarda restriksiyon-modifikasyon sistemlerinin stabil olmadığı bildirilmiştir.

Restriksiyon/modifikasyon sistemlerinin genetik determinantları üzerinde yürütülen araştırmalarda, *L. lactis* suşlarında bu özelliğin genellikle plazmidler tarafından kodlandığı saptanmıştır (280, 253, 281). Kromozomal DNA tarafından kodlanan tek restriksiyon/modifikasyon sistemi ise, *L. lactis* alttür *cremoris* UC503 suşunda tanımlanmış olan *ScrFI* sistemidir. *L. lactis* suşlarında farklı restriksiyon/modifikasyon sistemlerini kontrol eden genlerin, kromozomal DNA kökenli fragmentlerin transpozisyonu sonucu plazmidler üzerine taşındığını kanıtlamıştır (253, 289).

Abortif Enfeksiyon (Abi), faj DNA'sının konakçı hücreye enjeksiyonundan sonraki faj enfeksiyon süreçlerinin engellenmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu faj direç tipinde, faj DNA'sının hücreye girişi ve erken gen ifadesi normal olarak meydana gelmekte, ancak geç gen ifadesi engellenmektedir. Abortif enfeksiyon sisteminin fenotipik karakteristikleri, faj plak etkinliği ve patlama büyüklüğünde meydana gelen düşmelerdir. Abi direç mekanizmasını içeren hücreler genellikle enfekte olduktan sonra ölmektedir (282).

L. lactis suşlarında 12 farklı abortif enfeksiyon sistemi, moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Bu sistemler; AbiA, AbiB, AbiC, AbiD, AbiD1, AbiE, AbiF, AbiG, AbiH, AbiI, AbiJ, AbiK olarak adlandırılmıştır. Abi sistemlerinden genetik ve biyokimyasal esası bakımından farklılıklar gösteren bir başka Abi sisteminin moleküler düzeyde tanısı için çalışmalar sürdürülmektedir (256). *L. lactis* alttür *lactis* UC811 suşunda tanımlanan pC1829 konjugatif plazmidinde de AbiA geninin varlığı saptanmıştır (283).

Faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi; fajın konakçı hücreye adsorbsiyonu, faj DNA'sının hücre içine translokasyonu için yeterli değildir (284). Faj DNA'sının hücre içine enjeksiyonunda yardımcı proteinlerin varlığı değişik bakteri suşlarında tanımlanmıştır (285). Laktokoklarda, söz konusu proteinlerin plazmid ya da kromozomal DNA kökenli genlerin etkinliği sonucu inaktive edildiği ve bu yolla hücre içine faj DNA enjeksiyonunun bloke edildiği saptanmıştır (286).

Faj DNA enjeksiyonunun engellenmesi tipte dirençlilik sistemi, bulunduğu suşta çok güçlü bir dirençlilik fenotipi oluşturmaktadır. Ancak bu güne kadar söz konusu sistemin yalnız birkaç suş için tanımlanmış olması, nadir rastlanan bir sistem olduğuna işaret etmektedir (287).

L. lactis suşlarında faj-konakçı interaksyonları; *L. lactis* suşları ile fajları arasında; litik, lizogenik ve pseudolizogenik yaşam döngüleri olarak tanımlanan, 3 ana interaksyon tipi saptanmıştır. Litik döngü genel hatları ile, fajın hücre yüzeyinde yer alan özel almaç bölgelere geri dönüşsüz bir şekilde adsorbsiyonu, faj DNA'sının hücre yüzey proteinleri ve kasılabilir kuyruk kılıfı ile faj lisinleri gibi faj elemanlarının yardımı sonucu hücre içine enjeksiyonu, konakçı hücre replikasyonunun durdurulması ve bu sistemin faj replikasyonu için yönlendirilmesi, faj DNA ve proteinlerinin sentezi, baş, kuyruk ve kuyruk fibrilleri gibi yapıların montesi ile olgun faj partiküllerinin oluşturulması ve salınma aşamalarını içermektedir. Dinamik denge halindeki faj-bakteri süspansiyonlarında adsorbsiyon 12 dk içerisinde tamamlanmaktadır. Faj DNA enjeksiyonu ise, adsorbsiyonun tamamlanmasından hemen sonra gerçekleşmektedir. Faj DNA enjeksiyonundan, çoğalan faj partiküllerinin konakçıdan salınmasına kadar geçen süre olarak tanımlanan latent dönem 20-60 dk, popülasyonda bulunan bazı bireylerde faj salınmasının gecikmesi ile karakterize edilen artış dönemi ise 10-30 dk arasında değişmektedir. Konakçı suşlarda litik bir döngünün tamamlanması için ortalama süre 50-70 dk arasındadır (253, 286). Olgun faj partiküllerinin bakteriyi parçalayarak ortama salınması, bakteri içerisinde üretilen faj partiküllerinin oluşturduğu osmotik basınç ve faj lisinlerinin etkisi ile sağlanmaktadır. Bir fajın enjeksiyonu sonucu bir bakteride üretilen ve

bakterinin parçalanması ile ortama salınan enfeksiyöz virüs partikülü sayısını ifade eden faj patlama büyüklüğü ise; 9-105 arasında değişebilmektedir (288, 282). Lizogeni, adsorbsiyon ve faj DNA enjeksiyonundan sonraki faj enfeksiyon aşamalarının kesintiye uğratılarak, hücre içine giren faj DNA'sının konakçı genomuna bağlanması ile karakterize edilmektedir. *L. lactis* suşlarında faj-konakçı dinamik dengesi ile doğrudan ilişkili olan bu durumun hangi fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde gerçekleştiği bilinmemektedir. Bakteri genomunda profaj halinde bulunan faj DNA'sı, kromozomal DNA ile birlikte replike edilerek yeni kuşaklarda da sürekliliğini korumaktadır. Tempereyt fajlar, kendiliğinden ya da mitomisin C veya ultraviyole ışınları uygulaması gibi deneysel koşullarda litik döngüye geçebilmektedir (289).

Pseudolizogeni; hücre içine enjekte edilen faj DNA'sının replikasyonunun bloke edilmesi, ancak konakçı genomuna entegrasyonunun gerçekleşmemesinden dolayı, faj DNA'sının sitoplazmada plazmid davranışı göstermesi sonucu oluşmaktadır. Laktokoklarda pseudolizogen suşların yeni faj enfeksiyonlarına karşı dirençli hale geldikleri saptanmıştır. Gram negatif bakterilerde faj almaç bölgelerinin kromozomal mutasyonlarla indirgenmesinin, faj almaç bölgelerin bozulmasının ve temperent fajların litik mutantlarının bu direnç oluşumunda rol aldığı bilinmekte ancak, *L. lactis* suşlarında söz konusu mekanizmanın etkinliğine ait bir çalışma bulunmamaktadır (290).

L. lactis'de faj dirençlilik sistemlerinin fenotipik, genetik ve biyokimyasal karakterizasyonu, bu bakterilerin daha detaylı bir şekilde anlaşılmasına ve süt fermentasyonları için starter kültür özelliklerinin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Faj dirençli endüstriyel suş seçimi çalışmalarında temel yaklaşım, fermentasyon ortamlarında fajlar ile sürekli temas halinde olan *L. lactis* suşlarındaki doğal dirençlilik mekanizmalarının tanımlanması ve kullanım alanlarının araştırılmasıdır. Halen tartışma konusu olan bir diğer yaklaşım ise, modern genetik tekniklerin kullanımı ile bu sistemlerin genetik determinantlarının duyarlı starter suşlara aktarımı ve ifadesi çalışmalarını esas almaktadır (291).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan İzolatlar

Çalışmamızda kullanılan izolatlar Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. İzolatlar daha önce yapılan çalışmalar ile özellikle kültür kullanılmaksızın geleneksel tekniklere göre Güney Marmara Bölgesi'nde üretilen Beyaz peynir ve Kaşar peynirlerinden izole edilmiştir. Elde edilen izolatların cins ve tür seviyesindeki identifikasyonları hem klasik mikrobiyolojik hem de moleküler tekniklerle belirlenmiştir. *L. lactis* alttür *lactis* ve *L. lactis* alttür *cremoris* türlerine ait toplam 42 izolat ile izole edildikleri peynir çeşitleri Tablo 10'da verilmiştir. İzolatlardan 23 tanesi Beyaz peynirlerden izole edilirken 19 tanesi Kaşar peynirlerinden izole edilmiştir. 42 izolattan sadece 5 tanesi kremoris alttürüne aittir. Bunların da sadece 1 adedi Kaşar peynirinden izole edilmiş olup 4 adedi Beyaz peynirden izole edilmiştir.

Tablo 10: Çalışmada kullanılan laktokok izolatları

No	İzolat	Tür	İzole edildiği Peynir
1	1	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
2	2	<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	Beyaz peynir
3	4	<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	Beyaz peynir
4	10	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
5	12	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
6	13	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
7	15	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
8	20	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
9	23	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
10	24	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
11	27	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
12	28	<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	Beyaz peynir
13	30	<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	Beyaz peynir
14	31	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
15	32	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir

16	34	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
17	35	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
18	36	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
19	37	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
20	39	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
21	40	<i>L. lactis</i> alttür <i>cremoris</i>	Kaşar Peyniri
22	41	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
23	42	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
24	43	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
25	44	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz peynir
26	46	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
27	47	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
28	48	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz Peynir
29	50	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
30	51	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
31	52	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz Peynir
32	53	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz Peynir
33	54	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
34	55	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz Peynir
35	56	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
36	57	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
37	59	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
38	60	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
39	61	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri
40	62	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz Peynir
41	63	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Beyaz Peynir
42	64	<i>L. lactis</i> alttür <i>lactis</i>	Kaşar Peyniri

Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Laktokok izolatlarının canlandırılması ve glikolizisin izlenmesinde içerisinde 5 g L-1 laktoz içeren M17 broth (Merck) kullanıldı. Laktokokların sayısal değerlendirilmesi 20 mg/l nalidiksik asit (Biomedicals Inc. 151724, USA) içeren M17 agarda (Merck) gerçekleştirildi. pH ölçümleri Mettler Toledo pH metre ile gerçekleştirildi. Sütte glikolizisin belirlenmesinde kullanılan yağsız süt tozu Ruzhym-molokodairy firmasından (Ukrayna) temin edildi. Bakteriyoliz, Shimadzu marka (UV-1601, Japonya) spektrofotometre ölçümleriyle belirlendi. Kullanılan kimyasalların tartımı Sartorius Basic marka terazide gerçekleştirildi.

İzolatların Canlandırılması

İzolatlar, içerisinde % 20-25 oranında gliserol içeren M17 sıvı besi yerinde -80°C’de kriyotüplerde muhafaza edilmiştir (292, 293). Derin dondurucudan çıkarılan kriyotüplerden vakit kaybetmeden ve kontaminasyon riski göz önünde bulundurularak M17 broth besi yerine ekimler yapıldı (293). Bu tüplerde üreyen bakteriler laboratuvar çalışma kültürü olarak kullanıldı. Çalışma kültürü % 1’lik ekimler yapılarak her hafta yeniden tazelendi.

Glikolizisin Belirlenmesi

M17 Laktoz Besi Ortamında Glikolizisin Belirlenmesi

İzolatların asidifikasyon nitelikleri zamana bağlı olarak laktoz içeren M17 broth besi yerinde pH değişimlerinin ölçülmesiyle belirlendi. Bu amaçla 10 ml broth içeren tüpler logaritmik fazın son aşamasında bulunan kültürler ile % 1 oranında ekilerek 30 °C’de inkubasyona bırakıldı. Besi yerinin pH’sı 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde ölçülerek şekillenen değişiklikler kaydedildi. Laktokoklarda laktozun hücrede parçalanmasında rol oynayan B-galaktozidaz enzimi plazmidle kodlanmış olduğundan dolayı izolatların sadece laktoz içeren besi ortamlarında geliştirilmesine özen gösterildi.

Yağsız Süt Tozundan Hazırlanan Sütte Glikolizisin Belirlenmesi

Sütün tampon yeteneği M17 besi yerinden daha düşük seviyede olduğundan % 10 süt tozu ortamında izolatların asidifikasyon aktiviteleri değerlendirildi. Bu amaçla 50 gr süttozu 450 gr distile su içerisinde çözündürülüp tüplere 10 ml dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklav edildi (294, 295, 296, 297). Tüpler yukarıda bahsedildiği gibi logaritmik fazın son aşamasındaki kültürler ile % 1 oranında ekilerek 30 °C'de inkubasyona bırakıldı. Suşların asidifikasyon aktiviteleri, International Dairy Federasyon (IDF) standartlarına göre ölçülmüştür (298). pH'daki değişimler zamana bağlı olarak ölçülerek değerlendirilmiştir.

Sütte Üreyen Laktokokların Sayısal Değerlendirilmesi

Yağsız süt tozundan hazırlanan sütte asidifikasyon nitelikleri ve FSDA agardaki proteoliz ve laktoz kullanım sonuçlarına göre yüksek ve düşük değerler gösteren iki farklı mikroorganizmanın M17 laktoz agardaki üreme değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla seçilen 10 ve 36 no'lu izolatlar üremelerinin logaritmik fazında yeniden yapılandırılmış sütün içerisine % 1 oranında inoküle edildi. 30°C de inkübe edilen tüplerdeki üreme 0., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde saptanmıştır. Sulandırmalar seri halinde peptonlu su ortamında (1/1000'lik pepton ve 9/1000'lik sodyum klorür yapılmıştır. Laktokoklar nalidiksik asit içeren M17 agarda yüzey ekim yöntemiyle ekilmiştir (299, 300). 30 °C'de anaerobik olarak inkübe edilen plaklardaki üremeler 24 saat sonunda belirlenmiştir.

Fast-Slow Differention Agar'da (FSDA) İzolatların Proteolizlerinin ve Laktoz Kullanımlarının Değerlendirilmesi

Ticari olarak mevcut olmayan bu besiyeri Juillard'a (INRA, Unite de Recherche Laitiers et Genetique Appliqué, Jouy-en-Josas, Fransa, kişisel görüşme) göre laboratuvarımızda hazırlanmıştır. Test sonuçlarının olumlu olmasında en önemli noktalardan birisi de besi yerinde kullanılan süt tozunun yüksek ısı işlemine maruz kalmamış olmasıdır. Bu amaçla kullanılacak olan süt tozları özenle seçilmelidir.

FSDA'nın Hazırlanması :

Bu besi ortamı A ve B komponentlerinden oluşmaktadır. Bu komponentler terazide ayrı, ayrı tartılarak hazırlanıp otoklave edildikten sonra birleştirilmekte ve 50°C'de petri kutularına dökülmektedir (301).

Komponent A)

- 6 gr Agar agar
- 9.5 gr sodyum gliserofosfat
- 0.5 gr baktolismus
- 275 ml su

Komponent B)

- 50 gr süttozu
- 225 ml su

FSDA besi ortamına ekim için petriyer öncelikle 5 kısma bölündü ve öze yardımıyla yüzeye ekim yapıldı. Plaklar anaerobik olarak jarlar içerisinde 30°C'de 24, 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodu sonucunda, Prt + izolatlar 1.3 mm çaplı, beyaz renkli ve çevresinde pembe asidifikasyon haleleri şeklinde koloniler oluştururken, Prt- izolatlar 0.2-0.5 mm çaplı ve saydam bir görünüm sergileyen ayrıca asidifikasyon halesi göstermeyen koloniler oluşturmuşlardır (293). Laktozu kullanan kolonilerin çevresinde kırmızı bir zon şekillenmektedir (127, 302, 303).

İzolatların Bakteriyolizlerinin Belirlenmesi

İzolatların bakteriyolitik aktiviteleri tamponlanmış ortamlarda test edildi. Bu amaçla pH'sı 7'ye ayarlanmış potasyum fosfat (100 mM) kullanıldı. Tampon ortamı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kimyasallarının uygun kombinasyonlarda karıştırılmasıyla hazırlandı.

Gece boyu logaritmik fazın sonunda üreyen mikroorganizmalar 1500 devirde 10 dak 4°C'de santrifüje edildi (Nüve 800R). Üstte bulunan besi yeri dikkatli bir şekilde döküldükten sonra dipte kalan bakteri peleti 4°C'ye soğutulmuş yukarıda bahsedilen tampon solusyonu içerisinde vortekslenerek çözündürüldü. Buradaki amaç kalıntı düzeydeki besi yeri kalıntısının da elimine edilmesidir. Ardından yeniden aynı koşullarda gerçekleştirilen santrifügasyon sonrasında üstteki sıvı yeniden döküldü ve bakteriler yeniden 30°C'deki tamponda çözündürüldü. Bu işlemin ardından mikroorganizmalar optik densiteleri 650 nanometerde (OD_{650nm}) 0.6-0.8 değerinde olacak şekilde

spektrofotometrede ayarlandı (304). Bakteriyolitik enzimler mikroorganizmaların tampon içerisinde süspanse edilmesinin hemen ardından peptidoglikanı parçalamaya başladıklarından bu işlemlerin kısa zaman içerisinde tamamlanması gerekmektedir. 30°C’de inkübe edilen süspanسیونun 2. ve 24. saatlerde optik dansitelerinin ölçülmesi ve şekillenen düşmenin % değeri olarak hesaplanmasıyla bakteriyoliz tespit edildi (304). Hücre otolizinin oranı aşağıda gösterilen formülle bulunmuştur (305, 306).

$$\left(\frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \right) \quad (A_0: \text{Başlangıç değeri}, A_t: \text{Belirlenen süre sonunda ulaşılan değer})$$

Bakteriyofajların belirlenmesi

Terzaghi ve Sandine (307) tarafından geliştirilen teknik esas alınarak bakteriyofaj aranması yapılmıştır. Bu amaçla M17 laktoz broth besi yerinde yaklaşık 4 saat boyunca üreyen ve OD_{650 nm} = 1 değerine ulaşan 10 ml kültür üzerine 0.1 ml CaCl₂ (1 M) ilave edilmiş ve inkübasyona 4 saat daha devam edilmiştir. Süre sonunda kültür 4500 rpm de 10 dakika boyunca 4 °C de santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz steril bir tüp içerisine alınarak 0.45 µm poroziteli filtreden (Millipore, ABD) geçirilmiştir. İçerisinde faj içerdiği varsayılan bu filtrat kullanılıncaya kadar + 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Diğer taraftan steril bir tüpün içerisine sırasıyla M17 broth’da gece boyunca üreyen yine aynı bakteriye ait 100 µl kültür, 50 µl CaCl₂ (1 M) ve 100 µl filtrat ilave edilip karıştırılarak 25 °C’de 10 dakika boyunca virüs absorpsiyonu için beklendi. Absorpsiyon süreci sonrasında 45°C’ye soğutulmuş 2.5 ml M17 agar besi yeri karışımının üzerine ilave edildi. Ardından, bu karışım 100 mM glisin aminoasidi ile zenginleştirilmiş M17 agar üzerine yayılarak 30 °C’de inkübe edilmiştir. Yaklaşık 4-5 saatlik inkübasyon sonrasında yoğun şekilde üreyen bakteri kolonileri arasında gözlenen saydam ve üremenin olmadığı zonlar bakteriyofajlar için pozitif olarak değerlendirildi (307).

İstatistiksel Analizler

Süt ortamında izolatların pH değişimlerinin düşük, orta, yüksek olarak gruplara ayrılmasında ve gruplar arası farkın istatistiksel karşılaştırılmasında Kikare (Chi-square) testi uygulanmıştır. Beyaz peynir ve Kaşar peynir izolatlarının sütte pH değişimlerinin kıyaslanmasında ayrıca laktis ve kremoris alttürleri arasındaki pH değişimlerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel çalışmalarda SPSS 12.0 versiyonu (Windows) kullanılmıştır.

BULGULAR

Glikolizin Belirlenmesi

M17-Laktoz Sıvı Besiyerinde pH Değişiminin Belirlenmesi

İzolatların buldukları ortamın pH'sını düşürme özellikleri öncelikle içinde % 5 laktoz içeren M17 brotta belirlendi. Bu amaçla logaritmik fazın sonunda bulunan (yaklaşık 8. inkübasyon saati) izolatlar, yaklaşık % 1 oranında yapılan bir ekimle taze besi ortamına inoküle edildi ve üremesi maksadıyla etüve kaldırıldı. Zamana bağlı olarak şekillenen laktoz kullanımı ve laktik asit üretimi pH metreyle 2. 4. 6. 8. ve 24. saatlerde ölçülerek kaydedildi (Tablo 11). 24 saatlik inkübasyon sonunda bütün izolatların ortamın pH'sını 5 değerinin altına düşürmediği saptandı. Bununla birlikte, özellikle inkübasyonun 6. saatinden itibaren bazı izolatlar (35, 36, 43, 44, 46, 47, 50, 52, 56, 59, 60 ve 61) daha hızlı pH düşüşüne yol açarken diğer bazılarının (1, 23, 28, 30, 32, 40 ve 64) daha yavaş bir şekilde düşüşe yol açtıkları gözlemlendi. Sekizinci saatten itibaren pH'daki düşmenin yavaşlaması ve daha sonra süte oranla daha düşük bir seviyede kalması besi yerinin içerdiği yüksek tamponlayıcı etkiye sahip olan Na- β -gliserofosfatın varlığı ile açıklanabilir.

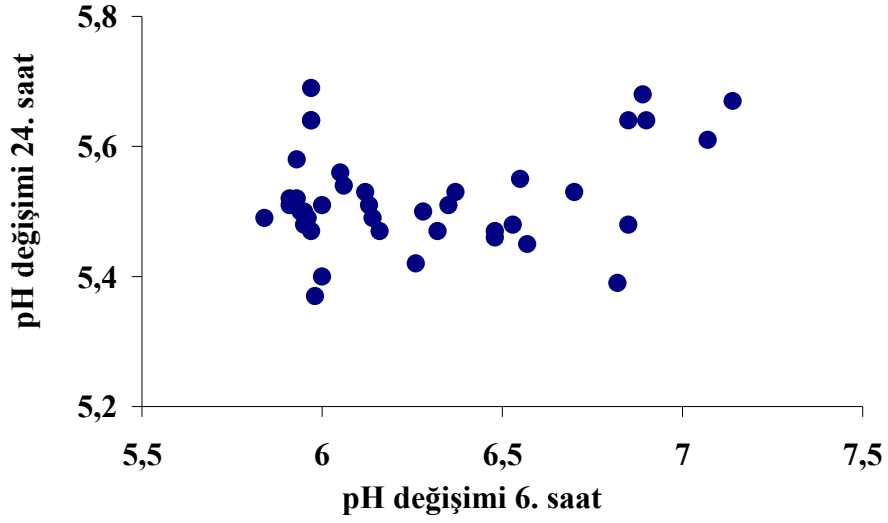
Tablo 11: İzole Edilen İzolatların M17 Broth'da pH değişimi*

İzolat No	0.saat	2. saat	4. saat	6. saat	8. saat	24. saat
1	7.30	7.13	7.04	6.85	6.33	5.64
2	7.30	7.15	7.05	6.70	5.92	5.53
4	7.30	7.15	7.11	6.82	6.17	5.39
10	7.30	7.15	7.00	6.06	5.81	5.54
12	7.30	7.14	6.97	6.14	5.71	5.49
13	7.30	7.18	7.06	6.53	5.92	5.48
15	7.30	7.19	7.05	6.55	5.74	5.55
20	7.30	7.18	7.02	6.32	5.84	5.47
23	7.30	7.17	7.10	6.89	6.32	5.68
24	7.30	7.21	7.05	6.57	5.94	5.45
27	7.30	7.20	7.05	6.37	5.93	5.53
28	7.30	7.22	7.18	7.14	7.04	5.67

30	7.30	7.21	7.13	6.85	6.14	5.48
31	7.30	7.21	7.04	6.35	5.74	5.51
32	7.30	7.27	7.10	6.90	6.51	5.64
34	7.30	7.22	7.00	6.35	5.82	5.47
35	7.30	7.20	6.79	5.97	5.89	5.64
36	7.30	7.16	6.87	5.97	5.93	5.64
37	7.30	7.14	7.02	6.48	5.69	5.46
39	7.30	7.16	7.03	6.12	5.85	5.53
40	7.30	7.17	7.13	6.96	6.45	5.44
41	7.30	7.02	6.76	5.98	5.61	5.37
42	7.30	7.06	6.87	6.28	5.81	5.50
43	7.30	7.07	6.80	5.93	5.74	5.58
44	7.30	7.07	6.72	5.96	5.71	5.49
46	7.30	7.07	6.74	5.91	5.75	5.51
47	7.30	7.08	6.82	5.95	5.63	5.48
48	7.30	7.06	6.75	6.05	5.73	5.56
50	7.30	7.08	6.77	5.84	5.65	5.49
51	7.30	7.05	6.84	6.16	5.70	5.47
52	7.30	7.08	6.67	5.95	5.76	5.50
53	7.30	7.12	6.87	6.26	5.66	5.42
54	7.30	7.11	6.78	6.00	5.69	5.40
55	7.30	7.07	6.72	5.94	5.74	5.50
56	7.30	7.12	6.81	5.91	5.69	5.52
57	7.30	7.13	6.89	6.13	5.90	5.51
59	7.30	7.10	6.78	5.97	5.79	5.64
60	7.30	7.08	6.83	5.93	5.68	5.52
61	7.30	7.11	6.85	5.97	5.84	5.47
62	7.30	7.09	6.83	6.00	5.66	5.51
63	7.30	7.14	7.01	6.48	5.71	5.47
64	7.30	7.14	7.10	7.07	6.85	5.61

(*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır)

İki boyutlu düzlemde 6. ve 24. saatlerde izolatların yerleşimleri incelendiğinde, 6. saatte daha geniş bir dağılımın oluştuğu görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 9: M17 laktoz besi yerinde 6 ve 24. saatlerde izolatların pH değişimleri

Yağsız Süt Tozundan Hazırlanmış Sütte Fermentasyon Sonucu pH Değişimi

Süt ve peynir ortamını daha iyi yansıtması dolayısıyla izolatların asidifikasyon nitelikleri yağsız süt tozundan hazırlanan sütte de test edilmiştir. Belirgin pH düşüşü 4. saatten sonra şekillenmeye başlamıştır (Tablo 12). İnkübasyon periyodu sonunda izolatların büyük çoğunluğu ortamın pH'sını 5 değerinin altına düşürmesine rağmen 6. ve 8. saatlerde izolatlar arasında farklılık bulunduğu görülmektedir. 8.saatin sonunda izolatların ulaştığı pH dereceleri karşılaştırıldığında 19 adet izolatın düşük seviyeli (pH, 5.5-6.0), 8 izolatın orta seviyeli (pH, 5.2-5.5) ve 15 adet izolatında yüksek seviyeli pH azalması gösterdiği (pH, 4.6-5.2) belirlenmiştir. Gruplar arası farklılık istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

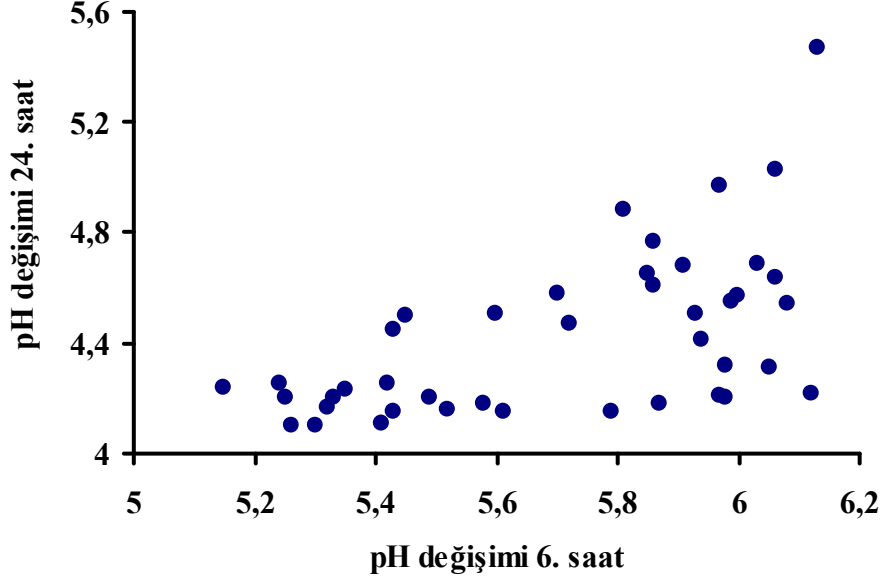
Tablo 12: İzolatların süt tozundan hazırlanan yağsız sütte pH değişimi*

İzolat	0.saat	2.saat	4.saat	6.saat	8.saat	24.saat
1	6,43	6,29	6,14	5,81	5,60	4,88
2	6,43	6,30	6,13	5,86	5,58	4,77
4	6,43	6,31	6,17	5,86	5,47	4,61
10	6,43	6,30	6,05	5,35	4,66	4,23
12	6,43	6,28	5,94	5,25	4,63	4,20
13	6,43	6,28	5,99	5,24	4,60	4,25
15	6,43	6,27	5,84	5,32	4,84	4,17

20	6,43	6,30	6,02	5,33	4,68	4,20
23	6,43	6,36	6,24	5,93	5,66	4,51
24	6,43	6,35	6,19	5,91	5,62	4,68
27	6,43	6,30	6,04	5,42	4,76	4,25
28	6,43	6,35	6,22	5,98	5,70	4,32
30	6,43	6,30	6,09	5,85	5,64	4,65
31	6,43	6,29	5,93	5,15	4,60	4,24
32	6,43	6,32	6,16	5,94	5,54	4,41
34	6,43	6,30	5,94	5,43	5,20	4,45
35	6,43	6,32	6,15	6,00	5,79	4,57
36	6,43	6,33	6,17	6,06	5,97	5,03
37	6,43	6,29	5,96	5,45	5,20	4,50
39	6,43	6,30	6,14	5,97	5,80	4,97
40	6,43	6,38	6,29	6,13	6,00	5,53
41	6,43	6,26	5,99	5,26	4,64	4,10
42	6,43	6,28	6,13	5,49	4,78	4,20
43	6,43	6,30	6,14	5,72	5,43	4,47
44	6,43	6,30	6,11	5,41	4,72	4,11
46	6,43	6,28	6,22	6,03	5,82	4,69
47	6,43	6,29	6,21	5,61	4,93	4,15
48	6,43	6,31	6,14	5,70	5,46	4,58
50	6,43	6,33	6,22	5,97	5,66	4,21
51	6,43	6,32	6,12	5,43	5,02	4,15
52	6,43	6,32	6,22	6,06	5,83	4,64
53	6,43	6,32	6,05	5,30	4,77	4,10
54	6,43	6,30	6,16	5,58	4,94	4,18
55	6,43	6,26	6,11	5,87	5,44	4,18
56	6,43	6,28	6,00	5,52	5,09	4,16
57	6,43	6,36	6,20	5,99	5,86	4,55
59	6,43	6,31	6,20	6,05	5,85	4,31
60	6,43	6,33	6,21	5,98	5,65	4,20
61	6,43	6,31	6,19	6,08	5,99	4,54
62	6,43	6,32	6,07	5,60	5,34	4,51
63	6,43	6,37	6,26	5,79	5,24	4,15
64	6,43	6,39	6,32	6,12	5,89	4,22

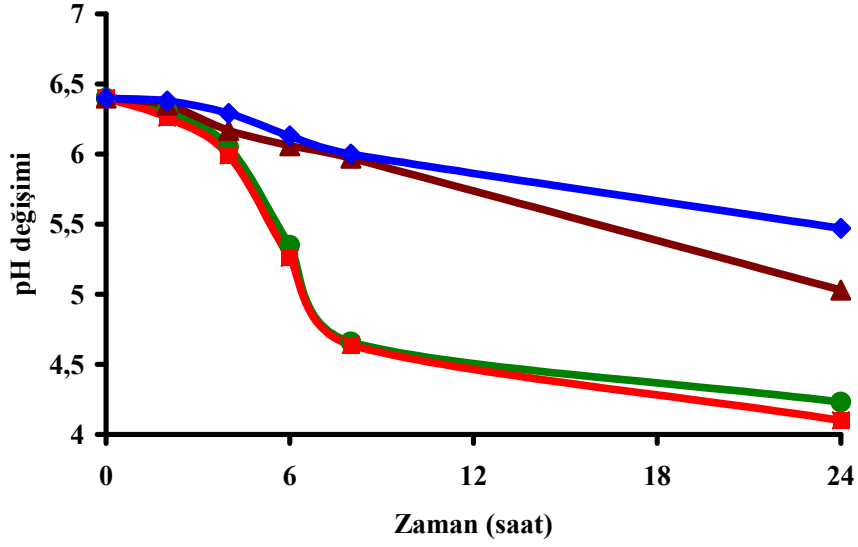
(*Birbirinden bağımsız üç farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır)

İzolatların 6. ve 24. saatlere ilişkin pH değişimleri şekil 10’da gösterilmiştir.



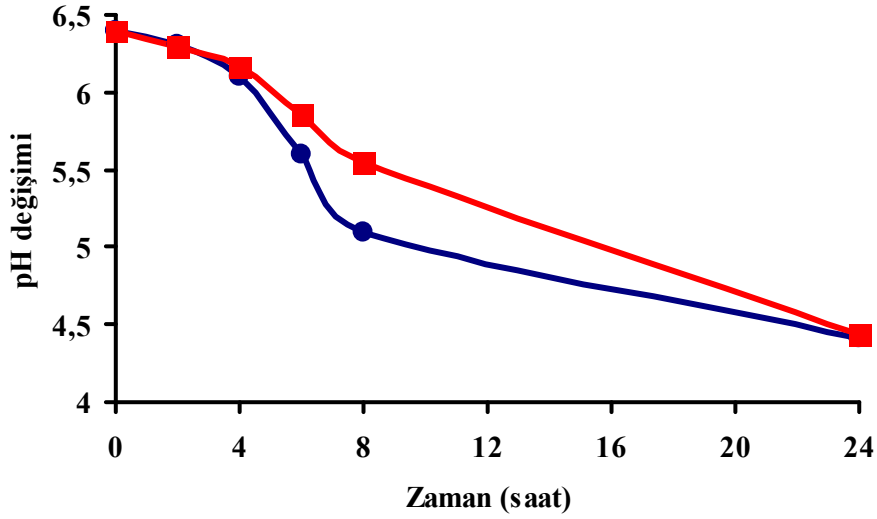
Şekil 10: Yağsız süt tozundan yeniden şekillendirilmiş sütte 6 ve 24. saatlerde izolatların pH değişimleri.

pH değişimi açısından yüksek ve düşük niteliğine sahip olan farklı *L. lactis* alttür *lactis* izolatlarının zamana bağlı olarak pH değişim eğrileri şekil 11’de gösterilmiştir. Yüksek oranda pH düşmesine sahip 10 ve 41 no’lu izolatlar 4. saat ile 8. saat arasında tipik belirgin bir düşme gösterirken 36 ve 40 no’lu izolatlar 24 saatin sonuna kadar oldukça yavaş bir pH değişimi göstermiştir.



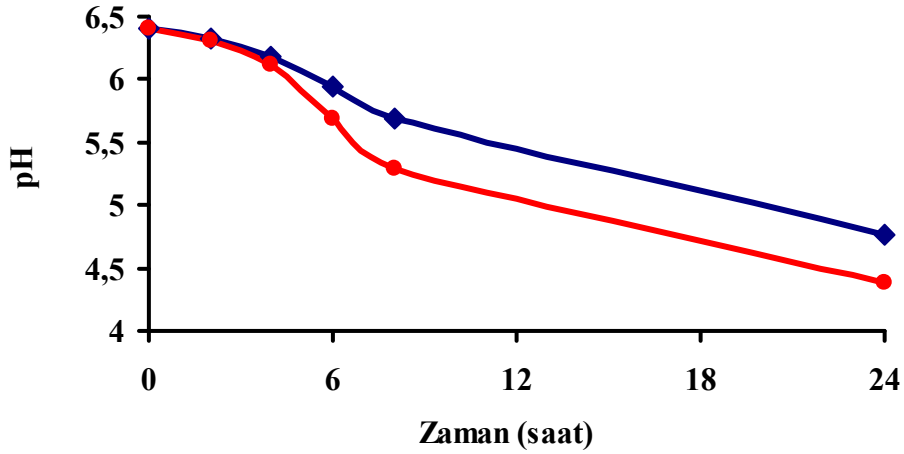
Şekil 11: Yağsız süt tozundan hazırlanan yeniden yapılandırılmış sütte yüksek ve düşük oranda pH değişimi gösteren *L. lactis* alttür *lactis* izolatlarının zamana bağlı pH değişimleri [İzolatlar: 10 (●);41 (■); 36 (▲); 40 (◆)].

İzole edildikleri ortama göre izolatların pH değişim nitelikleri arasında farklılık bulunup bulunmadığını test etmek maksadıyla Beyaz peynirlerden ve Kaşar peynirlerinden izole edilen tüm *L. lactis* alttür *lactis* izolatlarının ortalamaları karşılaştırıldı (Şekil 12). 24. saatin sonunda her iki gruba ait olan izolatlar yaklaşık olarak birbirine yakın pH değerlerine ulaşmış olsalar da değişim hızı kıyaslandığında Beyaz peynirlerden elde edilen izolatların ilk saatlerde daha belirgin bir asidifikasyon sağladığı ve farklılığın 8. saatte istatistiki açıdan önemli olduğu görüldü ($p < 0,05$).



Şekil 12: Beyaz peynir (●) ve Kaşar (■) peynirinden izole edilen *L. lactis* alttür *lactis* izolatlarının yeniden yapılandırılmış süt tozunda asitlik değışimi.

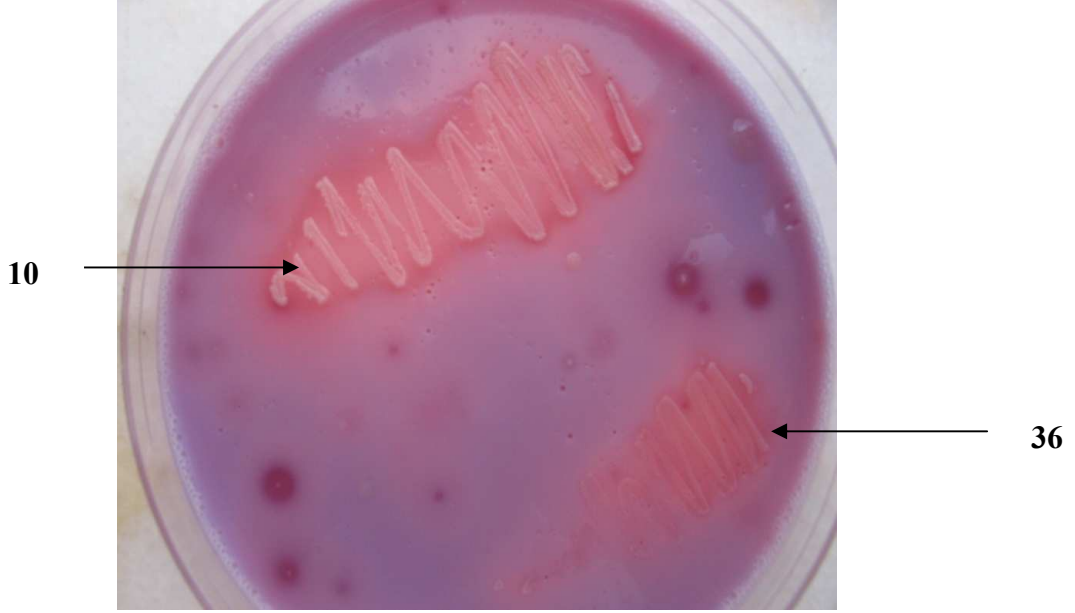
Laktis ve kremoris alttürleri arasında pH değışimi açısından farklılık olup olmadığını belirlemek için yaptığımız çalışmada gruplar arasında sayısal olarak farklılık bulunmasına rağmen istatistiki açıdan belirgin bir önemin bulunmadığı görüldü (Şekil 13) ($p > 0.05$).



Şekil 13: Tüm *Lactococcus lactis* alttür *lactis* (●) ve alttür *cremoris* (◆) izolatlarının yeniden yapılandırılmış yağsız sütteki karşılaştırmalı asidifikasyon nitelikleri.

İzolatların Proteolitik Aktivitelerinin FSDA Besiyerinde Değerlendirilmesi

İzolatların ekstrasellüler proteolitik aktivitelerini ve laktoz kullanım özelliklerini petri kutusu üzerinde belirlemek üzere FSDA besi ortamına yüzeye ekim yapılmış ve koloni büyüklüğü, yapısı, rengi ayrıca koloni çevresinde oluşan zon halkası değerlendirilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14: FSDA agarda üreyen suşların görünümü.

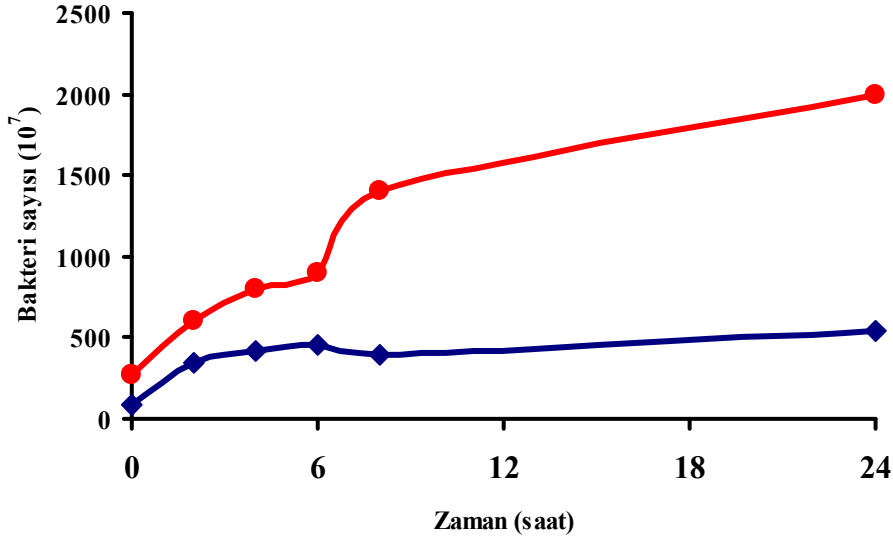
10 no'lu izolata ait koloniler daha büyük, renkleri daha koyu ve çevrelerindeki zon bölgesi daha belirgin iken 36 no'lu izolatın kolonileri küçük, saydam ve zon yoktur. Çalışmamızda test edilen izolatlardan 31 adedi hem proteolitik aktivite hem de laktoz kullanımı açısından pozitif sonuç verirken, 5 adet suş her iki teste de negatif sonuç vermiştir (Tablo13). 6 adet izolat ise laktoz kullanımı açısından negatif olarak değerlendirilirken proteolitik aktivite açısından olumlu sonuç vermiştir. Bu testte uygulanan laktoz kullanım kısmı güvenilirlik açısından asidifikasyon testlerine nazaran sınırlı oranda etkilidir.

Test edilen izolatlardan hem proteolitik aktivitesi hem de laktoz kullanımı negatif veya düşük olan suşlardan 3 tanesi (28, 30 ve 40 no'lu izolatlar) kremoris alttürüne aittir. Bu sonuçlar kremorislerin daha düşük proteoliz ve laktoz kullanım oranına sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 13: FSDA agarda izolatların proteolitik aktivitelerinin ve laktoz kullanımlarının belirlenmesi.

İzolat	Laktoz kullanımı	Proteolitik aktivite	İzolat	Laktoz kullanımı	Proteolitik aktivite	İzolat	Laktoz kullanımı	Proteolitik aktivite
1	+	+	32	-	+	50	+	+
2	+	+	34	-	+	51	+	+
4	+	+	35	-	+	52	+	+
10	+	+	36	-	-	53	+	+
12	+	+	37	-	+	54	+	+
13	+	+	39	+	-	55	+	+
15	+	+	40	-	-	56	+	+
20	+	+	41	+	+	57	-	+
23	+	+	42	+	+	59	+	+
24	+	+	43	+	+	60	+	+
27	+	+	44	+	+	61	+	+
28	-	-	46	+	+	62	+	+
30	-	-	47	+	+	63	+	+
31	+	+	48	+	+	64	-	-

L. lactis alttür. *lactis* 10 (proteaz +, laktoz +) ve *L. lactis* alttür *lactis* 36 (proteaz -, laktoz -) izolatlarının sütteki çoğalmalarına ilişkin olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmada beklendiği üzere 10 no'lu izolat zamana bağlı olarak lineer bir artış göstermiş ve 36 no'lu izolata nazaran çok daha yüksek değerlere ulaşmıştır (Şekil 15). 36 no'lu izolat inkübasyonun ilk saatlerinde 10 no'lu izolatla karşılaştırılabilir nitelikte bir gelişme gösterirken ilerleyen zamanlarda bu çoğalma tamamiyle durmuştur. Bu durum proteaz (-) özelliğe sahip olan bu izolatın ilk saatlerde sadece sütte mevcut halde bulunan peptitleri kullanması ve sınırlı ölçüde çoğalma göstermesiyle açıklanabilir. Bunun aksine, proteaz (+) olan 10 no'lu izolat inkübasyon periyodunun sonuna kadar çoğalmasını sürdürmüştür.



Şekil 15: *L. lactis* alttür *lactis* 10 (●) (proteaz +, laktoz +) ile *L. lactis* alttür *lactis* 36 (◆) (proteaz -, laktoz -) izolatlarının zamana bağlı olarak yeniden yapılandırılmış sütte üremeleri ve sayısal değerlerinin belirlenmesi. Logaritmik fazda bulunan kültürlerden % 1 oranında ekimler yapılmıştır. 0. saatten itibaren mikroorganizma sayıları 10^7 değeri üzerinden değerlendirilmiştir.

Bakteriyolitik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

İzolatların teknolojik özelliklerine ilişkin olarak test ettiğimiz niteliklerden bir diğeri de izolatların bakteriyolitik değerlerinin belirlenmesidir. İzolatların bakteriyolitik özelliklerinin belirlenmesi için izolatlarımızı gelişmenin logaritmik fazında besi ortamından aldık ve besinsel eksiklikten dolayı peptidoglikan üretim imkanının olamayacağı tamponlanmış (potasyum fosfat, 100 mM, pH 7, 30°C) ortamda inkübe ettik. 24 saatlik inkübasyonun sonrasında belirgin herhangi bir değişikliğin olmaması nedeniyle ölçümler bu saatte durduruldu. Bu nedenle 24.saat bakteriyolizin ulaşabileceği boyut olarak değerlendirildi. Bir diğer ölçüm ise 2. saatte gerçekleştirildi. Bu saatte yapılan ölçüm sonuçları ise başlangıçta yüksek bakteriyolitik niteliğe sahip izolatların belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi (bakteriyoliziz oranı). Elde edilen sonuçlara ilişkin veriler Tablo 14'te verilmiştir.

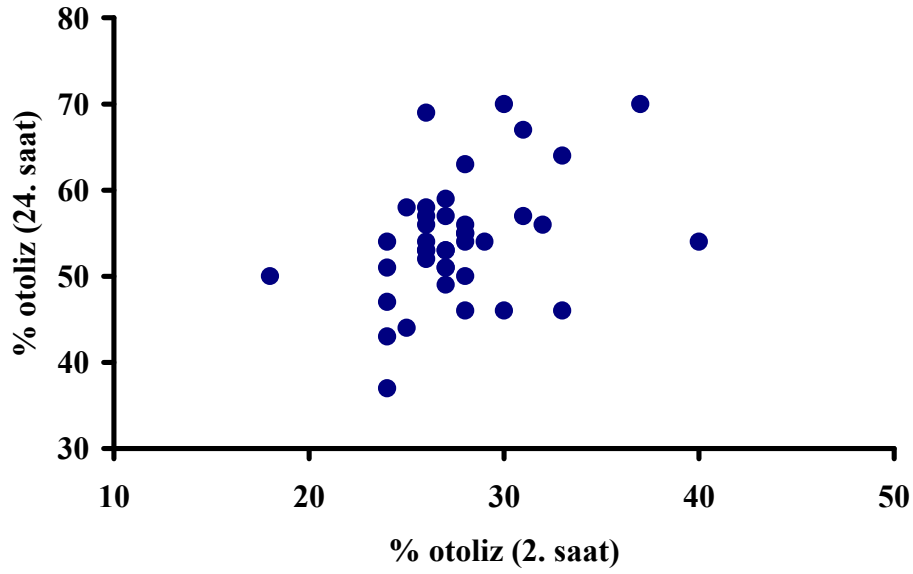
Tablo 14: İzolatların 2. ve 24. saatte ölçülen % bakteriyoliz değerleri (*).

İzolat	Bakteriyoliz (2. saat)	Bakteriyoliz (24. saat)
1	26	52
2	30	70
4	26	69
10	24	51
12	24	54
13	25	59
15	32	56
20	40	54
23	26	56
24	18	50
27	31	67
28	33	64
30	26	53
31	30	46
34	27	59
35	27	53
36	26	54
37	28	56
39	28	63
41	27	51
42	28	46
43	27	54
44	24	43
46	27	54
47	24	47
48	24	37
50	26	54
51	28	55
52	27	58
53	28	51
54	31	57
55	27	57
56	25	44
57	28	55

59	34	46
60	28	51
61	27	57
62	30	54
63	27	49
64	37	70

(*Birbirinden bağımsız 2 farklı ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır)

2. saatte yapılan ölçümlerde izolatların büyük çoğunluğu % 24-33 arasında toplanırken bir izolatın (24 no'lu izolat) % 18 ile en düşük değeri, bir izolatın da (20 no'lu izolat) % 40 ile en yüksek değeri gösterdiği saptanmıştır. Bakteriyolizinin boyutu olarak 24. saatteki veriler kıyaslandığında izolatların çoğunluğunun % 43- 60 değerleri arasında toplandığı görülmüştür (Şekil 16). 6 adet izolatın % 60'ın üzerinde bakteriyoliz (2, 4, 27, 28, 39 ve 64 no'lu izolatlar) göstererek yüksek nitelikte bakteriyolitik aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Yüksek bakteriyolitik aktiviteye sahip olan izolatlardan 3 adedinin kremoris alttürüne ait olması bu alttürdeki mikroorganizmaların bakteriyolizise daha yatkın olabileceğini göstermektedir. 24 saatte yapılan ölçümlerde test edilen izolatlardan 1 tanesi % 37 (48 no'lu izolat) seviyesinde bakteriyoliz göstererek en düşük seviyede kalmıştır. 2 no'lu izolat ise % 70 seviyesinde bakteriyoliz göstererek en yüksek seviyede kalmıştır. Kremoris ve laktis izolatları arasında otoliz açısından farklılık bulunup bulunmadığı değerlendirildiğinde, kremoris izolatlarının 24 saat sonundaki ortalamalarının % 64 olduğu laktis izolatlarının ise daha düşük seviyede kaldıkları ve ortalama % 53 oranında otoliz gösterdikleri belirlendi.



Şekil 16: 2. ve 24. saatlerde bakteriyoliz oranı ve boyutunun şematize edilmesi.

Bakteriyofaj aranması

Mikroorganizmaların bakteriyolitik özellikleri kendi otolizlerine bağlı olabileceği gibi bakteriyofajların litik aktiviteleri sonucunda da şekillenebilir. Çalışmamızda bütün izolatlar bakteriyofaj açısından test edilememiştir. 4, 10, 20, 24, 30, 36, 40, 42, 47 ve 52 no'lu izolatlar rastgele seçilmiş ve test edilmiştir. Sadece 36 no'lu izolat hazırlanan bakteri örgüsü üzerinde belirgin lizis oluşumuna yol açarak bakteriyofajlar açısından pozitif sonuç vermiştir. Bakteriyofaj içeren bu izolatın bakteriyolitik özelliğinin orta seviyede olduğu ve 24 saatin sonunda % 54 lizis gösterdiği bakteriyolitik aktivite sonuçlarından görülmektedir.

Bakteriyolizisin daha detaylı bir şekilde değerlendirilmesi için tüm izolatların test edilmesi, ayrıca lizojen niteliğe sahip olan izolatların da belirlenmesi için mitomisin C endüksiyonunun da yapılması gerekmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Peynirlerde asitlik gelişimi, istenen niteliklere özgü lezzet oluşumu ile tekstürel yapının şekillenmesi peynirin pıhtılaşması, süzülüp baskıya alınması ile başlayan olgunlaşma sırasında da devam eden glikoliz, lipoliz ve proteoliz olaylarının kontrollü bir şekilde yürütülmesine bağlıdır. Olgunlaşma neticesinde ortaya çıkan organik asitler, yağ asitleri ve aminoasitler peynirin kalitesinde rol oynamaktadır. pH, süt ve süt ürünlerinde gerçek asitlik olarak bilinmekte, serbest ve aktif hidrojen iyonu ile dengede bulunan toplam maddeler tarafından oluşturulmaktadır.

Süt ürünleri üretiminde ve özellikle peynir üretiminde bahsedilen bu olayların kontrollü bir şekilde yürütülmesi oldukça zor bir işlemdir. Uygulanan üretim tekniklerindeki farklılıklarla birlikte sütün kalitesi ve kullanılan kültürlerin nitelikleri son ürünlerdeki kalitede önemli rol oynamaktadır. LAB içerisinde özellikle laktokoklar genel manada peynir kültürü olarak bilinmekte ve bilinen birçok peynir türünde yalnız başlarına veya diğer kültür olarak kullanılan mikroorganizmalarla kombine olarak kullanılmaktadırlar. Tez çalışmamızda Besin Hijyeni ve Teknolojisi laboratuvarında daha önce peynirlerden izole edilip moleküler düzeyde tanımlanmış olan laktokok izolatlarının glikolitik özellikleri, proteoliz kapasiteleri, otolitik nitelikleri ve belirli sayıda izolata bakteriyofaj bulundurup bulundurmadıkları incelenmiştir. Glikoliz veya asidifikasyon niteliği olarak izolatlar hem laktoz içeren M17 besi ortamında hem de yeniden yapılandırılmış sütte inkübe edilmişlerdir. M17 besi yerinin tampon kabiliyetinin yüksek olması dolayısıyla pH daki zamana bağlı düşme 24. saatin sonunda yüksek asidifikasyon niteliğine sahip izolatlarla bile 5.37 seviyesinin altına inmedi. Bu sonuçlara göre izolatların asidifikasyon niteliklerinin belirlenmesinde sıvı besiyerinin yeterince uygun olmadığı görülmektedir. Yağsız süt tozundan yeniden hazırlanarak yapılan sütte ise izolatların daha heterojen bir şekilde dağılırarak, daha zengin bir profil ortaya çıkardıkları gözlemlendi. Sekizinci saatin sonunda 19 adet izolat yavaş (pH 5.5-6.0), 8 izolat orta (pH 5.2-5.5) değer gösterirken 15 izolat hızlı pH düşüşü sağladı (pH 4.6-5.2). 24. saatin sonunda izolatların büyük çoğunluğu pH 5 değerinin altında bulundu. Farklı süt ve ürünlerinden izole edilen farklı izolatların asit üretim hızları hakkında değişik veriler mevcuttur. İspanya'da keçi sütünden yapılan Cabrales peynirinden elde edilen laktokokların çoğunun yavaş asit üreten izolatlar olduğu 6 saatin sonunda izolatların sadece % 11'inin hızlı bir asit üretimi gösterdiği rapor edilmiştir (308). Benzer şekilde Centeno ve arkadaşları (309) inek sütünden yapılan Arzua peynirinden izole edilen laktokokların yavaş asidifikasyon

özelliğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Cogan ve arkadaşları (310) 1582 laktokok izolatının teknolojik niteliklerinin belirlenmesi üzerine rekostitüe edilmiş yağsız süt kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada izolatların % 8.3' ünün 6. saat sonunda ortamın pH'sını 5.3 değerinin altına düşürdüğünü göstermiştir. Keçi sütlerinden ve Valdeteja peynirlerinden izole edilen *L. lactis* alttür *lactis* izolatlarının asit üretim oranları üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise (311) 20 adet izolatın hızlı asidifikasyon gösterdiği 25 izolatın ise belirgin seviyede daha yavaş asidifikasyon gösterdiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda bir bütün halinde Beyaz peynirlerden ve Kaşar peynirlerinden elde edilen izolatların 8 saatteki pH düşüşündeki hızları kıyaslandığında Beyaz peynirden elde edilenlerin daha hızlı düşüş sağladıkları ve bu özellik göz önünde bulundurulduğunda endüstriyel kültür seçimi açısından Beyaz peynir izolatlarının daha uygun olabilecekleri saptandı. Bu durum ayrıca laktokokların Beyaz peynir ortamına daha uygun olmasıyla da açıklanabilir.

Peynir yapım basamaklarında pH'daki hızlı düşüş; koagülasyonun şekillenmesi ve harici mikrofloranın gelişiminin engellenmesinde büyük öneme sahiptir. Hızlı ve orta seviyeli asidifikasyon özelliği gösteren suşlar, birincil starterler için gereklidir. Daha az asidifikasyon özelliği gösteren suşlar ise, yardımcı kültür olarak diğer özelliklerinden faydalanılmak üzere kullanılabilirler. Bu nedenle son yıllarda çok daha iyi kalitede peynir üretimini sağlamak amacıyla kullanılmak üzere doğal ortamda bulunan yeni suşların tanımlanması ve değerlendirilmesi üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bu suşlar, starter olarak peynir yapımında biofarklılığı arttırmak, farklı tat ve lezzet oluşumu sağlamak, ve geleneksel peynirlerin kendine özgü karakteristik özelliklerini iyileştirmek amacıyla kullanılabilirler.

Peynirlerin olgunlaşma sürecinde kazeinin starter kültürlerce parçalanması öncelikle laktokokların hücre duvarında bulunan ve spesifitelerine göre PI ve PIII olarak adlandırılan iki özel proteinaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. PI tip proteinaz aktivitesini β ve K-kazein üzerine göstermektedir. PIII tip proteinaz ise aktivitesini α S1, β - ve K- kazeinleri üzerine göstermektedir. Kazeinin bu şekilde parçalanması sonucunda bir çok farklı yapı ve büyüklükte oligonükleotitler şekillenmekte ve bunlar da laktokokların çoğalmasında esansiyel rol oynamaktadır (312, 145). Tez çalışmamızda Prot (+) ve Prot (-) özelliğe sahip iki farklı izolatın süt tozundan hazırlanan sütteki gelişim süreçleri incelendiğinde Prot (-) özelliğe sahip 36 no'lu izolatın inkübasyonun ilk saatlerinde normal bir gelişim gösterdiği ancak ilk saatlerden sonra bu gelişimin durduğu saptanmıştır. Bunun aksine Prot (+) özelliğe sahip 10 no'lu izolatın inkübasyon periyodunun sonuna

kadar gelişimini sürdürdüğü belirlenmiştir. Bu durum, Prot (-) izolatın inkübasyonun ilk aşamasında ortamda bulunan serbest aminoasit ve oligonükleotitleri kullanarak gelişimini sürdürdüğü ancak bunların tükenmesiyle proteaz aktivitesi bulunmadığından kazeini parçalayamadığı ve gelişemediği şeklinde yorumlanabilir. Bunun aksine Prot (+) izolat ise gereksinim duyduğu proteik kaynağı enzimleri vasıtasıyla elde edebilmekte ve sonuç olarak gelişimini sürekli olarak devam ettirmektedir.

Hücre duvarında bulunan bu proteazların aktiviteleri sonucunda şekillenen oligopeptitler daha sonraki aşamada transport sistemleriyle hücre içerisine taşınmaktadır. Hücre içine alınan peptitler, son aşamada, peptidaz sistemleri tarafından serbest aminoasitlere kadar parçalanmaktadır (138, 313). Aminoasitlerin de katabolizma neticesinde parçalanmasıyla peynirlerin tipik aroma ve lezzetini veren aromatik bileşikler şekillenmektedir (314). Çalışmamızdaki proteoliz kısmı sadece birincil derecede proteazların aktivitelerini test edecek seviyededir. Proteolizin uygun ve kapsamlı bir şekilde belirlenebilmesi için aminopeptidazik aktivitelerin ve daha da ilerisinde katabolizmadan sorumlu olan enzimlerin in-vitro ve in-vivo koşullarda belirlenip test edilmesi gerekmektedir.

Aminoasit katabolizmasından sorumlu olan enzimler intrasellüler olarak kodlanmıştır ve proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayacak peptit sinyal içermemektedir (314). Bu enzimlerin peynir matrisine ulaşabilmeleri ve aktiviteleri neticesinde aromatik bileşenlerin oluşabilmesi için starter kültürlerin hücre bütünlüğünün bozulması gerekmektedir. Bu aşamada bakteriyolitik enzimler devreye girmektedir. Bakteriyolitik enzimler ya hücrenin kendisi tarafından üretilen otolizimler olabilir ya da bakteriyofajlar tarafından üretilen bakteriyolizimler olabilir (157). Peynir olgunlaşması esnasında bakteriyolizisin belirlenmesinde bazı zorluklar vardır. Sadece canlı bakteri sayısının belirlenmesi lize olan bakteri sayısını belirlemede yeterli değildir. Çünkü lize olmayan ancak besi yerinde gelişemeyecek derecede hasar görmüş veya canlılığını yitirmiş bakteriler de olabilir. Bu açıdan kesin belirteç olarak hücre içi enzimlerin seçilmesi ve bu enzimlerin zaman içerisinde peynir ortamına salınımlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Boutrou ve arkadaşları (132) kültür olarak kullanılan mikroorganizmaları bakteriyolitik özelliklerine göre düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 gruba ayırmışlardır. Yaptıkları çalışmayla hücre lizisinin, peynirin olgunlaşmasında pozitif yönde etki ettiğini göstermişlerdir. Peynirde proteolizisin yüksek oranlarda şekillenmesi, yüksek otolitik kapasiteli kültürlerin kullanımına bağlıdır.

Tez çalışmamızda bakteriyel lizi belirlemek amacıyla, uygulanması kolay ve zaman almayan bir test kullandık. Bu test besinsel olarak kısıtlanmış bir ortam oluşturup mikroorganizmaların gelişimlerinin durduğu, hücre duvarı sentezinin engellendiği ancak bakteriyolitik enzim aktivitesinin devam ettiği bir ortamda aktivitenin test edilmesi esasına dayanır (315). Laktokokların tamponlanmış sıvı ortamında test edilmesine dair optimal koşullar daha önce çalışılmıştır (173). 100 mM iyonik konsantrasyondaki potasyum veya sodyum fosfat ortamı (pH 6.7-7.0, 30°C ortam ısısı) logoritmik fazda bulunan mikroorganizmalar için en ideal bakteriyoliz ortamı olarak belirlenmiştir. Bu koşullar mikroorganizmaya göre değişkenlik göstermektedir. Ostlie ve arkadaşları (316) propionibakterilerin otolizlerini tamponlanmış ortamda incelemişler ve logoritmik fazdaki mikroorganizmaların durağan fazdakilere nazaran daha kolay lize olduklarını ayrıca optimal koşulların 7.2 pH değerinde, 30-40°C’de, 50 mM potasyum fosfat ortamında şekillendiğini rapor etmişlerdir. *Lb. bulgaricus* ve *Lb. casei*’nin bakteriyolizinin belirlendiği bir diğer çalışmada optimal koşulların 40 °C’de erken logoritmik fazda ve 0,2 mM NaCl ortamında şekillendiği rapor edilmiştir (317). *Lb. pentosus*’un otolizinin optimal olarak 6.5 pH da 30 °C de 50 mM potasyum fosfat tamponunda gerçekleştiği ve bu ortamda test edilen 9 adet suşun % 34 ile 94 arasında lizis gösterdiği belirtilmiştir (318). Bizim çalışmamızda 24 saatlik inkübasyon sonrasında izolatların büyük çoğunluğunun orta düzeyde otoliz gösterdikleri ve % 50 ile 60 arasında değişen bir değer gösterdiği saptandı. Sadece dört adet izolat % 65’in üzerinde otoliz gösterirken bir izolatın % 37 seviyesinde otoliz gösterdiği saptandı.

Crow ve arkadaşları (165) laktis alttürünün lizise daha dayanıklı olduğunu ve kremoris alttürüne oranla daha düşük seviyede otoliz gösterdiğini rapor etmiştir. Çalışmamızdaki kremoris izolatı sayısı sınırlı olmakla birlikte, yüksek otoliz gösteren izolatların çoğunun kremoris olması bu bulguyu destekler niteliktedir. Aynı araştırmacılar peynir olgunlaşma sürecinde de kremorislerin daha yüksek seviye de otoliz gösterdiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, Langsrud ve arkadaşları (319) tamponlanmış ortamda kendi koleksiyonlarındaki laktis izolatlarının kremorislerle oranla daha yüksek oranda otoliz gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Otoliz verileri kıyaslanarak % 65 üzerinde otoliz gösteren izolatların potansiyel olarak endüstriyel amaçlı kullanılabilirliklerinin uygun olduğu düşünülebilir. Ancak sadece bakteriyoliz kriteri yalnız başına seçilmemelidir. % 65 üzerinde liz gösteren bu izolatların asidifikasyon ve proteolitik özellikleri değerlendirildiğinde % 70 otoliz gösteren

64 no'lu izolatin proteaz (-) olduğu ve sütteki pH'yı 8. saatte ancak 5.89 değerine kadar düşürdüğü görülmektedir. Peynir yapımında böyle bir izolat yeterli asidifikasyon sağlayamayacağı için uygun bir aday değildir. Benzer durum % 69 ve % 70 oranında bakteriyoliz gösteren 2 ve 4 no'lu izolatlar içinde kısmen geçerli olabilir. Bu iki kremoris izolatu da proteaz (+) olmalarına rağmen sütün pH'sını 8. saatin sonunda 5.48 ve 5.58 değerine kadar düşürebilmişlerdir. Bu durum bu iki izolatin peynirdeki asidifikasyonun sağlanması açısından yeterince uygun olmadıklarını göstermektedir. 27 no'lu laktis izolatu hem % 67 otoliz, hem proteaz (+) hem de 8. saatin sonunda sütün pH'sını 4.76 seviyesine düşüren uygun bir izolat olarak görülmektedir. Dolayısıyla peynir yapımında kullanılması uygun olabilecek bir izolat olarak görülebilir. % 43 ile % 54 arasında orta seviyede otoliz gösteren 12, 31, 41, 44 ve 53 no'lu izolatlar asidifikasyon nitelikleri göz önünde bulundurulduğunda 8. saatin sonunda pH'yı 4.6 ile 4.77 seviyesine düşürdükleri gözlenmiştir. Laktis alttürüne ait olan bu izolatların hepsi proteaz (+) özelliğe sahip olup peynircilikte potansiyel aday olarak kullanılabilir.

Elde edilen veriler ışığında Beyaz peynir ve Kaşar peynirlerinden izole edilen izolatların teknolojik bazı nitelikleri belirlenmiştir. Endüstriyel koşullarda starter kültürler kombine olarak farklı oranlarda kullanılarak ürüne katıldığından dolayı hem otolitik aktivitesi yüksek olan hem de asidifikasyon niteliği yüksek olan suşların birlikte kullanılması veya diğer niteliklere sahip olan izolatların da katılması uygun kabul edilmektedir. Çalışmamızda incelenen bu özellikleriyle birlikte faj dirençlilik testleri ile bakteriyosin üretim özelliklerinin de belirlenmesi izolatların daha iyi tanımlanması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- 1) TEKİNŞEN OC. Süt Ürünleri Teknolojisi. Üçüncü baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, sayfa: 135-215, 2000.
- 2) KONAR A. Süt Teknolojisi. Ç.Ü.Zir. Fak. Genel yayın No:140, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset ve teksir atölyesi, Adana, 198.sayfa, 1998.
- 3) İNAL T. Süt ve Süt ürünleri Hijyen ve Teknolojisi, Final ofset A.Ş. İstanbul, 1990.
- 4) TEKİNŞEN OC, ATASEVER M, KELEŞ A. Süt Ürünleri Üretim, Kontrol. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 1997.
- 5) DEMİRCİ M, ŞİMŞEK O, TAŞAN M. Ülkemizde yapılan muhtelif tip peynirler. II. Milli Süt Ürünleri sempozyumu, Her Yönüyle Peynir, Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:125, Tekirdağ, 1994.
- 6) YETİŞMEYEN A. Süt Teknolojisi. A.Ü.Ziraat Fakültesi yayın no:1420, Ankara, 229.sayfa, 1995.
- 7) ÜÇÜNCÜ M. Süt Teknolojisi, 5.baskı, Ege Üniv. Ege Meslek Yüksekokulu Basımevi, 5. Baskı, sayfa: 1-25, İzmir, 2002.
- 8) GRAPPIN R, BEUVIER E. Possible implications of milk pasteurisation on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7: 751-761, 1997.
- 9) BOLYLSTON TR, VINDEROLA CG, GHODDUSI HB, REINHEIMER JA. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14(5): 375-387, 2004.
- 10) TEUBER M. Strategies for genetic modification in lactic acid bacteria. *Food Biotechnology*, 4: 537-546, 1990.
- 11) GAUTHIER KG, GRATADOUX JJ, RICHARD J. Conjugal plasmid transfer between lactococci on solid surface matings and during cheese making. *FEMS Microbiology Ecology*, 85: 133-140, 1991.
- 12) RENAULT P. Progress in genetic research of lactic acid bacteria. *Current Advances in Genetics*, 10: 15-37, 1996.
- 13) HELLINCK S, RICHARD J, JULLIARD F. The Effects of Adding Lactococcal Proteinase on the Growth Rate of *Lactococcus lactis* in Milk Depend on Type of Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2124-2130, 1997.
- 14) MC SWEENEY PLH, SOUSA MJ. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80: 293-324, 2000.
- 15) BINTSIS T, ROBINSON RK. A study of the adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 88(3): 435-441, 2004.
- 16) CHRISTENSEN JE, DUDLEY EG, PEDERSON JA, STEELE JL. Peptidases and aminoacid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 217-246, 1999.
- 17) AXELSSON L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN S, VON WRIGHT A. Eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1-72, 1998.
- 18) CARR FJ, CHILL D, MIADA N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28: 281-370, 2002.
- 19) KLEIN G, PACK A, BONAPARTE C, REUTER G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 41: 103-125, 1998.

- 20) HAMMES WP, VOGEL RF. The genus *Lactobacillus*. in " The genera of lactic acid bacteria. The Lactic Acid Bacteria volume:2", Editors: Wood BJB. HOLZAPFEL WH, CHAPMAN and HALL, 2-6 Boundary Row, London, SE1 8HN, UK,19-55p, 1995.
- 21) BANKS J, WILLIAMS AG. The Role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3): 142-152, 2004.
- 22) DURLU-ÖZKAYA F, XANTHOPOULOS V, TUNAİL N, LITOPOULOU-TZANETAKİ E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw Ewe's Milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 861-870, 2001.
- 23) STILES ME, HOZAPFEL WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29, 1997.
- 24) STILES M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 331-345, 1996.
- 25) FOX PF, O'CONNOR TP, MCSWEENEY PLH, GUINEE TP, O'BRIEN NM. Cheese: physical chemical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39: 163-328, 1996.
- 26) HAYALOĞLU AA. Starter kültür olarak kullanılan bazı *Lactococcus* suşlarının beyaz peynirlerin özellikleri ve olgunlaşmaları üzerine etkileri. Doktora tezi, Ç.Ü. Fen. Bil. Enst. Gıda Müh. ABD., Adana, 2003.
- 27) SALMINEN S, VON WRIGHT A. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker. Inc.,1998.
- 28) KOSIKOVSKI FV, MISTRY VV. Cheese and fermented milk foods. Edited by F.V. Kosikovski: Kosikovski LLC, Westport, Connecticut, 1997.
- 29) ÜNLÜTÜRK A, TURANTAŞ F. Gıda Mikrobiyolojisi, Meta matbaacılık, üçüncü baskı, Bornova, İzmir, sayfa: 425-443, 2003.
- 30) RAHA A, ROSS E, YUSOFF K, MANAP MY, IDERIS A. Characterization and molecular cloning of an erythromycin resistance of *Lactococcus lactis* isolated from chicken cecum. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, vol.6(1): 7-11, 2002.
- 31) HASEN BV, HOULBERG U, ARDÖ Y. Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal*, 11: 225-233, 2001.
- 32) GERASI E, LITOPOULOU-TZANETAKI E, TZATENAKIS N. Microbiological study of manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the grek island sifnes. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2): 117-122, 2003.
- 33) MADKOR SA, TONG PS, EL SODA M. Ripening of cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of *Lactobacilli*. *Journal Dairy Science*, 83: 1684-1691, 2000.
- 34) BERESFORD TP, FITZSIMONS NA, BRENNAN NL, COGAN TM. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*,11:259-274, 2001.
- 35) BERESFORD TP. Non-starter lactic acid bacteria (nslab) and cheese quality. *Dairy processing: improving quality (SMİT G)*, CRS pres, woodhead publishing limited, Cambridge, England, 448-469, 2003.
- 36) OYETAYO VO, ADETUYI FC, AKINYOSOYE FA. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *African Journal of Biotechnology*, 2: 448-452, 2003.
- 37) STACKEBRANDT E, TEUBER M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 317-324, 1988.
- 38) THOMPSON J. Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. *Biochimie*, 70: 325-336, 1988.
- 39) DEMİRCİ M. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Rebel Yayıncılık, birinci baskı, sayfa 37-55, 2000.

- 40) DELLAGLIO F. Starters for fermented milks. Section 3, Thermophilic starters. IDF Bulletin, 227: 27-34, 1988.
- 41) BEASLEY S. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Doctoral thesis, Helsinki, Finland, 2004.
- 42) COGAN TM, DALY C. Cheese starter cultures, In: Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Vol.1, Ed.by FOX F, Elsevier Applied Science Publication, London, 1987.
- 43) KOSIKOWSKI F. Cheese and fermented milks. 2 nd. Ed. Edwards Brothers Inc. Ann Arbor and Michigan, 1977.
- 44) ROBINSON RK. Dairy Microbiology-The Microbiology of Milk Products. Second Ed. Vol:2, Elsevier and New York, 1990.
- 45) ÖZALP E. Süt ürünlerinde starter kültürler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 35(1): 6-15, 1988.
- 46) SHARPE M.E. Lactic acid bacteria in the dairy industry. Japanese Society of Dairy Technology, 32(2): 9-18, 1979.
- 47) YAYGIN H. Gıda ve süt endüstrisinde yararlanılan mikroorganizmalar. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(2): 363-373, 1988.
- 48) TEKİNŞEN OC, ATASEVER M. Süt ürünleri üretiminde starter kültürler, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 1994
- 49) COGAN TM, JORDON KN. Metabolism of the Leuconostoc bacteria. Journal of Dairy Science, 77:2704-2717, 1996.
- 50) ADAMS MR, MOSS MO. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995.
- 51) JAY JM. Modern Food Microbiology. Fourth edition, Chapman and Hall, London, 1992.
- 52) SHARECK J, CHOI Y, LEE B, MIGUEZ CB. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. Critical Reviews in Biotechnology, 24(4): 155-208, 2004.
- 53) VAN DAMME P, POT B, GILLIS M, DE VOS P, KERSTERN K, SWINGS J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology Reviews, 60: 407-438, 1996.
- 54) DALEZIOS I, SIEBERT KJ. Comparison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology, 91: 225-236, 2001.
- 55) SAVIJOKI K, INGMER H, VARMANEN P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 71: 394-406, 2006.
- 56) SCHLEIFER KH, KILPPER-BÖLZ R. Molecular and chemotaxonomic approaches for classification of Streptococci, Enterococci, and Lactococci; a review. Systematic and Applied Microbiology, 10: 1-19, 1987.
- 57) SCHLEIFER KH, R.KILPPER-BÖLZ. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 34: 31-34, 1984.
- 58) FACKLAM R, ELLIOTT JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci, American Society for Microbiology, p.479-495, vol.8, No.4, 1995.
- 59) FACKLAM RR, HOLLIS D, COLLINS MD. Identification of gram positive coccid and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. Journal of Clinical Microbiology, 27: 724-730, 1989.
- 60) TAILLIEZ P, TERMBLAY J, EHRLICH SD, CHOPIN A. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Systematic and Applied Microbiology, 21: 530-538, 1998.

- 61) SALAMA MS, SANDINE WE, GIOVANNONI SJ. Isolation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA Probes. Applied and Environmental Microbiology, 59: 3941-3945, 1993.
- 62) JARVIS AW, JARVIS BD. Deoxyribonucleic acid homology among lactic streptococci. Applied and Environmental Microbiology, 41: 77-83, 1981.
- 63) KILPPER-BÖLZ R, FISCHER RG, SCHLEIFER KH. Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. Current Microbiology, 7: 245-250, 1982.
- 64) SCHLEIFER KH, KRAUS J, DROVAK G, KLIPPER-BÖLZ R, COLLINS MD, FISCHER W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, 6: 138-195, 1985.
- 65) FRANZ CMAP, STILES ME, SCHLEIFER KH, HOLZAPFEL WH. Enterococci in foods-a conundrum for safety. International Journal of Food Microbiology, 88:105-122, 2003.
- 66) KIMOTO H. In vitro studies on probiotic properties of lactococci. Milchwissenschaft, 55: 245-249, 2000.
- 67) GOYACHE J, GIBELLO A, BLANCO M, BRIONES V, GONZALEZ S, TELLEZ S, BALLESTEROS C. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: First confirmation in animals. Emerging Infections Diseases, 7: 884-886, 2001.
- 68) BASARAN P, BASARAN N, CAKIR I. Molecular Differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific-PCR. Current Microbiology, 42: 45-48, 2001.
- 69) HOLT GH, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT, WILLIAMS ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Ninth edition, 787p., 1994.
- 70) HOLZAPFEL WH, HABERER P, GEISEN R, BJÖRKROTH J. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. American Journal of Clinical Nutrition. 73: 3655-3735, 2001.
- 71) PLATTEUW C, HUGENHOLTZ J, STARRENBURG I, DE VOS WM. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*; influence of the overproduction of α -acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. Applied Environmental Microbiology, 61:3967, 3971, 1995.
- 72) ERLANDSON K, BATT CA. Strain-specific differentiation of lactococci in mixed starter cultures using randomly amplified polymorphic DNA-derived probes. Applied Environmental Microbiology, 63: 2702-2707, 1997.
- 73) GARVER KI, MURIANA PM. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. International Journal of Food Microbiology, 19:241-258, 1993.
- 74) GARVIE EI, FARROW JAE, PHILLIPS BA. A taxonomic study of some strains of streptococci that grow at 10°C but not at 45°C. Including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.1 Orig.Reihe C, 2:151-165, 1981.
- 75) SCHLEIFER KH. Gram positive cocci. In p.II. SNEATH A, MAIR NS, SHARP ME, HOLT JG.(ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams Wilkins Co., Vol.2, 999-1002, 1986.
- 76) BEIMFOHR C, KRAUSE A, AMANN R, LUDWIG W, SCHLEIFER KH. In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci. Systematic and Applied Microbiology, 16:450-456, 1993.
- 77) CANCELLA MR, POWELL IB, HILLIER AJ, DAVIDSON BE. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction

- phosphorus-32 and fluorescent labels. *Applied Environmental Microbiology*, 58: 1772-1775, 1992.
- 78) KLIJN NH, DE VOS WM. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16s rRNA and specific DNA probes. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 3390-3393, 1991.
- 79) NZUOZI NL, GEURIN MF, HAYES DH. Comparison of electrophoretic distribution patterns of ribosomal RNA gene restriction fragments and ribosomal subunit proteins of lactococci, streptococci and pediococci, *Biochimie*, 74: 1007-1017, 1992.
- 80) COLLINS MD, PHILLIPS BA, ZANONI P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp., nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans* and *Lactobacillus rhamnosus* sp., nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39: 105-108, 1989.
- 81) POT B, VANDAMME P, KERSTERS K. Analysis of electrophoretic, whole organism protein fingerprints. in chemical methods in prokaryotic systematics ed. Goodfellow M and O'DONNELL AG. pp:493-521, Chichester, J. Wiley, 1994.
- 82) HENRIKSEN CM, NILSON D, HANSEN S, JOHANSEN E. Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr.HansenA/5. *International Dairy Journal*, 9:17-23, 1999.
- 83) BEYER NH, ROEPSTORFF P, HAMMER K, KILSTRUP M. Proteome analysis of the purine stimulated from *Lactococcus lactis*. *Proteomics*, 3: 786-797, 2003.
- 84) MEIJER WC, HUGENHOLTZ J. Proteolytic enzyme activity in lactococci grown in different pretreated milk media. *Journal of Applied Microbiology*, 2: 139-146, 1997.
- 85) BALLESTEROS C, POVEDA JM, GONZALEZ-VINAS MA, CABEZAS L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17: 249-255, 2006.
- 86) DUTHOIT F, CALLON C, TESSIER L, MONTEL M.C. Relationships between sensorial characteristics and microbial Dynamics in "registered designation of origin" salers cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 259-270, 2005.
- 87) FERNANDEZ DE PALENCIA P, DE LA PLAZA M, AMARITA F, REQUENA T, PELAEZ C. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme Microbiology Technology*, 38: 88-93, 2006.
- 88) AYAD EHE, VERHEUL A, ENGELS WJM, WOUTERS JTM, SMIT G. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 59-67, 2001.
- 89) AMARITA F, DE LA PLAZA M, FERNANDEZ DE PALENCIA P, REGUENA T, PELAEZ C. Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. *Food Chemistry*, 94: 240-246, 2006.
- 90) COGAN TM, O'DOWD M, MELLERICK D. Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leucunostoc lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 1-8, 1981.
- 91) KOBAYASHI M, NOMURA M, FUJITA Y, OHMOMOS S, OKAMOTOT T. Molecular characterization of a lactococcal plasmid reducing the growth rate of host cells. *Japan Agricultural Research*, 37 (1): 53-57, 2003.
- 92) BEIMFOHR C, LUDWIG W, SCHLEIFER KH. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 216-221, 1993.
- 93) LEEWATCHARAMAS V, CHIA LG, CHAROENCHAI P, KUNAJAKR N, LIU C, DUNN NW. Plasmid-encoded copper resistance in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Letters*, 19: 639-643, 1997.

- 94) AKÇELİK M. Plasmid mediated industrial traits in *L. lactis* subsp. *lactis* LL140. *Milchwissenschaft*, 54: 603-606, 1999.
- 95) FEIRTAG JM, PETZEL JP, PASALADOS E, BALDWIN KA, MCKAY LL. Thermosensitive plasmid replication temperature-sensitive host growth and chromosomal plasmid conferred by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Lactose plasmids in by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 539-548, 1991.
- 96) KRONENBURG V, de VOS WM. Characterization of multiple region involved replication and mobilization of plasmid pn24000 coding for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 18: 5285-5290, 1998.
- 97) PU ZY, DOBOS M, LIMSOWTIN GKY, POWELL IB. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 353-361, 2002.
- 98) GILLIAND SE. Role of starter culture bacteria in food preservation in bacterial starter cultures for foods. CRS Press Inc. Florida. USA, 1986.
- 99) ZAMFIR M, VANCANNEYT M, MAKRAS L, VANINGELGEM F, LEFEBVREK K, POT B, SWINGS J, DE VUYST L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 487-495, 2006.
- 100) EL SODA M, MADKAR SA, TONG PS. Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *Journal of Dairy Science*, 83: 609-619, 2000.
- 101) ROSS RP, FITZGERALD G, COLLINS K, STANTON C. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57: 71-78, 2002.
- 102) FLAMBARD B, RICHARD J, JUILLARD V. Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Applied Environmental Microbiology*, 2131-2135, 1997.
- 103) MORALES P, GARCIA EF, GAYA P, NUNEZ M. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 13: 201-209, 2003
- 104) STADHOUDERS J, VERINGA HA. Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27: 77-91, 1973.
- 105) ÖZTEK L. Peynirlerde olgunlaşma ve buna etki eden faktörler. Her yönüyle peynir. T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları, Tekirdağ, 125, 121-137, 1991.
- 106) WALLACE JM, FOX PF. Effect of adding free amino acids Cheddar Cheese curd of proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal*, 7: 157-167, 1997.
- 107) FOX PF, WALLACE JM, MORGAN S, LYNCH CM, NILAND EJ, TOBIN J. Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 271-297, 1996.
- 108) ROUDOT-ALGARON F, YVON M. Le catabolisme des acides amines aromatiques et des acides amines a chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*. *Le lait*, 77: 139-146, 1998.
- 109) KOÇAK C, YETİŞMEYEN A, ATAMER M. Süt endüstrisinde starter kültürler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 1362, 1994.
- 110) TUNAİL N. Beyaz peynir yapımında saf kültür kullanımı ve yaraları. Beyaz peynir sempozyumu, Korunca matbacılık, İzmir, 41-47, 1983.
- 111) URAZ T. Peynir teknolojisinin genel prensipleri. SEGEM Genel Müdürlüğü, yayın no:103, Ankara, 1981.
- 112) DE VOS WM, SIMMONS G. Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho- β galactosidase genes and their expression products. *Biochimie*, 70: 461-473, 1988.

- 113) SALAMA MS, MUSAFIJAJEKNIC T, SANDINE WE, GIOVANNONI SC. An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 78: 1004-1017, 1995.
- 114) MAEDA S, GASSON M. Cloning expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- β galactosidase. *Journal of General Microbiology*, 132: 331-340, 1986.
- 115) VENEMA G. Molecular biology and genetic modification of lactococci. *Journal of Dairy Science*, 76: 2133-2144, 1993.
- 116) KOK J. Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 120-145, 1996.
- 117) AKÇELİK M. The conjugal plasmid pII 10236 endocodes lactose fermentation ability. Restriction modification activity and bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiology*, 16: 487-494, 1999.
- 118) GASSON MJ, GODON J, PILLIDGE CJ, EATON TJ, JURY K, SHEARMAN CA. Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 4: 757-762, 1995.
- 119) GODON JJ, JURY KL, SHAERMAN CA, GASSON MJ. The *lactococcus lactis* sex-factor Gene Clu A. *Molecular Microbiology*, 12: 655-663, 1994.
- 120) LIU CQ, DUNN NW, DUAN K. Cloning and sequence analysis of a plasmid replicon from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FG2. *J.Gen. Microbiol*, 43: 75-80, 1997.
- 121) MAYOR H, DEIXLER WE, BERTSCH W. Plasmid profiles of mesophilic lactic acid bacteria. *Milchwirtschaftliche Berliner*, 114: 3-12, 1993.
- 122) MORITA H, KAMIZONO K, NAKAMURO S, FUJITA Y, SAKATA R, NAGATA YA, MCKAY LL. Cloning of citrate permease gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* N-7 and expression in citrate-negative lactococci. *Milchwissenschaft*, 52: 138-141, 1997.
- 123) SARANTINOPOULOS P, MAKROS L, VANINGELGEM F, KALANTZOPOULOS G, DE VUYST L, TSAKOLIDOU E. Growth and energy generation of *Enterococcus faecium* FAİR-E 198 during citrate metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 197-206, 2003.
- 124) FONSECA F, BEAL C, CORRIEU G. Method for quantifying the loss of acidification of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, 67: 63-80, 2000.
- 125) BULUT C, GUNES H, OKUKLU B, HARSA S, KILIC S, COBAN HS, YENIDUNYA AF. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*, 72: 19-24, 2005.
- 126) HERREROS MA, FRESNO JM, PRIETO MJG, TORNADIJO ME. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13: 469-479, 2003.
- 127) MOULAY M, AGGAD H, BENMECHERNENE Z, GUESSAS B, HENNI DE, KIHAL M. Cultivable lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's and their proteolytic activity. *World Journal of Dairy and Sciences* 1, 1: 12-18, 2006.
- 128) PELEAZ C, REQUENA T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15:831-844, 2005.
- 129) KOK J, DE VOS WM. The proteolytic system of lactic acid bacteria. In GASSON MJ, DE VOS WM.(ed.), *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Chapman, Hall.Ltd., London,169-210p.,1994.
- 130) KOK J. Genetics of proteolytic enzymes of lactococci and their role in cheese flavor development. *Journal of Dairy Science*, 76: 2056-2064, 1993.

- 131) KOÇAK C, AYDINOĞLU G, USLU K. Ankara piyasasında satılan dil peynirlerinin proteoliz düzeyi, Gıda dergisi, 22(4): 251-254, 1997
- 132) BOUTROU RA, SEPULCHRE A, PITEL G, DURIER C, VASSAL L, GRIPON JC, MONNET V. Lactococcal lysis and curd proteolysis: Two predictable events important for the development of cheese flavor. International Dairy Journal, 8: 609-616, 1998.
- 133) OUMER A, GOYA P, FERNANDEZ-GARSÍA P, MARÍACA R, GADRE S, MEDINA M, NUNUEZ M. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. Journal of Dairy Research, 68: 117-121, 2001.
- 134) LUCEY JA, JOHNSON ME, HORNET DS. Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. Journal of Dairy Science, 86:2725-2743, 2003.
- 135) ÖZER BH, ATASAY AF, AKIN MS. Some properties of Urfa Cheese(a traditional white brined Turkish Cheese produced from bovine and ovine milks. International Journal of Dairy Technology, 55(2): 94-99, 2002.
- 136) POOLMAN B, KUNJERS, HAGTING A, JUILLARD V, KONINGS WN. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Bacteriology 79(Symp. Suppl.): 655, 1995.
- 137) CHOPIN A. Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol, Reviews, 12: 21-38, 1993.
- 138) FOUCAUD C, KUNJERS, HAGTING A, RICHARD J, KONINGS WN, DESMAZEAUD B. Specificity of peptides transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. Journal of Bacteriology, 177: 4652-4657, 1995.
- 139) KUNJERS, MIERAU I, HAGTING A, POOLMAN B, KONINGS WN. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70: 187-221, 1996.
- 140) SMID EJ, PLAPP R, KONINGS WN. Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. Journal of Bacteriology, 171: 6135-6140, 1989.
- 141) KOK J, LEENHOUTS KJ, HAANDRIKMAN AJ, LEDEBOER AM, VENEMA G. Nucleotide sequence of the cell wall-associated proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology, 54: 231-238, 1988.
- 142) KINAKI M, IKEMURA H, SHIMUZU-KADOTA M, HIRASHIMA A. Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO 763. Molecular Microbiology, 3: 359-369, 1989.
- 143) VOS P, SIMONS G, SIEZEN RJ, DE VOS WM. Primary structure and organization of the gene for a prokaryotic cell envelope- located serine proteinase. Journal of Biology and Chemistry, 264: 13585-14579, 1989.
- 144) GÜRSOY O, GÖKÇE R, GÖKALP HY. Fermente süt ürünlerinde proteoliz: Peynirde proteoliz, Gıda Bilimi ve Teknolojisi dergisi, 5(4): 34-42, 2000.
- 145) JUILLARD V, LE BARS D, KUNJERS, KONINGS WN, GRIPON JC, RICHARD J. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. Applied and Environmental Microbiology, 61:3024, 1995.
- 146) KUBICHOVA J, GROSCH W. Evaluation of potent odorants of Camembert Cheese by dilution and concentration techniques. International Dairy Journal, 7: 65-70, 1997.
- 147) MILO C, REINECCIUS GA. Identification and quantification of potent odorants regular-fat and low-fat mild Cheddar Cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3590-3594, 1997.
- 148) YVON M, RIJNEN L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal, 11: 185-201, 2001.

- 149) UMEMOTO Y, SATO Y, KITO J. Direct observation of fine structures of bacteria in ripened Cheddar cheese by electron microscopy. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(2): 227-232, 1978.
- 150) LAW BA. Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses. *Progress in Industrial Microbiology*, 19: 245-283, 1984.
- 151) AKYÜZ N. Pastörizasyonun, mikrobiyal floranın ve ambalaj materyalinin Kaşar peynirinin kalite, tat ve aromasına etkileri üzerinde araştırmalar. *Doğa Tarım ve Ormancılık*, (7) : 123-132, 1983.
- 152) BOTT M. Anaerobic citrate metabolism and its regulation in entobacteria. *Archive of Microbiology*, 167: 78-88, 1997.
- 153) REA MC, COGAN TM. Glucose prevents citrate metabolism by enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 201-206, 2003.
- 154) SWINDELL SR, BENSON KH, GRIFFIN HG, RENAULT P, ERHLICH SD, GASSON MJ. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2641-2643, 1996.
- 155) KONINGS WN. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antony von Leeuwenhoek*, 82: 3-27, 2002.
- 156) HADDAD S, SODINI I, MONNET C, LATRILLE E, CORRIEU G. Effect of citrate on growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 236-241, 1997.
- 157) LORTAL S, CHAPOT-CHARTIER MP. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15: 857-871, 2005.
- 158) BOURDAT-DESCHAMPS M, LE BARS D, YVON M, CHAPOT-CHARTIER MP. Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *International Dairy Journal*, 14: 791-800, 2004.
- 159) MEIJER W, DOBBEBAR C, HUGENHOLTZ J. Thermoinducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: implications for cheese ripening. *International Dairy Journal*, 8: 275-280, 1998.
- 160) THOMAS T. Cannibalism among bacteria found in cheese. *N.Z.J.Dairy Technology*, 22: 215-219, 1987.
- 161) SHOCKMAN GD, CHU CP, KARIYAMA R, TEPPER LK, DAEO MOORE L. Peptidoglycan (murein) hydrolases: unusual enzymes for unusual substrates. In: DE PEDRO MA, HÖLTJE J.-V, LÖFFELHARDT (ed). *bacterial growth and lysis metabolism and structure of the bacterial sacculus*. Plenum press, New York, p.213-227, 1993.
- 162) ROPERS HJ, PERKINS HR, WARD JB. The bacterial autolysins. in PERKINS R, WARD JB. (ed). *Microbial cell walls and membranes*. Chapman and Hall, London, 437-460, 1980.
- 163) LEPEUPLE AS, VASSAL L, CESSÉLIN B, DELACROIX-BUCHET A, GRIPON JC, CHAPOT-CHARTIER MP. Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 8: 667-674, 1998.
- 164) BUIST G, VENEMA G, KOK J. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *Journal of Bacteriology*, 22: 5947-5953, 1998.
- 165) CROW VL, COOLBEAR T, GOPOL PK, MORTLEY FG, MCKAY LL, RIEPE HR. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 5: 855-875, 1995.
- 166) PILLIDGE CJ, RALLABHANDI P, TONG XZ, GOPAL PK, FARLEY P, SALLIVAN A. Autolysis of *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 12: 133-140, 2002.

- 167) CROW VL, GOPAL PK, WICKEN AJ. Cell surface differences of lactococcal strains. *International Dairy Journal*, 5: 45-68, 1995.
- 168) GOVINDASAMY-LUCEY S, GOPAL PK, SULLIVAN PA, PILLIDGE CJ. Varying influence of the autolysin, N-acetyl muramidase and the cell envelope proteinase on the rate of autolysis of six commercial *Lactococcus lactis* cheese starter bacteria grown in milk. *Journal of Dairy Research*, 67: 585-596, 2000.
- 169) BUIST G, KARNENS H, NAUTA A, VAN SINDEREN D, VENEMA G, KOK J. Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin AcmA. *Applied and Environ Microbiology*, 63: 2722-2728, 1997.
- 170) BUIST G, KOK J, LEENHOUTS KJ, DABROWSKA M, VENEMA G, HAANDRIKMAN AJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*, 177:1554-1563, 1995.
- 171) MORGAN S, ROSS RP, HILL C. Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using bacteriocin-producing adjunct. *Journal of Dairy Science*, 80: 1-10, 1997.
- 172) MARTINEZ-CUESTA MC, KOK J, HERRANZ E, PELAEZ C, REQUENA T, BUIST G. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3174-3179, 2000.
- 173) RIEPE HR, PILLIDGE CJ, GOPAL PK, MCKAY LL. Characterization of the highly autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3757-3763, 1997.
- 174) SMITH TJ, BLACKMAN SA, FOSTER SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*, 146:249-262, 2000.
- 175) SHOCKMAN GD, HÖLTJE JV. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. In GHUYSEN JM, HAKENBECK R(Eds.), *Bacterial cell wall-new comprehensive biochemistry*, London: Elsevier, pp.131-166, 1994.
- 176) LIU SQ, HOLLAND R, CROW V.L. Ester synthesis aqueous environment by *Streptococcus thermophilus* and other dairy lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 81-88, 2003.
- 177) CHAPOT-CHARTIER MP, DANIEL C, ROUSSEAU M, VASSAL L, GRIPON JC. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 4: 251-269, 1994.
- 178) WILKINSON MG, GUINEE TP, O'CALLAGHAN DM, FOX PF. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar ripening. *Journal of Dairy Research*, 61: 249-262, 1994b.
- 179) VALANCE F, RICHOUX R, THIERRY A, PALVA A, LORTAL S. Autolysis of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freundenreichii* in Swiss cheeses: first evidence by using species-specific lysis markers. *Journal of Dairy Research*.65: 609-620, 1998.
- 180) VALANCE F, DEUTSCH SM, RICHOUX R, GAGNAIRE V, LORTAL S. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Research*,67: 261-271, 2000.
- 181) HANNON JA, WILKINSON MG, DELAHUNTY CM, WALLACE JM, MORISSEY PA, BERESFORD TP. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 13: 313-323, 2003.
- 182) MCSWEENEY PLH. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3): 127-144, 2004.
- 183) DAESCHEL MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technology*, 43: 164-167, 1989.

- 184) VANDENBERG DJC, SMITH A, POT B, LEDEBOER AM, KERSTERS K, VERBAKEL JMA, VERRIPS T. Isolation screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnology*, 7: 189-205, 1993.
- 185) KULEAŞAN H, ÇAKMAKÇI ML. Bakteriyosinlerin özellikleri, gıda mikrobiyolojisinde kullanım alanları ve ileri dönemlerdeki kullanım potansiyelleri. *Gıda*, 28 (2): 123-129, 2003.
- 186) BAYAZİT AA, YILSAY TÖ. Süt ve süt ürünlerinde bulunan LAB'nin oluşturduğu bakteriyosinler. VI. Süt ve süt ürünleri sempozyumu: Süt mikrobiyolojisi ve Katkı Mad.bildiriler Kitabı, sayfa.315-319, Rebel Yayıncılık, İstanbul. 2000
- 187) LIU X, CHUNG YK, YANG ST, YOUSEF AE. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, 40: 13-24, 2005.
- 188) VAZQUES JA, CABO ML, GONZALEZ MP, MURADO MA. The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria A factorial study. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 319-325, 2004.
- 189) KLAENHAMMER TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, 70: 337-349, 1988.
- 190) RODRIGUEZ E, CALZADA J, ARQUES JL, GODRIGUEZ JM, NUNEZ M, MEDINA M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* 0157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15: 51-57, 2005.
- 191) MORGAN S, ROSS RP, HILL C. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcin A, B and M. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2995-3001, 1995.
- 192) RYAN MP, REA MC, HILL C, ROSS RP. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 612-619, 1996.
- 193) CHEN H, HOOVER D.G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety*, 2: 82-100, 2003.
- 194) DE MARTINIS ECP, ALVES VF, FRANCO BDGM. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18(2-3): 191-208, 2002.
- 195) RILEY MA. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, 32:255-278, 1998.
- 196) YILDIRIM Z, YILDIRIM M. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakterleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliğler Kitabı, 247-253,2000.
- 197) JACK RW, TAGG JR, ROY B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*, June:171-200, 1995.
- 198) KOJIC M, BANINA J, TOPISIROVIC L. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 550. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6): 1835-1837, 1991.
- 199) PIARD JC, DELORME F, GIRAFFA G, COMMISAIRE J, DESMAZEAUD M. Evidence for bacteriocin produced by *L. lactis* CNR2 481. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 44: 143-158,1990.
- 200) ZEZZA N, PASINI G, LOMBARDI A, MERCENIER A, SPETTOLI P, ZAMARONI A, NUTI M.P. Protection of a bacteriocin active on lactate-fermenting clostridia by *L. lactis* subsp. *lactis* immobilized in coated alginate beads. *Journal of Dairy Research*, 60: 581-591, 1993.

- 201) LUCK E, JAGER M. Nisin. Antimicrobial Food Additives; Chapter 27, p. 208-213, 1995.
- 202) WESSELS S, JELLE B, INGOLF F. Bacteriocins of the Lactic acid Bacteria. An Overlooked Benefit for Food; 1998.
- 203) KOPONEN O. Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki; 2004.
- 204) HANSEN JN. Nisin as a model food preservative. Critical reviews in Food Science and Nutrition, 34(1): 69-93, 1994.
- 205) LIU W, HANSEN J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 56(8):2551-2558, 1990.
- 206) ALTUĞ T. Gıda Katkı Maddeleri. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Meta Basımevi, İZMİR, 2001.
- 207) BOUTTEFROY A, MILLIERE JB. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *L. monocytogenes* ATCC 15313. International Journal of Food Microbiology, 62: 65-75, 2000.
- 208) NEL S, LUES JFR, BUYS EM, VENTER P. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. Meat Science., 66: 667-674, 2004.
- 209) BIERBAUM G, SAHL H. Lantibiotics-usually modified bacteriocin-like peptides from gram-positive bacteria. Bakteriologie, 278:1-22, 1993.
- 210) BRUNO MEC, KAISER A, MONTVILLE T J. Depletion of proton motive force by nisin in *L. monocytogenes* cells. Applied and Environmental Microbiology, 8: 2255-2259. 1992.
- 211) BREUKINK E, KRAAIJ C, DALEN A, DEMEL RA, SIEZEN RJ. The orientation of nisin in membranes. Biochemistry, 37: 8153-62, 1998.
- 212) KRAMER NE, VAN HIJUM SAFT, KNOL J, KOK J, KUIPERS OP. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *lactococcus lactis* acquires nisin resistance. Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 50: 1753-1761, 2006.
- 213) HECHARD Y, SAHL HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. Biochimie, 84: 545-557, 2002.
- 214) TWOMEY D, ROSS RP, RYAN M, MEANY B, HILL C. Lantibiotics produced by acetic acid bacteria: structure, function and application. Antonie Van Leeuwenhoek, 82: 165-185, 2002.
- 215) NES IF, HOLO H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. biopolymers (Peptide Science), 55: 50-61, 2000.
- 216) CLEVELAND J, MONTVILLE TJ, NES IF, CHIKINDAS ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71: 1-20, 2001.
- 217) WIEDEMANN I, BREUKINK E, KRAAIJ C, KUIPERS OP. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. The Journal of Biological Chemistry. 276: 1772-1179, 2001.
- 218) DELVES-BROUGHTON J, GASSON MJ. Nisin, In: DILLON V.M. and BOARD R.G., Natural Antimicrobial systems and food preservation. CAB International, Wallingford, Oxon, p.99-131, 1994.
- 219) PAWAR DD, MALİK SVS, BHILEGAONKAR KN, BARBUDDHE SB. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. Meat Science, 56: 215-219, 2000.

- 220) PARANTE E, GIGLO MA, RICCIARDI A, CLEMENTI F. The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *L.monocytogenes* in broth. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 65-75,1998.
- 221) SINGH B, FALAHEE M, ADAMS MR. Synergistic inhibition of *L. monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*. 18: 133-139,2001.
- 222) CHUNG W, HANCOCK REW. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 25-32, 2000.
- 223) ELLIASON DJ, TATINI SR. Enhanced inactivation of *Salmonella typhimurium* and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 6.5°C. *Food Microbiology*,16: 257-267,1999.
- 224) CUESTA-MARTINEZ M, PELAEZ C, JUAREZ M, REQUENA T. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*- Cell lysis induced by a crude bacteriocin, *International Journal of Food Microbiology*, 38: (2-3) 125-131, 1997.
- 225) YVON M, BERTHELOTS S, GRIPON JC. Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal*, 8: 889-898, 1998.
- 226) DELVES-BROUGHTON J, BLACKBURN J, EVANSR J, HUGENHOLTZ J. Applications of the bacteriocin: nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-201, 1996.
- 227) CUTTER CN, SIRAGUSA GR. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiology*, 11: 481-489,1994.
- 228) HAMPİKYAN H, ÇOLAK H. Nisin ve Gıdalardaki Antimikrobiyal Etkisi Derleme/Review Article, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6 (2), 2007.
- 229) PHILLIPS CA, DUGGAN J. The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. *Food Microbiology*,18: 547-554, 2001.
- 230) MASSCHALCK B, HOUDT R, MICHIELS CW. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal Food Microbiology*, 64: 325-32, 2001.
- 231) KUMAR CG, ANAND SK. Significance of microbial biofilms in food industry, a review, *International Journal of food Microbiology*, 42: 2-9, 1998.
- 232) KURT Ş, ZORBA Ö. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1): 77-83, 2005.
- 233) TUOHY KM, PROBERT HM, SMEJKAL CW, GIBSON GR. Using probiotics and probiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15):692-700, 2003.
- 234) MCNAUGHT CE, MACFİE J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research*, 21: 343-353, 2001.
- 235) AIMUTİS WR. Challenges in developing effective probiotic functional foods, including scientific and regulatory considerations. *Bulletin of the IDF*, 363: 3-38, 2001.
- 236) GUSLANDI M. Probiotics for chronic intestinal disorders, *American Journal of Gastroentology*, 98 (3): 520-521, 2003.
- 237) QUWEHAND AC, SALMINEN S, ISOLAURI E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 279-289, 2002.
- 238) SALMINEN S, DIEGHTON M, GORBACH S. Lactic acid bacteria in health and disease in "Lactic Acid Bacteria" Edited by SALMINEN S, VON WRIGHT A, MARCEL DEKKER Inc.270 Madison avenue, New York, USA, 442p, 1992.
- 239) GIBSON GR, SAAVEDRA JM, MACFARLANE S, MACFARLANE GT. Probiotics and intestinal infections. In *probiotics 2:Applications and practical aspects*, Edited by FULLER R, CHAPMAN and HALL, 2-6 Boundary Row London, England, 212p., 1997.
- 240) RAFTER J. Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition* 88 (Suppl.1): 89-94, 2002.

- 241) KILIÇ S. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniver. Zir. Fak.Yayımları, Ege Üniversitesi matbaası, Bornova, İzmir, 2001.
- 242) HOLZAPFEL WH, SCHILLINGER U. Introduction to pre-and probiotics. Food Research International, 35(2/3): 109-116, 2002.
- 243) VINDEROLA CG, PROSELLA W, GHIBERTO D, REINHEIMER JA. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. Journal of Dairy Science, 83: 1905-1911, 2000.
- 244) Anonymous. FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with lactic acid bacteria. Report from FAO/WHO Export Consultation. Cordoba, Argentina, 1-4 October, 2001.
- 245) CHAMPAGNE CP, GARONER NJ. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Critical Reviews In Food Science And Nutrition, 45: 61-84, 2005.
- 246) KIMOTO H, NOMURA M, KOBAYASHI M, OKAMOTO T, OHMOMO S. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant material. Japan Agricultural Research Quarterly, 38(2): 111-117, 2004.
- 247) VINDEROLA CG, REINHEIMER JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36: 895-904, 2003.
- 248) Anonymous. Dairy Reporter. Nestle probiyotik bakteri olan *L. johnsonii*'nin şifresini çözdü. Türk Tarım, Nisan-Mayıs, sayı 156, sayfa 79, 2004.
- 249) MERBACH MM, RAUSCHER T, HINRICHS J. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. International Dairy Journal, 15: 777-784, 2005.
- 250) GELLER BL, NGO HT, MOONEY DT, SU P, DUNN N. Lactococcal 936-species phage attachment to surface of *Lactococcus lactis*. Journal of Dairy Science., 88:900-907, 2005.
- 251) MCINTYRE K, HEAP HA, DAVEY GP, LIMSOWTİN GKY. The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of cheese manufacturing plant. International Dairy Journal, 1: 183-197, 1991.
- 252) RIO BD, BINETTI AG, MARTIN MC, FERNANDEZ M, MAGADAN AH, ALVAREZ MA. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiology, 24: 75-81, 2007.
- 253) HILL C. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 12: 87-108, 1993.
- 254) KLAENHAMMER TR, FITZGERALD GF. Bacteriophage and bacteriophage resistance. In: GASSON MJ, de VOS WM.(Eds.). Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1994.
- 255) GARVEY P, VAN SINDEREN D, TWOMEY DP, HILL C, FITZGERALD GF. Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defence systems in the genus *Lactococcus*. International Dairy Journal, 5:905-947, 1995a
- 256) ALLISON GE, KLAENHAMMER TR. Phage resistance mechanism in lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 8:207-226, 1998.
- 257) HILL C. Bacteriophages in dairy starter culture technology. Food Technology, 38: 41-50, 1993.
- 258) JARVIS AW, FITZGERALD GF, MATA M, MERCENIER A, NEVE H, POWELL IB, RONDA C, SAXELIN M, TEUBER M. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. Intervirology, 32: 2-9, 1991.
- 259) DUPONT K, VOGENSEN FK, JOSEPHSEN J. Detection of lactococcal 936-species bacteriophages in whey magnetic capture hybridization PCR targeting a variable

- region of receptor- binding protein genes. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1001-1009, 2005.
- 260) LECOQ AMC, CANTELE F, LANZAVECCHIA S, MARCO S. In sights into structural proteins of 936- type-virulent lactococcal bacteriophages. *Archives of virology*, 151: 1039-1053, 2006.
- 261) SEEGERS JFML, MC GRATH S, O'CONNELL MM, ARENOT EK, VAN DE GUCHTE M, CREA VEN M, FITZGERALD GF, VAN SINDEREN D. Molecular and transcriptional analysis of the temperate lactococcal bacteriophage TUC 2009-*Virology*, 329: 40-52, 2004.
- 262) DEVEAU H, LABRIE SJ, CHOPIN MC, MOINEAU S. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and environmental Microbiology*, 72: 4338-4346, 2006.
- 263) ŞANLIBABA P, AKÇELİK M. Classification of virulent Lactococcal Bacteriophages Based on Protein Composition and Restriction Endonuclease Analysis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 29: 865-871, 2005.
- 264) MOINEAU S. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antony von. Leeuwenhoek*, 76: 377-382, 1999.
- 265) AZAIEZ SRC, FLISS I, SIMARD RE, MOINEAU S. Monoclonal antibodies raised against major capsid proteins of lactococcal c2-like bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4255-4259, 1998.
- 266) LABRIE S, MOINEAU S. Multiplex PCR detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 987-994, 2000.
- 267) CHANDRY PS, MOORE MC, BOYCE JD, DAVIDSON EE, HILLIER AJ. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage, SK1. *Molecular Microbiology* 26: 49-64, 1997.
- 268) COGAN TM, PETERSEN N, SELLARS RL. Starter systems. *FIL-IDF Bulletin*, 263: 16-23, 1991.
- 269) EVERSON CE. Control of phage in the dairy plant. *FIL-IDF Bulletin*, 263: 24-28, 1991.
- 270) SVENSSON V, CHRISTIANSSON A. Methods for phage monitoring. *FIL-IDF Bulletin*, 263: 29-39, 1991.
- 271) SANDERS ME. Phage Resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 411-421, 1988.
- 272) KLAENHAMMER TR. Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Advanced and Environmental Microbiology*. 30: 1-29, 1984.
- 273) AKÇELİK M. *Streptococcus lactis*'de faj dirençliliğın plazmidlerle olan ılışkısı ve faj dirençlilik plazmidlerinin faja duyarlı suşlara aktarım olanakları üzerinde araştırmalar. *Doğa (Biyoloji)*, 16: 112-124, 1992.
- 274) AYDAR LY, TUNAİL N. Electron microscopic investigation of lactic phages isolated in Turkey. *Milchwissenschaft*, 50 (6): 312-314, 1995.
- 275) KARAHAN AG, TUNAİL N. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* mutantlarının diasetil üretimleri ve faj duyarlılıklarındaki değişimler. *Kükem Dergisi*, 8. Kükem Kongresi Özel Sayısı, 2: 14-15, 1993.
- 276) DALY C, FITZGERALD GF, DAVIS R. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leewenhoek*, 70: 99-110, 1996.
- 277) SANDERS ME, KLAENHAMMER TR. Characterisation of phage sensitive mutants from a phage- intensive strain of *Streptococcus lactis*: evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 1125-1133, 1983.

- 278) SIJTSMA L, STERKENBURG A, WOUTERS JTM. Properties of the cell walls of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris SK110 and their relation to bacteriophage resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2808-2811, 1988.
- 279) SIJTSMA L, JANSEN N, HALEZEGER WC, WOUTERS JTM, HELLINGWERF KJ. Cell surface characteristics of bacteriophage resistant *Lactococcus lactis* ssp. cremoris SK 110 and its bacteriophage sensitive variant SK112. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3230-3233, 1990.
- 280) FITZGERALD GF, DALY C, BROWN LR, GINGERAS TR. ScrFI: a new sequence-specific endonuclease from *Streptococcus cremoris*. *Nucleic Acid Research*, 10: 8171-8179, 1982.
- 281) TWOMEY DP, GABILLET N, DALY C, FITZGERALD GF. Molecular characterisation of the restriction endonuclease gene (scr-FIR) associated with the ScrFI restriction-modification system from *Lactococcus lactis* ssp. cremoris UC503. *Microbiology*, 143: 2277-2286, 1997.
- 282) DINSMORE PK, KLAENHAMMER TR. Molecular characterisation of a genomic region in a *Lactococcus* bacteriophage that is involved in its sensitivity to the phage defence mechanism. *Journal of Bacteriology*, 179: 2949-2957, 1997.
- 283) COFFEY AG, FITZGERALD GF, DALY C. Cloning and characterisation of the determinant for abortive infection from the lactococcal plasmid pc1829. *Journal of General Microbiology*, 143: 1355-1362, 1991.
- 284) WATANABE K, ISHIBASHI K, NADASHIMA Y, SAKUARI T. A phage-resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *Journal of General Virology*, 65:981-986, 1984.
- 285) MONTEVILLE MR, ARDESTANI B, GELLER BR. Lactococcal phages require a host cell wall carbohydrate and plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3204-3211, 1994.
- 286) GARVEY PA, HILL C, FITZGERALD GF. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 676-679, 1996.
- 287) GARGUTT KC, KRAUS J, GELLER BL. Bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* engineered by replacement of a gene for a bacteriophage receptor. *Journal of Dairy Science*, 80: 1512-1519, 1997.
- 288) SHAERMAN CA, UNDERWOOD H, JURY K, GASSON M. Cloning and DNA sequence analysis of a *Lactococcus* bacteriophage lysis gene. *Molecular and General Genetic*, 218: 214-221, 1989.
- 289) DINSMORE PK, KLAENHAMMER TR. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Molecular Biotechnology*, 4: 297-314, 1995.
- 290) DE VOS WM. On the carrier state of bacteriophages in starter lactococci: an elementary explanation involving a bacteriophage resistance plasmid. *Netherlands Milk and Dairy*, 43: 221-227, 1989.
- 291) DE VOS WM, UNDERWOOD HM, DAVIES FL. Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris*, SK11. *FEMS Microbiology Letters* 23: 175-178, 1984.
- 292) CASALTA E, CACHENAUT J-M, AUBERT C, DUFRENE F, NOEL Y, BEUVIER E. Application on specific starters for the manufacture of Venaco cheese. *INRA, EDP Sciences*, 85: 205-222, 2005.
- 293) JEANSON S, BERTHIER F, GRAPPIN R, BEUVIER E. Heat resistance of wild *Lactococcus lactis* strains under a thermal gradient of cooked cheese, in milk and mini cheeses. *INRA, EDP Sciences*, 20: 1-17, 2003.

- 294) ÖZKAYA F, XANTHOPOULOS V, TUNAİL N, LITOPOULOU-TZANETAKI E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 861-870, 2001.
- 295) MARTINOVIC A, RADULOVIC Z, WIND A, JANZEN T. Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 55(4): 307-318, 2005.
- 296) DE LA PLAZA M, RODRIQUEZ A, FERNANDEZ DE PALENCIA P, MARTINEZ-CUESTA MC, PELAEZ C, REQUENA T. Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 637-644, 2006.
- 297) CACHON R, JEANSON S, ALDARF M, DIVIES C. Characterization of lactic starters based acidification and reduction activities. *INRA, EDP Sciences*, 82: 281-288, 2002.
- 298) ANONİM, International Dairy Federation (IDF). Levains lactiques de cultures de bacteries lactiques. Norme de composition. IDF standart 149A, Brussels, Belgium, 1997.
- 299) TORRES MJ, VALLEJO-CORDOBA B, DIAZ-CINCO ME, MAZORRA-MANZANO MA, GONZALEZ-CORDOBA AF. Characterization of natural microflora of artisanal mexican Fresco cheese. *Food Control*, 17: 683-690, 2006.
- 300) PEREZ-ELORTONDO FJP, ALDAMIZ EP, ALBISU M, BARCINA Y. Indigenous lactic acid in Idiazabal ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 8: 725-732, 1998.
- 301) LIMSOWTIN GKY, TERZAGHI BE. Agar medium for the differentiation of fast and slow coagulating cells in lactic streptococcal cultures. *N.Z.J. Dairy Science and Technology*, 11: 65-66, 1976.
- 302) HUGGINS AR, SANDINE WE. Differentiation of fast and slow fox trot milk coagulating isolates in strains of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, 67: 1674-1679, 1984.
- 303) BADIS A, GUETARNI D, MOUSSA B, HENNI DE, KIHAL M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588, 2004.
- 304) CIBIK R, CHAPOT CHARTIER MC. Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 853-859, 2004.
- 305) THIBOUTOT H, DAKO E, EL SODA M, VUILLEMARD Y.C., POWER N, SIMORD R.E. Influence of heat and freeze shocking on the autolysis and peptidase activities of *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*, 50: 448-452, 1995.
- 306) OSTLIE HM, VEGARUD G, LANGSRUD T. Autolysis of lactococci: detection of lytic by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3598-3603, 1995.
- 307) TERZAHGHI BE, SANDINE WE. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 29: 807-813, 1975.
- 308) NUNEZ M, MEDINA M. La flore lactique du fromage de Cabrales. *Lait*, 588: 497-513, 1979.
- 309) CENTENO JA, MENEÂNDEZ S, RODRÕÂGUEZ-OTERO, JL. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33: 307-313, 1996.
- 310) COGAN TM, BARBOSA M, BEUVIER E, BIANCHISALVADORI B, COCCONCELLI PS, FERNANDES I, GOMEZ J, GOMEZ R, KALANTZOPOULOS G, LEDDA A, MEDINA M, REA MC, RODRIQUEZ. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64: 409-421, 1997.
- 311) ALONSO-CALLEJA, J. CARBALLO, R. CAPITA, A. BERNARDO AND ML. GARCÕÂA-LOÂ PEZ. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus*

- lactis subsp. lactis strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. Letters in Applied Microbiology, 34: 134-138, 2002.
- 312) JUILLARD V, LAAN H, KUNJI ERS, JERONIMUS-STRATINGH CM, BRUINS AP, KONINGS WN. The extracellular P₁-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes B-casein into more than one hundred different oligopeptides. Journal of Bacteriology, 177: 3472-3478, 1995
- 313) POOLMAN B, KUNJI ERS, HASTING A, JUILLARD V, KONINGS WN. The proteolytic pathways of *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Microbiology, 79: 65-75, 1995.
- 314) YVON M. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. Australian Journal of Dairy Technology, 61: 88-96, 2006.
- 315) CIBIK R, CHAPOT-CHARTIER MP. Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. Journal of Applied Microbiology, 89: 862-869, 2000.
- 316) OSTLIE H, VEGARUT G, LANGSRUD T. Autolysis of dairy propionibacteria in buffer systems. Journal of Dairy Science, 78:2315-2325, 1995.
- 317) KANG OJ, VEZINZ L-P, LABERGE S, SIMARD RE. Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. Journal of Dairy Science, 81: 639-646, 1997.
- 318) CIBIK R, CHAPOT-CHARTIER MP. Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. Letters in Applied Microbiology 38: 459-463, 2004.
- 319) LANGSRUD T, LANDAAS A, CATSBERG HB. Autolytic properties of different of group N Streptococci. Milchwissenschaft 42: 556-560, 1987.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın her aşamasında bana yol gösteren, her konuda yardımcı olan danışmanım Doç.Dr.Recep ÇIBIK'a, doktora başlamamda ve tamamlamamda büyük katkıları olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr.Mustafa TAYAR'a ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarına sonsuz şükranlarımı ve teőekkürlerimi sunuyorum. Askerlik gibi kutsal ve zor bir görevi icra ederken bunun yanında doktora başlamama ve bitirmeme çok büyük katkısı olan, bu konuda her türlü özveriye gösteren sevgili eşim Yasemin'e sevgilerimi ve saygılarımı sunuyorum.

ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Merzifon'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bursa'da tamamladım. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1991 yılında mezun oldum. Askerlik görevimi yedek subay olarak tamamladıktan sonra; Türk Silahlı Kuvvetleri'nin açmış olduğu muvazzaflık sınavını kazanarak muvazzaf subay olarak içinde bulunmakla gurur duyduğum Türk Silahlı Kuvvetleri'ne katıldım. Işıklar Askeri Lisesi'nde görev yaparken Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim dalında doktora başladım. Evli; Işıl ve Alper adında dünya güzeli 2 çocuk babasıyım. Eşimi, çocuklarımı ve işimi çok seviyorum. Halen Kara Harp Okulu'nda Gıda Kontrol Subayı olarak görev yapıyorum.