

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DENİZLİ'DEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT VE
PEYNERLERDEN OTOL TIKLAKTAKİ
BAKTERLERİNİN ZOLASYONU, TANIMLANMASI VE
OTOL TIK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELME HAZİR DALCA

DENİZLİ, EYLÜL - 2015

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



**DENİZLİ'DEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT VE
PEYNİRLERDEN OTOL T K LAKTİK ASİT
BAKTERLERİNİN ZOLASYONU, TANIMLANMASI VE
OTOL T K ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELME HAZİR DALCA

DENİZLİ, EYLÜL - 2015

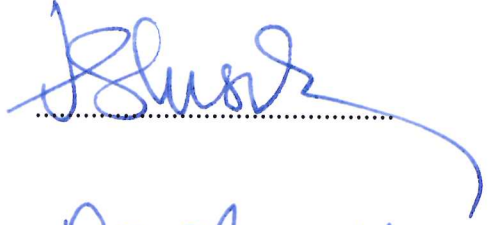
KABUL VE ONAY SAYFASI

SELİME HAZIR DALCA tarafından hazırlanan “**DENİZLİ İLİNDEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT VE PEYNİRLERDEN OTOLİTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE OTOLİTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 04.09.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç.Dr.Ömer ŞİMŞEK
Pamukkale Üniversitesi



.....

Üye
Doç.Dr.Oğuz GÜRSOY
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



.....

Üye
Yrd.Doç.Dr. Seher ARSLAN
Pamukkale Üniversitesi



.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16/09/2015 tarih ve ...35/12....sayılı kararıyla onaylanmıştır.



.....

Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez al, mas, Tar,msal Ara t,rmalar ve Politikalar Genel Müdürlü  taraf,ndan TAGEM-13/AR-GE/11 proje numaras, ile desteklenmi tir. Ayr,ca Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Ara t,rma Projeleri Birimi taraf,ndan da 2014FBE070 proje numaras, ile tez al, mas,n,n bir k,sm, olan otolitik aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi için destek al,nm, t,r.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.



SELİME HAZİR DALCA

ÖZET

**DENİZLİ'DEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT VE PEYNERLERDEN
OTOLİTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE OTOLİTİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ
YÜKSEK LAKTİK ASİT
SELÜLÖZ HAZIR DALCA
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR. ÖMER MİRMEK)

DENİZLİ, EYLÜL - 2015

Bu çalışmada, peynirlerin aromatik özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla starter kültür olarak kullanılabilen otolitik özellikteki laktik asit bakterilerinin, çiğ süt ve peynirlerden izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Denizli ve yöresinden temin edilen 34 çiğ süt ve 16 peynirden 526 mezofil, 413 termofil karakterli LAB izolatı toplanmıştır. Tüm izolatların potasyum fosfat tamponunda (100mM, pH 7,0, 30°C, 24 sa) % otoliz oranları hesaplanmıştır. Yüksek otoliz oranına sahip 27 adet LAB izolatı seçilmiştir. Yapılan (GTG)₅ parmak izi ve 16S rDNA dizisi analizleri sonuçlarına göre izolatlar, *Enterococcus faecium* (8), *Lactobacillus casei* (6), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (2), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (1), *Lactobacillus pentosus* (1), *Lactobacillus rhamnosus* (1), *Lactobacillus helveticus* (1), *Enterococcus durans* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Streptococcus macedonicus* (1), *Leuconostoc mesenteroides* (1) ve *Pediococcus acidilactici* (1) türleri ile %97'in üzerinde benzer bulunmuştur. Tüm su ların farklı sıcaklık (10-40°C), pH (3,5-7) ve NaCl (%0,5-10) koşullarında otolitik davranışları, sıcaklık ve pH'nın yükselmesiyle artmıştır. Yüksek NaCl konsantrasyonlarında ise daha düşük oldu gözlemlenmiştir. Ayrıca su ların besiyerlerinde bulunan glukoz, laktoz, sükröz ve maltoz gibi oligosakkaritler, otolitik özelliklerindeki değişimleri incelenmiş ve en yüksek otolitik aktivite glukoz varlığında gelişen su larda gözlemlenmiştir. İncelenen su ların hücre içi enzimlerinin proteolitik aktivitelerini tespit etmek için otoliz olan hücre ortamlarına kazein ilave edilmiş ve 30 °C'de 4, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek kazeinin parçalanması, SDS-PAGE sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntülenme sonuçları, *Lb. plantarum* PFC231'in 24. saatte kazeini parçaladığını, 48. saatte kazein bantlarının tamamen kaybolduğunu göstermiştir. Sonuç olarak peynirin olgunlaşma koşullarına uygun, *Lb. plantarum* PFC231 su lunun yüksek otolitik özelliğe sahip starter kültür olarak kullanılmasını önerilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Laktik Asit Bakterisi, Otoliz, Peptidoglikan hidrolaz, Peynir Olgunlaşma,

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AUTOLYTIC LACTIC ACID BACTERIA FROM RAW MILK AND CHEESES OBTAINED FROM DENIZLI PROVINCES AND DETERMINATION OF THEIR AUTOLYTIC PROPERTIES

MSC THESIS

SEL ME HAZIR DALCA

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ÖMER M EK)

DEN ZL , SEPTEMBER, 2015

In this study, lactic acid bacteria (LAB) having autolytic activity in order to use as starter culture aiming to enhance the aromatic properties of cheeses was isolated and identified from raw milk and cheese samples where after autolytic activities of isolates were determined. 526 mesophilic and 413 thermophilic LAB isolates were obtained from 34 raw milk and 16 cheese samples which were supplied from Denizli province. All isolates were tested for autolytic activity in the potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7,0, 30°C) initially and 27 LAB isolates were selected according to their high autolytic activity. As a result of (GTG)₅ fingerprint and 16S rDNA sequence analysis, 27 isolates were found homologous more than 97% with the species; *Enterococcus faecium* (8), *Lactobacillus casei* (6), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (1), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (2), *Lactobacillus pentosus* (1), *Lactobacillus rhamnosus* (1), *Lactobacillus helveticus* (1), *Enterococcus durans* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Streptococcus macedonicus* (1), *Leuconostoc mesenteroides* (1) and *Pediococcus acidilactici* (1). Under different temperatures (10-40 °C), pH (3,5-7) and NaCl concentrations (%0,5-10), the autolysis of each strains were increase by raising the temperature and pH but were decrease comparatively at high NaCl concentrations. Additionally the effect carbon type used in the growth medium on autolytic activity of the selected strains was determined by using glucose, sucrose, lactose and maltose respectively which glucose induced the autolysis of all LAB strains. Lastly, casein was added to each autolyzed cell environment to determine whether the cytoplasmic enzymes were able to hydrolyze the casein at 30 °C. Accordingly, SDS-PAGE analysis indicated that *Lb. plantarum* PFC231 started to degrade casein appeared on the gel after 24 h where the whole casein was disappeared after 48 h. In conclusion, *Lb. plantarum* PFC231 was recommended as starter culture for cheese production due to its high autolytic activity as well as maintaining its high autolysis under conditions mimicking the cheese maturation.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria, Autolys, Peptidoglycan Hydrolase, Cheese Ripening,

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOLE LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür Özeti	3
1.2.1 Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve Fonksiyonel Özellikleri.....	3
1.2.2 LAB'lerinde Otoliz.....	6
1.2.3 LAB'lerinde Otoliz Üzerine Etkili Faktörler	12
1.2.4 LAB Otolizinin Teknolojik Önemi	15
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1 LAB'lerin Sayımı ve İzolasyonu	17
2.2 LAB İzolatlarının Otolitik Aktivitesinin Belirlenmesi	18
2.3 LAB İzolatlarının Tanımlanması.....	18
2.4 LAB'lerinin Otolitik Özelliklerine Çevresel Faktörlerin Etkisi.....	19
2.5 Otolitik Aktiviteye Sahip LAB'lerinin Proteolitik Aktivitesinin Belirlenmesi	21
2.6 İstatistiksel Analiz	23
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
3.1 Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinin LAB İçeriği.....	24
3.2 LAB İzolatlarının Otoliz Oranları	26
3.3 Çiğ Süt ve Peynirlerden İzole Edilen ve Yüksek Otolitik Aktiviteye Sahip LAB İzolatlarının Tanımlanması.....	45
3.3.1 Otolitik LAB İzolatlarının (GTG) ₅ Parmak-izi ile Sınıflandırılması	45
3.3.2 Otolitik LAB İzolatlarının 16S rDNA Dizi Analizi ile Tür Tanısı.....	47
3.4 Otolitik LAB'lerinin Otolizine Çevresel Koşulların Etkisi	51
3.4.1 LAB Suşlarının Otolizi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	51
3.4.2 LAB Suşlarının Otolizi Üzerine pH'ın Etkisi.....	52
3.4.3 LAB Suşlarının Otolizi Üzerine Farklı Tuz Konsantrasyonunun Etkisi.....	54
3.4.4 Otoliz Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	55
3.4.5 Bakteri Gelişme Ortamında Kullanılan Şeker Tipinin LAB suşlarının Otolizi Üzerine Etkisi	57
3.4.6 Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonu Kombinasyonlarının LAB'lerin Otolizine Etkisi	58
3.5 Otolizin Proteolitik Aktiviteye Etkisi	60
4. GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER	64
5. KAYNAKLAR	65
6. ÖZGEÇMİŞ	73
EKLER	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Bakteri hücresinde bulunan peptidoglikan yapısı ve bu yapıyı hidroliz eden hidrolaz enzimleri ile spesifik kesim bölgeleri	8
Şekil 3.1: Çiğ sütlerden izole edilen mezofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı	41
Şekil 3.2: Çiğ sütlerden izole edilen termofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı	42
Şekil 3.3: Peynirlerden izole edilen mezofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı	43
Şekil 3.4: Peynirlerden izole edilen termofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı	44
Şekil 3.7: Çiğ süt ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarından 16S-27F/16S-780R primerleri kullanılarak çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri	49
Şekil 3.8: Çiğ süt ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarından 529F/1491R primerleri kullanılarak çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri	49
Şekil 3.9: Çiğ süt ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarından 529F/1491R primerleri kullanılarak çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri	49
Şekil 3.10: Çiğ süt ve peynirden izole edilen ve seçilen LAB'lerin otolizi üzerine sıcaklığın etkisi.....	52
Şekil 3.11:Çiğ süt ve peynirden izole edilen ve seçilen LAB'lerin otolizi üzerine pH'ın etkisi.....	53
Şekil 3.12: Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB suşlarının farklı NaCl konsantrasyonlarındaki % otolitik aktivite değerleri	55
Şekil 3.13: Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB izolatlarının 10°C (a), 20°C (b) ve 40°C'de (c) 12 ve 24 saat inkübasyon sonucu ölçülen % otoliz değerleri.	56
Şekil 3.14:Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB suşlarının gelişme ortamında farklı şeker tiplerinin kullanılması durumunda ölçülen % otoliz oranları.	58
Şekil 3.15:Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB izolatlarının % otolitik aktivite değerlerine tuz (%3-5), pH(4- 5) ve sıcaklığın (10°C) birlikte etkisi.....	59
Şekil 3.16: <i>E. faecium</i> PFC232 ve <i>Lb.plantarum</i> PFC231 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü.....	61
Şekil 3.17: <i>E. durans</i> PFC235 ve <i>Lb. helveticus</i> PFC236 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü.....	61
Şekil 3.18: <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PFC229 ve <i>Lb. casei</i> PFC230 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü	62
Şekil 3.19: <i>Leu. mesenteroides</i> PFC234 ve <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> PFC233 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü....	62

Şekil 3.20: *P. acidilactici* PFC237 ve *Lb. rhamnosus* PFC238 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü63

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: LAB peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin temel karakteristikleri ..	11
Tablo 1.2: Otolitik aktiviteye sahip bazı LAB’i, otoliz koşulları ve oranları ...	14
Tablo 2.1: LAB’lerinin otolizinin belirlenmesi için kullanılan çevresel faktörlerin kombinasyonları	20
Tablo 3.1: Çiğ süt örneklerinin mezofil ve termofil LAB sayım sonuçları (log kob/mL).....	25
Tablo 3.2: Peynir örneklerinin mezofil ve termofil LAB sayım sonuçları (log kob/g).....	26
Tablo 3.3: Çiğ süttten izole edilen mezofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri.....	28
Tablo 3.4: Çiğ süttten izole edilen termofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri.....	32
Tablo 3.5: Peynirden izole edilen mezofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri.....	35
Tablo 3.6: Peynirden izole edilen termofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri.....	38
Tablo 3.7: Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilip, seçilen otolitik LAB izolatlarının rRNA geni dizi analizine göre tanımlama sonuçları. .	50

SEMBOL LİSTESİ

sa	:Saat
dk	:Dakika
sn	:Saniye
g	:Gram
L	:Litre
mL	:Mililitre
µL	:Mikrolitre
M	:Molar
mM	:Milimolar
N	:Normalite
Nm	:Nanometre
g	:Relatif santrifüj kuvveti
OD	:Optik yoğunluk
°C	:Santigrat derece
cm	:Santimetre
V	:Volt
kob	: Koloni oluşturan birim
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
bç	: Nükleotit baz çifti

ÖNSÖZ

Bu çalışmaya değer verip destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ile Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü desteği vererek yönlendiren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam sayın Doç.Dr. Ömer ŞİMŞEK'e, bilgi ve birikimlerinden azami ölçüde faydalandığım Doç.Dr. Oğuz GÜRSOY'a, çalışmalarım için gerekli olanakları sağlayan Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığına ve her türlü desteğini gördüğüm Bölüm Öğretim Üyelerine, deneysel çalışmalarımda yanımda olan ve tecrübelerinden faydalandığım Arş.Gör. Halil İbrahim KAYA'ya, Öğr.Gör. Burcu KÖRDİKANLIOĞLU'na, Gizem YAZICI'ya ve laboratuvardaki tüm diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi açıdan destek olan varlıklarıyla beni cesaretlendiren çok sevdiğim aileme, her zaman yanımda olan sevgili eşim Gıda Mühendisi Ümit DALCA'ya da çok teşekkür ederim.

Eylül, 2015

Gıda Mühendisi Selime HAZIR DALCA

1. GİRİŞ

Fermente gıdaların mikroflorasının temel üyesi laktik asit bakterileridir. Söz konusu bu bakteriler fermente gıdaların tekstürel ve aromatik özelliklerinin yanı sıra, ürün güvenliğinin geliştirilmesi yönünde önemli katkı sağlarlar. Bu nedenle fermente gıdaların üretiminde laktik asit bakterilerine ait bazı üyelerinin starter kültür olarak endüstriyel kullanımı bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinin fermente gıdalarda starter olarak bilinen temel fonksiyonu laktik asit üreterek gıda ürününe karakteristik özelliğin kazandırılmasıdır. Ancak bu familyanın bazı üyelerinin sahip olduğu çeşitli metabolik özellikler ile gıda ürünlerinde arzulanan ve fonksiyonel nitelikler de sağlanabilmektedir. Dolayısıyla son yıllarda fonksiyonel starter kültürlerin kullanımı daha fazla tercih edilmektedir.

Fonksiyonel kültür kapsamında laktik asit bakterilerinin özellikleri teknolojik ve sağlık olmak üzere iki başlıkta toplanır. Teknolojik açıdan laktik asit bakterilerinin en çok bilinen bazı fonksiyonel özelliklerine aroma üretimi ile gıdaların duyuşal özelliklerinin geliştirilmesi, bakteriyosin üretimi ile patojen mikroorganizmaların engellenmesi ve ekzopolisakkarit üretimi ile gıdaların tekstür ve reolojik özelliklerinin iyileştirilmesi örnekleri verilebilir. Diğer taraftan probiyotik etki, biyoaktif moleküllerin biyosentezi ve toksik bileşenlerin giderilmesi ise laktik asit bakterilerin sağlık ile ilişkili fonksiyonlarıdır.

Laktik asit bakterilerinin fonksiyonel özelliklerinden üzerinde en fazla durulan konulardan birisi tüketici memnuniyetinin sağlanması için ürünlerin duyuşal özelliklerinin geliştirilmesidir. Laktik asit bakterileri fermente gıdaların aromasını, ürettikleri organik asit, etil alkol, diasetil ve asetaldehit gibi fermantasyon ürünleri ile geliştirebilirler. Buna ilaveten bu bakterilerin sahip oldukları çeşitli proteolitik ve lipolitik enzimler ile gıdaların protein ve lipit fraksiyonlarını parçalayarak aromatik bileşenlerin açığa çıkmasına neden olabilirler. Laktik asit bakterilerinin gerek hücre duvarında yer alan, gerekse de sitoplazmada bulunan söz konusu bu enzimler özellikle peynir gibi olgunlaştırılan gıdalara aroma kazandırılması açısından büyük önem taşır.

Peynirin olgunlaşması yavaş, pahalı ve tamamıyla kontrol edilemeyen bir süreçtir. Peynirlerin olgunlaştırma amacıyla belirli bir süre depolanması, yüksek miktarda işletme sermayesinin yanı sıra depolama masraflarını, faiz yükünü ve firelerin toplam maliyetteki payını da oldukça yükseltmektedir. Olgunlaştırma periyodunun kısaltılması, olgunlaştırma odalarının kullanım kapasitelerinin yükselmesini, peynir üretiminin artmasını, maliyetlerin aşağıya çekilmesini ve işletme sermayesi yönünden üreticilerin sıkıntılarının önemli ölçüde giderilmesini sağlayabilir. Söz konusu nedenlerle olgunlaşmanın hızlandırılması yani depolama süresinin kısaltılması konusundaki çalışmalar son derece önemli görülmektedir.

Peynirin matriksinde bulunan laktik asit bakterilerin enzimatik aktivitesinden faydalanarak peynir olgunlaştırılması olası çözümlerden birisidir. Laktik asit bakterilerinin hücre içinde bulunan ve aromatik peptitlerin açığa çıkarma özelliklerine sahip peptidazların substratla karşılaşması ancak bu bakterilerin otolizi ile mümkündür. Otoliz, otolisin olarak isimlendirilen bakteriyel hücre içinde bulunan peptidoglikan hidrolazları tarafından hücre duvarı peptidoglikanının enzimatik parçalanmasıdır. Aslında bakteriyel peptidoglikan hidrolazlar hücrenin büyümesi ve bölünmesi sırasında rijit peptidoglikan ağının modifikasyonu için gerekli olan çok sayıda farklı hücre fonksiyonunda görev almaktadırlar. Bunun dışında, otoliz sisteminin hücre popülasyonu içerisinde zayıflamış veya bozulmuş hücrelerin elimine edilmesini de sağlar. Bir bakteri hücresinde aynı anda farklı özgülüğe ve/veya yapıya sahip peptidoglikan hidrolazları bulunabilir ve bu durumda ilgili hidrolazlar kompleks bir enzimatik sistem meydana getirirler.

1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı, peynir mikroflorasının temel üyesi olan laktik asit bakterilerinin peynirin olgunlaştırma sürecinde hücre bütünlüğünü kaybettiği otoliz ile sitoplazmasında bulunan enzimlerin ortama salıverileceği, böylece bu enzimlerin etkisi ile peynirin aromatik özelliklerinin geliştirileceği varsayımından hareketle otolitik özelliğe sahip laktik asit bakterilerinin seçilmesi, tanımlanması ve otolitik davranışlarının karakterize edilmesidir.

1.2 Literatür Özeti

1.2.1 Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve Fonksiyonel Özellikleri

Laktik asit bakterilerinin (LAB) genel özellikleri; Gram-pozitif, fakültatif aerob, katalaz negatif, hareketsiz (bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında), sitokromdan yoksun, *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmeyen, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak genellikle laktik asit üreten bakterilerdir. Bu bakteriler; kok, çomak, tetra formasyon ve ovoid şeklindedir. Laktik asit bakterileri gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellik gösterir. 10-45 °C arası sıcaklıklarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme ve asit veya alkali tolere etme yeteneklerine sahiptir (Axelsson 1998). Gıdalarda yaygın bulunan laktik asit bakterilerinin en önemlileri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* ve *Carnobacterium* cinsleridir (Stiles ve Holzapfel 1997, Klein ve diğ. 1998).

LAB'leri karbonhidratları farklı metabolik yollar kullanarak parçalamaları ve farklı son ürünler oluşturmalarına göre homofermantatif ve heterofermantatif LAB olarak iki farklı sınıfa ayrılır. Homofermantatif LAB'i glikoz femantasyonundan temel ürün olarak laktik asit oluştururken; heterofermantatif LAB'i laktik aside ek olarak etanol ve CO₂ de üretir (Blandino ve diğ. 2003, Liu ve diğ. 2011).

LAB'i B grubu vitaminler ile pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyar. Genellikle pH 4,0-4,5 aralığında gelişir, ancak 3,2 gibi düşük veya 9,6 gibi yüksek pH'larda gelişebilen türler de mevcuttur. Bazı türleri zayıf proteolitik ve lipolitik aktivite gösterir.

Son 50 yıl içerisinde LAB'lerin genetiği, biyokimyası ve fizyolojisi üzerine yeni bilgilere ulaşılmasıyla, bu bakterilerin starter kültür olarak kalitenin geliştirilmesi ve standardizasyonun sağlanması amacıyla fermente gıdaların üretiminde kullanımı mevcuttur (Botina ve diğ. 2006). Gıdaya tat, koku gibi aromatik özelliklerin yanında gıda ürünlerinin korunması, duyuusal ve reolojik özelliklerin geliştirilmesine katkıda bulunan starter kültürler, daha önce uygulanan klasik pasajlama sisteminin yerini almıştır. Günümüzde LAB'leri fermente süt

ürünlerinin, etlerin ve sebzelerin fermentasyonunda temel görev üstlenen ve gıda endüstrisinde ürün kalitesini arttıran mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Bunun yanında kahve, hayvan yemi, kakao, ekmek hamuru ve çok sayıda doğal yiyeceğin fermentasyon yolu ile üretilmesinde kritik rol oynadıkları da saptanmıştır (Wood 1998, Makarova ve diğ. 2006).

LAB'lerinin endüstriyel önemi ve sahip olduğu genetik zenginliği dolayısıyla fonksiyonel kültür olarak uygulamaları ön plana çıkmıştır. Fonksiyonel kültür gıdaya mikrobiyal güvenlik, duyuşal, teknolojik, beslenme veya sağlık avantajlarından birisi veya bir kaçıını sağlayan kültürler olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmaları LAB'lerin temel görevi olan laktik asit üretimine ilavaten, bir takım fonksiyonlar ile de katkı sağladığı anlaşılmıştır (Leroy ve diğ. 2006, de Vuyst ve Leroy 2007).

LAB'leri ürettikleri bakteriyosinler ile fermente gıdaların korunmasını ve raf ömrünün uzatılmasını sağlar. Bu grup bakterilerin gelişme ortamında ürettikleri peptit yapısındaki bakteriyosinler, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gram-pozitif gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkilidir. Bakteriyosin üretici LAB'lerin gıda sistemlerindeki başarısı çeşitli derleme yayınlarla rapor edilmiştir (de Vuyst ve Leroy 2007, Galvez ve diğ. 2007, Perez ve diğ. 2014). Son yıllarda yapılmış olan çalışmalarda taze peynirde bakteriyosin üreticisi *L. lactis* ve Enterokok suşlarının 7 gün depolama sonrasında *L. monocytogenes* sayısını 5 logaritma düşürdüğü tespit edilmiştir (Coelho ve diğ. 2014). Benzer şekilde peynir örneklerinde bakteriyosin üreticisi *L. sakei* subsp. *sakei* 2a suşu *L. monocytogenes*'in gelişimini engellemiştir (Martinez ve diğ. 2015). Bu duruma diğer bir örnek ise peynir üretiminde destek kültür olarak kullanılan *L. plantarum* TF711 suşunun 4 logaritma oranında inoküle edilen *C. sporogenes*'i 21. günün sonunda tamamen inhibe etmesidir (Gonzalez ve Zarate 2015).

LAB'lerin üzerinde durulan diğer fonksiyonel özelliklerinden birisi bu bakterilerin ürettikleri hücreye sıkı bir şekilde bağlanmış kapsül formunda olan kapsüller veya hücreye gevşekçe bağlı veya tamamen hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritler (EPS)'dir. Kimyasal yapıları açısından mikrobiyal EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılırlar.

Homopolisakkaritler glukoz veya fruktoz olmak üzere sadece tek tip şeker monomerinden oluşurlar. Heteropolisakkaritler ise birden fazla farklı şeker ünitelerinden, dallanmış şekerlerden, diğer organik ve inorganik moleküllerden oluşabilirler. Bu monomerler arasındaki glikozidik bağların niteliği birçok özgün EPS yapısının oluşmasına neden olmaktadır (Broadbent ve diğ. 2003, de Vuyst ve Degeest 1999; Kumar ve diğ. 2007). LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler fermente gıdaların tekstür, reolojik ve duyuşal özelliklerini iyileştirici katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda bu metabolitlerin prebiyotik etkisi de tanımlanmıştır (Korakli ve diğ. 2001, Korakli ve diğ. 2002, Tiekling ve Ganzle 2005). Bu yüzden başta yoğurt olmak üzere çeşitli fermente süt ürünlerinde ve düşük yağlı peynirlerde istenilen yapının oluşması için EPS üreten suşlardan yararlanılmıştır (Svensson ve diğ. 2005, Robitaille ve diğ. 2009). Ekşi hamurda LAB türleri tarafından üretilen EPS'lerin, ekmeş üretiminde kullanılan bitkisel kaynaklı polisakkaritleri ikame edebileceğı üzerinde durulmaktadır. Örneğın *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen fruktan tip EPS'nin hamur reolojisi ve ekmeş tekstürünü pozitif yönde etkilediğı gösterilmiştir (Ganzle ve diğ. 2007). Dolayısıyla ekmeş üretiminde starter nitelikteki EPS üreticisi LAB türlerinin kullanılması ekmeş üretimindeki pahalı hidrokolloidlerin kullanımını azaltıp ekmeş kalitesini artırması açısından dikkat çekicidir. Diğer bir çalışmada ise LAB türleri tarafından üretilen heteropolimerik EPS'nin hamur kalitesini artırdığı gösterilmiştir (Palomba 2012).

LAB'ler fermente gıdaların duyuşal özelliklerine de katkıda bulunabilir. Bu bakteriler gıdayı asitlendirerek tadının oluşumuna ilaveten çoğı kez sahip oldukları proteolitik ve lipolitik aktivite göstererek veya biyotransformasyonla amino asitlerden aromatik bileşikleri üretirler (Van Kranenburg ve diğ. 2002, Williams ve diğ. 2001). Nitekim LAB'lerinde peptidaz aktivitesinin kontrol edilmesi peynirin olgunlaştırılması açısından oldukça kritiktir. Örneğın, *L. lactis* subsp. *cremoris*'in peptidaz aktivitesinin yüksek olması peynirin duyuşal kalitesini geliştirmiştir (Guldfeldt ve diğ. 2001).

Starter kültür olmayan LAB'leri, aroma oluşumunda biyosentez kapasitelerinden ve aromatik bileşikleri ürettiklerinden dolayı önemli rol oynarlar (Ayad ve diğ. 1999, Bouton ve diğ. 1998, Weerkamp ve diğ. 1996). Dolayısıyla bu suşlar ürün inovasyonu için önemli bir potansiyele sahiptir. Starter olmayan

LAB'lerin destek kültür olarak peynir üretiminde kullanılması, serbest amino asitlerin, peptitlerin ve serbest yağ asitlerin birikmesine neden olduğu izlenmiştir. Bu metabolit birikimi lezzetin yoğunlaşmasını arttırmış ve peynir olgunlaşmasını hızlandırmıştır (Crow ve diğ. 2001, De Angelis ve diğ. 2001).

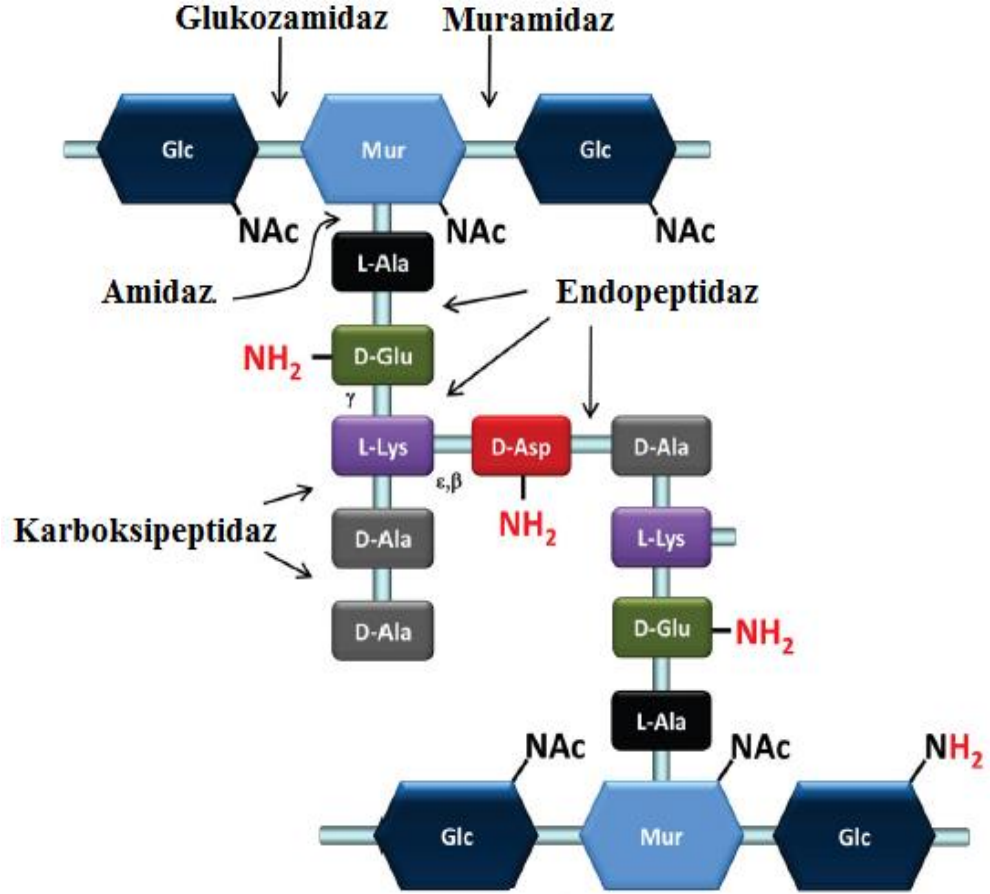
Homofermentatif LAB mevcut şeker kaynağını pürivat üzerinden enerji sağlamak ve redoks dengesini kurmak için laktik aside dönüştürür. Ancak pürivat, asetat, etanol, diasetil ve asetaldehit gibi diğer metabolitlerin birikimine de aracılıdır. Bu yolla LAB'leri fermente gıdaların tipik aromasını (tereyağı/diasetil, yoğurt/asetaldehit, kefir/etanol, ekşihamur/laktik ve asetik asit) kazanmasını sağlar. Optimal fermentasyon bu uçucu bileşiklerin üretiminin artırılmasını mümkün kılar (Kleerebezem ve diğ. 2000).

LAB'lerinin fermente gıdaların aromasının geliştirilmesindeki mekanizmalarından bir diğeri ise bu bakterilerin peynir olgunlaştırılmasında otolize uğrayarak hücre içi enzimlerinin salınması ve akabinde peptidaz enzimlerinin amino asitleri açığa çıkararak çeşitli aromatik bileşiklerin üretilmesinin yolunu açmasıdır. Hatta bakterilerin otolizi için çeşitli bakteriyosinlerin veya faj lizinlerinin kullanımına yönelik çalışmalar da mevcuttur (Crow ve diğ. 1995, Martinez-Cuesta ve diğ. 2001).

1.2.2 LAB'lerinde Otoliz

Bakteri hücreleri peptidoglikan tabakaları içeren hücre duvarı yapısıyla çevrilidir. Peptidoglikan yapısı bakteriyel gelişimde hücre bütünlüğünün ve şeklinin sürdürülmesinin yanında hücre içi turgor basıncının dengelenmesi gibi hayati fonksiyonlara sahiptir. Bu yapı aynı zamanda hücre gelişimi ve bölünmesinde de elastikiyet özellik kazandırır. Söz konusu olan iki zıt fonksiyonun yerine getirilmesi ancak peptidoglikan sentez ve degradasyon enzimlerinin hassas bir koordinasyonu ve dengesi ile sağlanır. Bu dengenin bozulması hücre gelişiminin durması ya da hücrenin lize olması ile sonuçlanır. Bakteri hücre duvarında bulunan ve otolisin olarak isimlendirilen enzimler tarafından peptidoglikan tabakanın hidrolizi ile hücre bütünlüğünün bozulması bakteriyel otoliz olarak tanımlanır (Shockman ve diğ. 1996, Crouigneau ve diğ. 2000).

Bakteriyel otolizin anlaşılması için hücre duvar yapısının bilinmesi gerekir. Bakteriyel hücre duvarında önemli oranda bulunan ve ağısı tabakayı oluşturan peptidoglikan tabaka Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde ortakdır. Şekil 1.1 de de verildiği gibi peptidoglikan tabaka *N*-asetilmuramik asit (NAM), *N*-asetilglukozamin (NAG) olmak üzere iki tip şeker türevi ve az sayıda özgül aminoasit içerir. Bu aminoasitler; L-Alanin, D-Glutamik asit, Diaminopimelik asit (DIP) ve D-Alanin'dir. Gram-pozitif bakterilerde DIP yerine L-Lizin veya başka bir L-formu aminoasit olabilir. NAM ve NAG birbirine $\beta(1-4)$ glikozidik bağ ile bağlıdır. Tetrapeptidler NAM'e bağlı olup kendi aralarında D-Alanin ve DIP arasında (Gram-negatif) veya D-Alanin ve Lizin (Gram-pozitif) arasında tetrapeptid yan zincirleri oluşmaktadır. İskelet yapı tüm bakterilerde aynı olmasına karşılık tetrapeptid yan zincirler ve çapraz bağlar türden türe değişiklik göstermektedir. Tetrapeptidlerden ilki L-Alanin olup NAM'ye bağlıdır. İkinci aminoasit D-Glutamik asit, üçüncü DIP ve dördüncüsü ise D-Alanin'dir. Daha önce de vurguladığı gibi en değişken olan üçüncü aminoasit DIP olup Gram-pozitif bakterilerde bu aminoasit aynen kalabildiği gibi yerine L-Lizin veya diğer L formu diğer aminoasitler gelebilir. Gram-negatif bakterilerde lipoprotein tabaka DIP'ye bağlanır. DIP sadece prokaryotik hücre duvarında bulunur. Glikan zincirini oluşturan glikozid bağları çok güçlü bağlar olmasına karşılık çapraz bağlar ile bu yapı yeterli güçlülüğe kavuşabilir. Yapının dayanıklılığını esas olarak veren esnek çapraz bağlardır (Madigan ve diğ. 2010).



Şekil 1.1: Bakteri hücrelerinde bulunan peptidoglikan yapısı ve bu yapıyı hidroliz eden hidrolaz enzimleri ile spesifik kesim bölgeleri (Chapot-Chartier ve diğ. 2014)

LAB'lerde peptit yapısında amino asitler L-Alanin- γ -D-Glutamik asit-X-D-Alanin olarak sıralanır. Üçüncü amino asit genellikle L-Lizin'dir (örneğin *Lc. lactis* ve birçok laktobasilde). Fakat bazen bu amino asit mezo-diaminopimelik asit (mDAP) veya L-ornitin olabilmektedir. LAB'lerin hücre duvar yapısında bulunan peptitin 4. pozisyonunda hep D-Alanin amino asiti bulunur. İki peptidoglikan arasında çapraz bağlanma peptit yapılarının 1. ve 4. pozisyonundaki amino asitler arasında gerçekleşir. Bu peptit bağ, 3. pozisyonunda mDAP bulunan *Lb. plantarum* gibi laktik suşlarda doğrudan kurulurken, bu pozisyonda lizin amino asidini içeren *Lc. lactis* ve *Lb. casei* suşlarında birkaç D- veya L- aminositlik köprü ile bağlanma sağlanır (Chapot-Chartier ve Kulakauskas 2014).

Otolisinler bakterilerin bölünme süreçlerinde veya stres koşullarında aktivite gösteren hücre içi peptidoglikan hidrolazlardır. Bugüne kadar farklı bağlar için hidrolitik özgülüğüne göre farklı peptidoglikan hidrolaz enzimleri tanımlanmıştır. Bunlardan en sık rastlanılan peptidoglikan hidrolazlar; i) *N*-asetil muramik asit ve *N*-asetil glukozamin arasındaki $\beta(1-4)$ bağımlı hidroliz eden *N*-asetilmuramidazlar, ii) *N*-asetil glukozamin ve *N*-asetil muramik asit arasındaki $\beta(1-4)$ bağımlı hidroliz eden *N*-asetilglukozaminidazlar, iii) *N*-asetil muramik asit ile laktil grup arasındaki bağımlı hidroliz ederek L-Alanin aminoasidinin açığa çıkmasını sağlayan *N*-asetilmuramil-L-Alanin amidazlar, iv) peptidoglikan bağlarını hidroliz eden endopeptidaz, karboksipeptidazları içeren peptidazlar'dır (bkz.Şekil 1.1).

Bakteriyel peptidoglikan hidrolazlar modüler organizasyona ve hücre duvarına bağlanma domaini ile ilişkili katalitik bölgeye sahiptir. Katalitik bölge peptidoglikan tabaka için hidrolitik özgülüğü tayin eder. Çünkü bu fonksiyonel bölge hücre duvarı bileşenini tanıyarak, enzim yerleşimini etkiler ve bakteriyel seçiciliği belirler. Birçok bakteride bugüne kadar tespit edilen peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin hücre duvarına bağlanan domain örnekleri; LysM, SH3 ve Lc-LysBD'dir.

Genom sekans analizleri bakteride peptidoglikan hidrolaz enzimlerin tespitini ve bu enzimlerin genetik dizisinden amino asit dizisinin çıkarılmasını mümkün kılmıştır. Birçok Gram-pozitif bakterinin birden fazla kompleks yapıda peptidoglikan hidrolazları içerdiği anlaşılmıştır. LAB'lerinde yürütülen genom sekans analizleri bu bakterilerin de oldukça farklı peptidoglikan hidrolazları içerdiğini göstermiştir. Örneğin, *Lb. casei*'de 12, *Lb. helveticus*'da 9 ve *Lb. plantarum*'da 12 farklı peptidoglikan hidrolaz enzimleri tespit edilmiştir (Rolain ve diğ. 2012) (Tablo 1.1).

LAB'lerde ilk tespit edilen peptidoglikan hidrolaz, *Lc. lactis*'te AcmA'dır (Buist ve diğ. 1995). AcmA modüler bir yapıya sahip olup, N-terminal katalitik bölge *N*-asetil glukozaminidaz özgülüğü gösterir ve C-terminal bölgesinde ise 3 adet LysM dizi deseni bulunur (Steen ve diğ. 2005). LysM deseni peptidoglikan yapıya bağlanmadan sorumludur ve AcmA'nın bölünme düzlemine yerleşmesini sağlar (Steen ve diğ. 2003). *Lb. plantarum*'un temel otolisini olan *N*-asetil glukozaminidaz enzimi Acm2, yapısal olarak AcmA'dan farklıdır. Acm2'de katalitik bölgeye ilaveten, üç adet SH3 bölgesi ve N-terminalinde Ala/Ser/Thr (AST) amino asitlerince zengin

bölge bulunur (Rolain ve diğ. 2012). Bunların dışında γ -D-Glu-L-Lys endopeptidaz aktivitesi gösteren MspI ve Lc-p75 enzimleri sırasıyla *Lb. rhamnosus* (Claes ve diğ. 2012) ve *Lb. casei* (Regulski ve diğ. 2012) suşlarında tespit edilmiştir. *S. thermophilus*'ta bulunan Cse peptidoglikan hidrolaz enzimi CHAP bölgesini içermekte ve DL endopeptidaz aktivitesi ile peptidoglikan çapraz bağları arasından kesimler yapmaktadır (Layec ve diğ. 2008). *Lc. lactis*'te üç farklı glukozaminidaz peptidoglikan hidrolazı tespit edilmiştir. Bunlardan birisi (AcmA) LysM bölgesi içerirken, diğer ikisi (AcmB ve AcmC) LysM içermez. Bunlara ilaveten bir de γ -D-Glu-L-Lys-endopeptidazı (YjgB) bulunur (Redko ve diğ. 2007).

Yukarıda sunulan LAB'lere ait peptidoglikan hidrolaz örnekleri temel otolisinlerdir. Bu enzimler özellikle kardeş hücre bölünmesinin tamamlanmasını sağlar. Herhangi bir bakteriyel hücrede bu enzimleri kodlayan genlerin inaktivasyonu durumunda kardeş hücre bölünmesinde kusura ve uzun zincir oluşumuna neden olur (Layec ve diğ. 2008). Rolüyle ilişkili olarak, bu enzimler hücre septumunda yer alır. Bölünmedeki rolünün yanında AcmA ve Acm2 enzimleri hasar görmüş bakteri hücrelerin durağan faz ya da tampon içindeki otolizini de gerçekleştirir (El-Kholy ve diğ. 1998, Kenny ve diğ. 2006, Lortal ve Chapot-Chartier 2005, Chapot-Chartier ve Kulakauskas 2014).

Bakteriyel otolizi gerçekleştiren peptidoglikan hidrolaz enzimlerin regülasyonu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede gerçekleştirilir. Post-translasyonel seviyedeki regülasyonlardan birisi, peptidoglikan hidrolaz enzimlerin aktivitesinin proteolitik parçalanarak kontrol edilmesidir. *Lc. lactis*'te temel otolisin olan AcmA'nın hücre dışı proteaz olan PrtP tarafından parçalandığı, *Lc. lactis* MG1363'te plazmid kodlu PrtPI ve PrtPIII enzimlerin otoliz ile ilişkisinin tespiti ile anlaşılmıştır (Buist ve diğ. 1998). Aynı zamanda hücre için zorunlu olan HtrA proteazının da AcmA otolisinini parçaladığı gösterilmiştir (Poquet ve diğ. 2000). Proteolitik regülasyonunun dışında peptidoglikan hidrolaz aktivitesinin bir diğer kontrolü ise hücre duvarında bulunan ikincil polisakkaritlerin peptidoglikan tabakayı otolisinlerin etkisinden korumasıyla gerçekleşir. *Lc. lactis*'te yapılan çalışmada AcmA'nın LysM bölgelerinin peptidoglikan tabakaya bağlanmasının, ikincil polisakkarit yapıları tarafından maskelenerek engellendiği ortaya çıkmıştır (Steen ve diğ. 2003).

Bakteriyel hücrede peptidoglikan hidrolaz genlerinin transkripsiyonel regülasyonu, hücre zarının stres yanıtı kapsamında çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır. Örneğin, *S. aureus*'ta peptidoglikan hidrolaz geni ikili regülasyon sistemi ile kontrol edilirken, *B. subtilis*'te alternatif sigma faktörü ile düzenlenmektedir (Smith ve diğ. 2000).

Tablo 1.1: LAB peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin temel karakteristikleri (Lortal ve Chapot-Chartiel 2005)

Peptidoglikan Hidrolaz	MM (kDa)	PI	Hidrolitik Etkisi	Yapısı
AcmA	46,5	10,8	N-asetil glukozaminidaz	2 domaine sahip N terminal: Katalitik domain C terminal: LysM domaini
AcmB	52,2	5,0	N-asetil glukozaminidaz	3 domaine sahip N terminal: S/T/G/P İç bölgesi: Katalitik domain C terminal: Zn bağlanan domain
AcmC	23,7	10,2	N-asetil glukozaminidaz	Katalitik domain
AcmD	37,5	4,3	N-asetil muramidaz veya N-asetil glukozaminidaz	2 domaine sahip N terminal: Katalitik domain C terminal: LysM domaini
YjgB	20,7	5,8	Endopeptidaz	Katalitik domain
MurI	24,7	9,7	N-asetil muramidaz veya N-asetil glukozaminidaz	Katalitik domain
Mur	23,8	9,6	N-asetil muramidaz veya N-asetil glukozaminidaz	Katalitik domain

1.2.3 LAB'lerde Otoliz Üzerine Etkili Faktörler

Bakteriler; hücre duvarı kompozisyonuna, otolizi teşvik eden koşulların bulunmasına ve genom yapısındaki hatalara bağlı olarak farklı otolitik aktivite gösterebilirler (Lortal ve Chapot-Chartier 2005). Bunların dışında bölünme sırasında peptidoglikan yapısında oluşan farklılıklar aynı tür bakterilerin otoliz davranışlarını değiştirebilir (Smith ve diğ. 2000). LAB'lerde otolizi ise; genetik yapının çeşitliliği, karbon kaynağı, sıcaklık, ozmotik konsantrasyon, büyüme fazı ve pH gibi faktörlerin etkilediği rapor edilmiştir. Buna yönelik örnekler kronolojik sıra ile aşağıda sunulmuştur. Tablo 1.2' de bazı LAB'lerin otoliz oranları ve ilişkili otoliz koşulları verilmiştir.

Bie ve Sjöström (1975), LAB'lerin otolitik özelliklerini etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla, sıcaklık, pH ve iyonların etkisi üzerine araştırmalar yürütmüştür. Çalışmada LAB'lerinin 19°C'de maksimum, 14°C'de ise minimum otoliz aktivitesine sahip olduğunu ve pH'ın 4,9 dan 5,9'a arttıkça da otoliz oranında artış görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca ortamdaki Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının otolizi yavaşlattığı, Na^{+2} iyonlarının ise teşvik ettiği saptanmıştır.

Dako ve diğ. (1995) 4 laktobasil, 4 laktokok ve 1 pediokok'un peynir ortamdaki otolizini araştırmıştır. Çalışmada pH'sı 5,2 olan 0,1-0,2 M, ve %2 NaCl/sodyum fosfat tamponunda 30°C 'de 48 saat inkübasyon uygulanmıştır. Sonuç olarak laktobasil suşlarının otolizinin laktokok ve pediokoklara oranla yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca fosfat konsantrasyonundaki artışla birlikte otoliz oranlarında da artış izlenmiştir.

Bir başka çalışmada Boutrou ve diğ. (1998), 26 laktokok suşunun tamponlanmış ortamda (pH:5, 15 g/L NaCl içeren sodyum sitrat tamponu) otolitik aktivitelerinin önemli farklılıklar gösterdiğini tespit etmiş ve suşları düşük (%-15-0), orta (%0-15) ve yüksek (%15-30) otolitik aktiviteli olarak 3 gruba ayırmıştır.

Çıbık ve Chapot-Chartier (2004), 9 farklı *Lb. pentosus* suşunun otolitik aktivitesini araştırdıkları çalışmasında, söz konusu suşları MRS ortamında geliştirdikten sonra tampon ortamına (potasyum fosfat, 50 mM, pH 6,5) transfer etmiştir. 24 sa inkübasyon sonucunda tampon ortamında suşların otoliz oranlarının

%34 ile %94 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmanın devamında renature SDS-PAGE yöntemi ile suşların peptidoglikan hidrolaz profili izlenmiştir. En yüksek otolitik aktivite gösteren *Lb. pentosus* 1091 suşunda boyutları 58 ve 112 kDa olan iki farklı peptidoglikan hidrolaz enzimin bulunduğu tanımlanmıştır. Çalışmanın sonucunda *Lb. pentosus* suşlarında otoliz özelliklerinin suşa bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve en az iki otolisin enziminin bulunduğu değerlendirilmiştir.

Kozkov ve diğ. (2010) ise *Lc. lactis* HMM81 ve *Lc. lactis* NIZO B643 suşlarının otolizi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 13, 30, 45 ve 56 C’de 12 gün boyunca inkübe etmiştir. Bu çalışmanın verilerine göre inkübasyonun ilk 6 gününde *L. lactis* HMM81 30 C’de yüksek oranda otoliz olurken, 12 gün inkübasyon sonunda 13C ve 30C’de suşun otoliz oranı eşitlenmiştir. *Lc. lactis* NIZO B643 suşunda da inkübasyonun ilk 6 gününde benzer otolitik davranış gözlenirken, 6-12 günler arasında 13C’de daha fazla otoliz meydana gelmiştir.

Yapılan bir çalışmada 10 farklı *Lc. lactis* suşunun aynı pH ve tuz konsantrasyonunda otolitik özelliklerinin farklılık gösterdiği, suşların büyük çoğunluğunun düşük tuz konsantrasyonunda ve pH’da daha yüksek oranda otoliz oldukları tespit edilmiştir (Nunez ve diğ. 2011).

Tablo 1.2: Otolitik aktiviteye sahip bazı LAB'leri, otoliz koşulları ve oranları

LAB İzolatı	Otoliz Koşulu	% Otoliz	Kaynak
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>		75	
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>		55	
<i>Lb. plantarum</i>		45	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Sodyum fosfat tamponu (0,1 M pH:5,2 %2 NaCl) 30°C de 48 sa inkübasyon	51	(Dako ve diğ.1995)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		39	
<i>P. acidilactici</i>		51	
<i>Lc. lactis</i>	0,17M NaCl, pH:5,4 30°C 24 sa inkübasyon	41	
<i>Lc. lactis</i>	0,17M NaCl, pH:7,0 30°C 24 sa inkübasyon	55	(Nunez ve diğ. 2011)
<i>Lc. lactis</i>	0,51M NaCl, pH:5,4 30°C 24 sa inkübasyon	39	
<i>Lc. lactis</i>	0,51M NaCl, pH:7,0 30°C 24 sa inkübasyon	64	
<i>Lc. lactis</i> HMM81	Sitrat tamponu (0.50M Ph:5,0 % 1,5NaCl) 13°C 13gün inkübasyon	48	(Boutrou ve diğ. 1998)
<i>Lb. pentosus</i> 1091	Potasyum fosfat tamponu (0,50M pH: 6,5) 30°C 24 sa inkübasyon	94	(Çıbık ve Chapot-Chartier 2004)
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	Sodyum fosfat tamponu (0,1M,pH: 7,0) 45°C 24 sa inkübasyon	45	(Lortal ve diğ. 1991)
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	Tris/HCl tamponu(0,1M pH:7,5) 45°C 24 sa	60	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis biovar diacetylactis</i> INF-E2-6	Potasyum fosfat tamponu (0,05M pH:7,0) ve glisin- NaOH tamponu(0,05M pH:9,0) 30°C 6 gün inkübasyon	80	(Ostlie ve diğ. 1995)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> INF-L4	Potasyum fosfat tamponu (0,05M pH:7,0) 30°C 8 sa inkübasyon	65	
<i>Lb. acidophilus</i>	Sodyum sitrat tamponu (0,025M, pH:6,0) 37°C 24 sa inkübasyon	32	(Higgins ve diğ.1973)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Potasyum fosfat tamponu (0,1M pH:6,7) 32°C 24 sa inkübasyon	65	(Terzaghi ve Sandine 1975)

1.2.4 LAB Otolizinin Teknolojik Önemi

LAB otolizinin ön plana çıkmış teknolojik önemi peynirin olgunlaştırılmasının hızlandırılmasıdır. Hızla artan nüfus ve tüketicilerin alışmış oldukları aromada peynir talebi peynirin olgunlaştırılması yönündeki çalışmalarını gündemde tutmaktadır. Diğer taraftan olgunlaştırma odalarının kullanım kapasitelerinin yükseltilmesi, peynir üretiminin artırılması ve maliyetlerin düşürülmesi açısından da bu çalışmaların faydalı olacağı varsayılmaktadır. Bu yüzden peynirin olgunlaştırılmasının hızlandırılması veya standardizasyonu amacıyla starter kültür kullanımı veya starter kültürlerin lizizinin teşvik edilmesi temel stratejilerdendir. Olgunlaşma süresince starter bakterilerin lizizini arttırmak için kullanılan yaklaşımlar; (i) yüksek otolitik aktiviteye sahip starter bakterilerin, (ii) litik bakteriyofajların veya (iii) üretimde bakteriyosin üreten destek kültürlerin kullanılmasıdır (Oumer ve diğ. 2001).

Peynir üretiminin ardından peynir matriksinde bulunan LAB'lerinin otolizi sonucunda hücre içi enzimlerinin serbest kalması, peynir lezzetinin gelişmesinde ve dolayısıyla olgunlaşmasının hızlandırılmasında önemlidir. Peynir pıhtısında bulunan kazein, rennet ve sütte doğal olarak bulunan plazmin vasıtasıyla hidrolize edilerek peynir üretimi ve olgunlaşması sırasında LAB'lerin kullanabileceği peptitlere parçalanır. Bu peptitler de LAB'lerin otolizi sonucunda ortama salıverilen hücre içi peptidazları ile daha ileri seviyede parçalanarak daha küçük molekül ağırlığındaki peptitlere ve serbest amino asitlere kadar parçalanmaktadır. Böylece uçucu aroma bileşiklerinin oluşumunda ön bileşik olan aromatik, dallanmış zincirli ve sülfür içeren amino asitler açığa çıkarılır (Valence ve diğ. 2000, Beresford ve diğ. 2001, McSweeney 2004).

LAB'lerinin bazı otolitik suşları peynir üretiminde kullanılarak peynirin olgunlaşmasını hızlandırdığı ve lezzet gelişimini arttırdığı çeşitli çalışmalarla ispatlanmıştır. Birçok araştırmacı otolizin, proteoliz işlemini arttırarak peynirin olgunlaşma sürecinde serbest amino asit miktarını artırdığını gözlemlemiştir (Crow ve diğ.1995, Lepeuple ve diğ. 1998, Meijer ve diğ. 1998).

Hannon ve diğ. (2003), starter kültürlerin otolizinin peynir aromasının oluşumunu hızlandırdığını ve peynirdeki acılığı azaltarak duyuşal özelliklerinin iyileştirildiğini rapor etmişlerdir.

Law (2001), çoğıu sert peynirlerin arzulanan aromayı kazanabilmesinin ancak ortalama 1-2 yıl olgunlaşma süresi ile olduğunu, bu sürenin kısaltılabilmesi için Cheddar peynirin üretiminde otolitik aktiviteye sahip starter kültür kullanılmasının aroma ve kalitede olumlu sonuçlar verdiğini belirtmiştir.

El Soda (1993), Cheddar peynirinde *Lb. casei*'nin düşük ve yüksek otolitik aktiviteye sahip suşlarının aminopeptidaz aktivitesine etkisini gözlemlemiş, yüksek otolitik aktiviteye sahip suşun 2 günde geldiğı olgunlaştırma seviyesine, düşük otolitik aktiviteye sahip suşun 1 hafta sonra geldiğini belirtmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan 34 adet çiğ süt örneği, Denizli ve yöresindeki (Merkez, Güney, Honaz, Acıpayam, Buldan) farklı süt üreticilerinden, 16 adet peynir numunesi (3 adet Beyaz, 3 adet Kaşar, 4 adet Köy tipi, 3 adet Ezine, 3 adet Tulum,) ise yerel pazar ve şarküterilerden temin edildi. Örnekler steril kavanozlara aseptik koşullarda alındı ve 4°C'de muhafaza edilerek aynı gün içerisinde analiz edildi.

Çalışma sonucunda tanımlanan bakteri izolatları, son konsantrasyonu %30 steril gliserol içeren besiyeri ortamında -70°C'de muhafaza edildi. Tüm suşlar Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonuna (PUFECC) kayıt edilerek saklandı.

2.1 LAB'lerin Sayımı ve İzolasyonu

Temin edilen çiğ süt ve peynir örneklerinden peptonlu fizyolojik tuzlu su kullanılarak uygun oranlarda dilasyonlar hazırlandı. LAB'lerin gelişimi için MRS (Oxoid) ve %0,5 glukoz ilave edilen M17 (Oxoid) katı besiyeri ortamları kullanıldı. Termofil LAB'lerin sayımı için 43°C, mezofil LAB'lerin sayımı için ise 30°C'de 48 sa inkübasyon uygulandı. Petrilerde oluşan koloniler sayılarak, örneklerdeki LAB sayısı log kob/mL veya log kob/g olarak hesaplandı.

LAB'lerin izolasyonu MRS ve M17G agar üzerinde gelişen kolonilerden seçilerek yapıldı. Buna göre 30-300 koloni düşmüş petrilerden her numune için farklı olduğu düşünülen 40 adet koloni seçilerek MRS ve M17G sıvı besiyerinde termofilik ve mezofilik koşullarda geliştirildi.

2.2 LAB İzolatlarının Otolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilen her bir izolat uygun sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirildi. Daha sonra tüm izolatlar 9000 g'de oda sıcaklığında 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar dökülmüş ve hücre biyokütlesi 5 mL potasyum fosfat tamponuyla (100 mM, pH:7,0) iki kez yıkandı. LAB izolatlarının yoğunluğu 0,6-0,8 (OD₆₂₀) aralığına tampon kullanılarak ayarlandı. Son olarak belirli yoğunluktaki hücre süspansiyonları 96 kuyucuklu mikropalakalara (Costar) dolduruldu ve plaka okuyucu (Multiskan, Thermo) cihazına yerleştirildi. Cihaz üzerinde sıcaklık 30°C ve dalga boyu ise 620 nm'ye ayarlanarak, 2 sa aralıklarla toplam 24 sa yoğunluk okuması yapıldı. LAB izolatlarının otoliz yüzdesi; $100 - [(son\ okuma/ilk\ okuma) \times 100]$ formülü kullanılarak hesaplandı (Cibik ve diğ. 2006). Çalışmada otolitik aktivitesi %30'dan fazla olan peynir izolatları ile %40'dan fazla olan çiğ süt izolatları seçildi.

2.3 LAB İzolatlarının Tanımlanması

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen ve yüksek otolitik aktiviteye sahip 33 adet LAB izolat tanımlanmak amacıyla önce (GTG)₅ parmak izi ile sınıflandırıldı ardından 16S rDNA geni çoğaltılarak DNA dizisi belirlendi. Söz konusu LAB izolatlarının nihai tanımlamaları, elde edilen dizinin NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) üzerinden dizi benzerliği araştırılarak gerçekleştirildi.

LAB izolatlarının tanımlanması için öncelikle genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için -70°C'de bulunan stoklardan izolatlar aktifleştirildi ve uygun besiyerlerine çizim yapılarak 24 sa mezofiller için 30°C, termofiller için 43°C sıcaklıkta inkübasyon yapıldı. Tek düşen koloniler seçilerek MRS veya M17G sıvı ortamına inokule edildi. 10⁹ kob/ml oranında hücre alınarak genomik DNA saflaştırma kitinin (Invitrogen) protokolü doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen ve saflaştırılan genomik DNA'ların saflık kontrolleri spektrofotometre'de (PG Instruments, UK) 260/280 nm alınan absorbans oranı ve %0,8'lik agaroz jel (Sigma) üzerinde elektroforez sisteminde (Thermo) yürütülüp ardından DNA görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat) görüntülenerek belirlendi.

Çalışmada seçilen izolatlar arasında benzer şuşların ayrılması için genomik (GTG)₅ parmak izi profilleri karşılaştırıldı. Bu tekrar serilerinin çoğaltılmasında her bir şuş için 20 µl'lik PZR karışımı kullanıldı. Söz konusu karışımda 4 µl master mix (5*FIREPol^R Master Mix / SOLIS BioDyne), 1 µl primer (5-GTGGTGGTGGTGGTG-3), 1 µl kalıp DNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde steril ultra saf su kullanıldı. PZR işleminde 95°C 3 dk ön denatürasyon, 30 döngü 95°C 1 dk, 45°C 30 sn, 72°C 5 dk ile 72°C 10 dk son uzama programı uygulandı. PZR ürünleri %1' lik agaroz jelde (Sigma) yürütülerek jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat) oluşan bant profilleri analiz edildi. (GTG)₅ profil farklılığı esasına göre izolatlar gruplandırıldı.

LAB izolatlarının tanımlanması için 16S rDNA geninin 1464 bç bölümü iki farklı primer çifti (529F-1491R ve 27F-780R) kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. PZR karışımı 5 µl tampon, 2 µl dNTP karışımı (Fermentas), 1'er µl (529F 5' GTGCCAGCMGCCGCGG 3' - 1491R 5' ACGGCTACCTTGTACGACTT 3' ve 27F 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' - 780R 5'TACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3') ileri ve geri yönlü primer, 1 µl Hi-Fi Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 2 µl genomik DNA'dan oluşturuldu ve toplam hacim 50 µl' ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan tüplere Techne (UK) cihazında 95°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonunu takiben 30 döngü 95°C'de 30 sn, 57°C'de 30 sn, 72°C' de 1 dk ve son aşamada ise 72°C' de 5 dk içeren bir program uygulandı.

PZR ile çoğaltılan fragmentlerin doğruluğu ve saflık kontrolü %1 agaroz jelde (Sigma) yürütülerek izlendi. Doğru büyüklükte ve saflıktaki PZR fragmentlerin PZR saflaştırma kiti (Fermentas) ile temizliği yapıldıktan sonra, RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji A.Ş. (Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Ankara) tarafından DNA dizi analizi yapıldı. Çalışmada bakterilerden elde edilen fragmentlerin DNA dizileri EMBL veri tabanında taranarak nihai tanımlandı.

2.4 LAB'lerin Otolitik Özelliklerine Çevresel Faktörlerin Etkisi

Yüksek otolitik aktiviteye sahip ve moleküler tanımlaması yapılan 10 adet LAB şuşunun otolizi üzerine pH, tuz, inkübasyon zamanı, sıcaklık ve şeker çeşitliliği gibi çeşitli çevresel faktörlerin farklı parametrelerinin etkisi araştırıldı. Buna göre

-70°C’ de saklanan stoklardan aktifleştirilen her bir suş MRS ve M17G sıvı ortamında geliştirildikten sonra 9000 g’de 15 dk santrifüj ile toplandı. Daha sonra LAB suşlarının otolitik aktivitesi üzerine ortam pH’sının etkisinin belirlenmesi için hasat edilen bakteri hücreleri, pH’sı 3,5, 4,0, 5,0 ve 7,0’ye ayarlanmış potasyum fosfat (100 mM) tamponunda; tuz konsantrasyonunun etkisi için %3, %5, %7 ve %10 tuz içeren potasyum fosfat (100 mM, pH 7,0) tamponunda çözündürüldü ve 30°C’de 24 sa inkübe edilerek bakterilerin otolitik aktivitesi hesaplandı. İnkübasyon süresi ve sıcaklığın bakterilerin otolitik aktivitesi üzerine etkisinin tespiti için, hasat edilen hücreler normal potasyum fosfat (100 mM, pH 7,0) tamponunda çözündürülerek, 12 ve 24 sa inkübasyon süresi ile 10, 20, 30 ve 40 °C inkübasyon sıcaklığı parametreleri kullanıldı. Ayrıca bakterilerin geliştirilmesinde kullanılan şekerlerin otolitik aktivite üzerindeki etkisi için, bakteriler önce %1 glukoz, laktoz, sakkaroz veya maltoz şekerlerinden birini içeren modifiye MRS ve M17 ortamlarında geliştirildikten sonra santrifüjle çöktürüldü ve normal potasyum fosfat (100 mM, pH 7,0) tamponunda çözündürülerek 30°C’de 24 sa inkübe edildi. Deneysel parametreler ile hazırlanan tüm tampon ortamlarında bakteriler 0,6-0,8 (OD₆₂₀) hücre yoğunluğunda kullanıldı ve hücrelerin yoğunluğunun değişimi plaka okuyucuda (Multiscan, Thermo) ölçüldü.

Son olarak peynirin üretim ve olgunlaşma koşulları dikkate alınarak, Tablo 2.1’ de verilen çevresel faktörlerin kombinasyonlarının uygulanmasıyla 24 sa inkübasyon sonunda LAB’lerin otoliz oranları belirlendi. Potasyum fosfat tamponu (100mM) Tablo 2.1’ de verilen koşullara ayarlanarak LAB suşlarına uygulandı.

Tablo 2.1: LAB’lerinin otolizinin belirlenmesi için kullanılan çevresel faktörlerin kombinasyonları.

NaCl (%)	pH	T (°C)
5	5	10
5	4	10
3	5	10
3	4	10

2.5 Otolitik Aktiviteye Sahip LAB'lerinin Proteolitik Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında otoliz olan LAB'lerinin hücre içi proteolitik aktivitesi, otoliz sonrası salınan hücrel enzimler tarafından kazeinin parçalanmasının Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel (SDS-PAGE) üzerinde izlenmesi ile belirlendi (Schagger ve Jagow 1987). Buna göre SDS-PAGE analizi için Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanıldı.

Proteolitik aktivitesi araştırılacak olan 10 adet LAB'nin öncelikle otolizi sağlandı. Bunun için daha önce belirtildiği gibi bakteriler stoklardan aktive edildi ardından santrifüjlenerek hücre biyokütlesi elde edildi ve hücre yoğunluğu 0,6-0,8 (OD₆₂₀) aralığına potasyum fosfat (100 mM, pH 7,0) tamponu ile ayarlandı. Bu şekilde 30°C'de 24 sa inkübe edilerek bakterilerin otoliz olması sağlandı. Takiben hücre biyokütlesi 9000 g'de 15 dk santrifüj ile ayrıldı ve 0,45 µ filtreden geçirildi. Otoliz olan hücrelerin enzimlerini içeren kültür üst sıvısı içerisine %0,1 oranında kazein ilavesi yapıldı ve 30°C'de sırasıyla 4, 24, 48 ve 72 sa inkübasyon uygulandı. Her bir inkübasyon saatinin sonunda örnekler alınarak SDS-PAGE jeline yüklendi.

SDS-PAGE sisteminde, 10x8 cm ve 10x7,5 cm ebatlarındaki cam plakalar % 70'lik etanol çözeltisi ile yıkanıp kurutulduktan sonra, Bio-Rad jel hazırlama sistemine yerleştirildi. Bu aşamadan sonra jel tarağının 1 cm altına kadar gelecek şekilde %12'lik ayırıcı jel döküldü. Üzerine yaklaşık 1 mL destile su ilave edilen ayırıcı jelin polimerizasyonu için 45 dk beklendi ve ortamdaki su filtre kağıdı ile alındı. Plakanın kalan kısmına yığma jel dökülerek tamamlandı ve tarak yerleştirildi. Yığma jelin polimerizasyonu için 20 dk kadar beklendikten sonra sırasıyla plakalar elektroforez tankına yerleştirildi, elektrot tamponu ilave edildi ve tarak çıkarıldı. Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına mikropipet aracılığıyla 25 µl olacak şekilde dolduruldu. Jel sistemine; yığma jeldeki göç için 75 V, ayırıcı jelde göç için ise 100 V akım uygulandı. Yaklaşık 2 saat ayırıcı jelde yürütülen örnekler jelin son kısmına ulaştığında sistem durduruldu. Sistemden çıkarılan jel, boyama çözeltisinde 45 dk ardından boya giderme çözeltisinde 45 dk tutuldu. Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek alınan jel fotoğraflarında proteinlerin moleküler büyüklükleri, marker proteinlerin (Thermo) bağıl hareketlilik (Rf) değerleri ve moleküler büyüklüklerinin

logaritmalarından yararlanılarak çizilen standart eğri kullanılmak suretiyle belirlendi. Sistemin hazırlanmasında ve yürütülmesinde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Ayırıcı Jel

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8) (Sigma)	6 mL
4xTris-Cl / SDS (pH 8,8)	3,75 mL
Steril distile su	5,25 mL
% 10 Amonyum persülfat	50 µl
TEMED (N’N’N’N’-Tetra-Metilendiamin)	10 µl

Yığma Jel

Akrilamit (% 30) / bisakrilamit (% 8) (Sigma)	0,65 mL
4xTris-Cl / SDS (pH 6,8)	1,25 mL
Steril distile su	3,05 mL
% 10 Amonyum persülfat	25 µl
TEMED	5 µl

Dökmeden önce her iki jele, % 10 amonyum persülfat ve TEMED ilave edilmiştir.

4xTris-Cl / SDS (pH 8.8)

Tris	91 g
Distile su	300 mL

pH 8,8 (1N HCl ile)

Distile su ile toplam hacim 500 mL’ye tamamlanmış ve 2 g SDS ilave edilip çözülmüştür.

4xTris-Cl / SDS (pH 6.8)

Tris	6,05 g
Distile su	40 mL

pH 6,8 (1N HCl ile)

Distile su ile toplam hacim 100 mL’ye tamamlanmış ve 0,4 g SDS ilave edilip çözülmüştür.

Amonyum Persülfat (% 10)

Amonyum Persülfat	0,1 g
Distile su	1 mL

Tris-Glisin Tamponu (5x)

Tris	15,0 g
Glisin	94 g
SDS (% 10)	50 mL

Bu karışım 700 mL distile su içerisinde çözülmüş ve toplam hacim distile su ile 1000 mL' ye tamamlanmıştır.

Boyama Çözeltisi

Commasie Brilliant Blue	1 g
Metanol	400 mL
Glasiyel Asetik Asit	100 mL
Distile su	500 mL

Boya Giderme Çözeltisi

Metanol	400 mL
Glasiyel Asetik Asit	100 mL
Distile su	500 mL

2.6 İstatistiksel Analiz

Çalışmada Minitab 14.0 paket programında one-way ANOVA testi kullanılarak, otolitik LAB suşlarının otolizi üzerine çevresel faktörlerin etkisinin karşılaştırılması için istatistikî analizler yapıldı. Örnekler arasındaki farkı karşılaştırmak amacıyla Tukey's testi uygulandı ($p < 0.05$).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinin LAB İçeriği

Çalışmaya dahil edilen çiğ süt ve peynir örneklerine ait M17G ve MRS agar ortamında gelişen LAB sayıları sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; çiğ süt örneklerinden M17G ortamında 30°C’de gelişen LAB sayıları <1 ile 8,33 log kob/mL arasında bulundu. Aynı ortamda 43°C’de gelişen LAB sayısı ise <1 ile 5,99 log kob/mL arasında belirlendi. Diğer taraftan, çiğ süt örneklerinden MRS ortamında 30°C’de gelişen LAB sayısı <1 ile 7,47 log kob/mL arasında, 43°C’de ise <1 ile 7,30 log kob/mL olarak saptandı. Çiğ süt örneklerinde M17G ve MRS ortamlarının ikisinde de 30°C’de gelişen LAB sayısı sırasıyla ortalama 6,45 ve 5,72 log kob/mL, 43°C’de ise 3,91 ve 3,78 log kob/mL olarak belirlendi. İlâveten her iki besiyerinde gelişen LAB sayıları kıyaslandığında, 30°C’de M17G ortamında daha fazla LAB sayısı tespit edildi. Bu sonuçlara göre çiğ süt örneklerinde mezofil karakterli LAB’lerin daha fazla bulunduğu ve özellikle laktokokların laktobasillere nazaran daha fazla olduğu anlaşılmıştır.

Peynir örneklerinin sayım sonuçlarında ise M17G ortamında 30°C’de gelişen LAB sayısı 3,00 ile 10,44 log kob/g arasında bulunurken, aynı ortamda 43°C’de gelişen LAB sayısı 3,00 ile 8,17 log kob/g arasında belirlenmiştir. Diğer taraftan, peynir örneklerinde MRS besiyerinde 30°C’de gelişen LAB sayıları 3,00 ile 7,43 log kob/g arasında, 43°C’de ise 3,00 ile 8,44 log kob/g olarak saptanmıştır. Peynir örneklerinden M17G ortamında 30°C’de gelişen LAB sayısı ortalama 7,48 log kob/g olarak tespit edilirken, 43°C’de 4,94 log kob/g olarak sayıldı. MRS ortamında her iki inkübasyon sıcaklığında önemli bir fark bulunmadı. Yine çiğ sütte olduğu gibi peynir örneklerinde M17G ortamında gelişen laktokokların sayısının yüksek olduğu bulundu. Çalışmada LAB sayısı Çelik ve diğ. (1998) tarafından bildirilen $1,0 \times 10^4$ - $5,6 \times 10^6$ kob/g değerinden daha yüksektir.

Tablo 3.1: Çiğ süt örneklerinin mezofil ve termofil LAB sayım sonuçları (log kob/mL).

Örnek	İzolat Kaynağı	M17		MRS	
		30°C	43°C	30°C	43°C
1	Süt	8,16	<3,00	7,29	<3,00
2	Süt	6,83	<3,00	5,77	<3,00
3	Süt	7,69	5,38	5,60	5,20
4	Süt	<1,00	2,70	<1,00	2,00
5	Süt	<3,00	<3,00	<1,00	<1,00
6	Süt	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
7	Süt	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
8	Süt	>7,00	4,00	2,84	2,77
9	Süt	>6,00	4,00	3,50	2,47
10	Süt	5,64	4,72	5,30	3,78
11	Süt	6,60	<3,00	5,78	4,63
12	Süt	5,90	3,60	4,00	3,04
13	Süt	7,41	4,64	7,05	4,07
14	Süt	7,88	4,34	4,85	4,04
15	Süt	7,88	3,00	6,88	3,00
16	Süt	7,88	5,13	7,11	4,62
17	Süt	8,01	<3,00	7,13	<3,00
18	Süt	<3,00	<3,00	7,17	<3,00
19	Süt	8,11	<3,00	7,39	<3,00
20	Süt	7,74	<3,00	7,17	5,43
21	Süt	7,67	<3,00	6,86	<3,00
22	Süt	8,28	<3,00	6,32	<3,00
23	Süt	8,33	<3,00	7,07	<3,00
24	Süt	8,29	4,81	4,64	3,95
25	Süt	6,00	5,41	7,09	5,04
26	Süt	6,00	3,00	7,04	<3,00
27	Süt	6,00	5,39	6,90	5,30
28	Süt	6,00	5,35	6,92	5,00
29	Süt	6,00	5,21	7,23	7,30
30	Süt	7,84	5,30	7,30	5,32
31	Süt	8,07	5,39	6,69	5,00
32	Süt	7,85	5,91	7,04	5,43
33	Süt	7,30	5,99	7,38	5,74
34	Süt	8,20	4,77	7,47	5,47

Tablo 3.2: Peynir örneklerinin mezofil ve termofil LAB sayım sonuçları (log kob/g).

Örnek	İzolat Kaynağı	M17		MRS	
		30°C	43°C	30°C	43°C
1	Beyaz Peynir	7,00	6,39	6,92	6,32
2	Beyaz Peynir	8,47	<3,00	<3,00	<3,00
3	Beyaz Peynir	8,34	<3,00	<3,00	7,23
4	Kaşar Peyniri	9,85	<3,00	<3,00	<3,00
5	Kaşar Peyniri	6,47	6,47	5,47	5,60
6	Kaşar Peyniri	7,47	7,00	7,30	6,00
7	Köy Peyniri	7,32	6,77	5,47	5,20
8	Köy Peyniri	8,71	<3,00	5,60	5,04
9	Köy Peyniri	7,30	<3,00	7,43	<3,00
10	Köy Peyniri	5,25	5,04	4,47	4,60
11	Tulum Peyniri	3,00	3,00	6,95	6,69
12	Tulum Peyniri	9,62	7,20	6,90	7,04
13	Tulum Peyniri	8,84	8,06	6,90	6,00
14	Ezine Peyniri	<3,00	<3,00	6,17	2,47
15	Ezine Peyniri	8,69	8,17	8,00	6,60
16	Ezine Peyniri	10,44	<3,00	5,69	8,44

3.2 LAB İzolatlarının Otoliz Oranları

Çalışmada çiğ süttten 515 adet ve peynirden 424 adet izolat toplandı. Söz konusu toplam 939 izolatın 24 sa inkübasyon süresince otoliz oranları Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

30°C'de gelişen ve çiğ süttten izole edilen LAB izolatların 6, 12, 18 ve 24. saatlerdeki en yüksek otoliz oranları sırasıyla %53, %57, %59 ve %65 olarak hesaplandı. 6, 12 ve 18. saatlerde 19M04 izolatı, 24. saatte ise 12M15 izolatının en yüksek oranda otoliz olduğu tespit edildi. Mezofil özellikte tüm çiğ süt izolatların otoliz eğilimleri inkübasyonun 12. saatinden itibaren arttı ve 18. saatten sonra en yüksek otoliz oranına ulaştı. Tüm bu suşların % 1,4'ünün (1M11, 12M15, 19M04, 24M05) 24. saate otoliz yüzdeleri %50'den fazla, %12,3'ünün ise %30 ila %50 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 3.3).

43°C'de gelişen ve çiğ süttten izole edilen LAB izolatların 6, 12, 18 ve 24. saatlerdeki en yüksek otoliz oranları sırasıyla %29, %37, %48 ve %49 olarak hesaplandı. 6. saatte 11T05, 12. ve 18. saatte 3T11 ve 24. saatte 17T17 izolatlarının

en yüksek oranda otoliz olduğu tespit edildi. Termofil özellikte tüm çiğ süt izolatların otoliz eğilimlerinin inkübasyonun 6. saatinden sonra artmaya başladığı, 12. saatten sonra ise en yüksek otoliz oranlara ulaştı. Buna göre değerlendirildiğinde termofil izolatlarının, mezofil izolatlarına kıyasla inkübasyonun daha erken saatinde otoliz olduğu belirlendi. Tüm bu suşların %2,6'sının (3T17, 5T08, 8T05, 11T13, 12T08, 17T17) 24. saatte otoliz yüzdeleri, %40'dan fazla, %27,7'sinin ise %20 ila %40 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 3.4).

30°C'de gelişen ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarının 6, 12,18 ve 24. saatlerdeki en yüksek otoliz oranları sırasıyla %54, %60, %59 ve %60'tır. En yüksek otoliz ise 44M03 izolatına aittir. Mezofil özellikteki tüm peynir izolatların otoliz eğilimleri inkübasyonun 6. saatinde artmaya başladı ve 18. saatten sonra en yüksek oranlarına ulaştı. Tüm bu suşların %5,37'sinin (36M14, 42M07, 42M11, 42M13, 42M15, 42M19, 44M03, 47M01, 47M07, 47M09, 49M03, 50M08, 50M09) 24. saate göre otoliz yüzdeleri %30'dan fazla, %11,15'inin ise %20 ila %30 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 3.5).

43°C'de gelişen ve peynirden toplanan LAB izolatlarının 6, 12, 18 ve 24. saatlerdeki en yüksek otoliz oranları sırasıyla %22, %36, %37 ve %40 olarak hesaplandı. 6. saatte 37T09, 12. ve 18. saatlerde 50T09 ve 24. saatte 46T20 izolatlarının en yüksek oranda otoliz olduğu tespit edildi. Termofil özellikte peynir izolatların otoliz eğilimleri inkübasyonun 12. saattinden sonra artmaya başladığı, 18. saatten sonra en yüksek oranlara ulaştığı görüldü. Buna göre termofil izolatlarının otolizinin mezofillere kıyasla inkübasyonun ilerleyen saatlerinde başladığı gözlemlendi. Tüm suşların %3,84'ünün (45T20, 46T02, 46T04, 46T06, 46T20, 50T07, 50T09) 24. saate göre otoliz yüzdeleri %30'dan fazla, %14,83'ünün ise %20 ila %30 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 3.6).

Çalışma kapsamında toplanan tüm izolatların otoliz oranları mevcut literatürlerle kıyaslandığında genel olarak uyumludur (Higgins ve diğ. 1973, Terzaghi ve Sandine 1975, Lortal ve diğ. 1991, Ostlie ve diğ. 1995, Dako ve diğ. 1995, Boutrou ve diğ. 1998, Nunez ve diğ. 2011, Çıbık ve Chapot-Chartier 2004).

Tablo 3.3: Çiğ süttten izole edilen mezofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon sürecinde % otoliz değerleri

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> %0 %50 %100 </div>									
İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
1M01	3,25	7,73	10,96	5,25	3M16	0,67	3,49	5,34	7,63
1M02	14,47	14,95	23,53	29,73	3M17	0,00	2,28	4,74	5,62
1M03	23,97	23,17	23,16	24,36	3M18	6,39	8,50	13,96	18,24
1M05	12,09	4,75	28,94	30,30	3M19	5,12	11,01	15,99	17,96
1M06	0,00	0,00	1,72	4,77	3M20	0,00	0,00	0,00	3,03
1M07	46,91	20,45	13,18	34,92	5M02	11,49	13,88	17,03	19,86
1M08	0,00	0,00	7,61	7,81	5M04	5,17	7,31	10,62	12,68
1M09	17,08	36,23	46,16	54,00	5M06	0,00	0,00	0,00	0,00
1M10	2,07	8,43	2,43	6,42	5M08	2,78	10,69	16,49	18,46
1M11	42,11	42,35	43,37	43,47	5M10	10,56	15,01	20,34	24,33
1M12	5,38	0,00	0,00	0,80	5M12	0,49	4,76	10,55	15,15
1M13	0,00	0,00	0,00	21,90	5M14	14,18	14,25	17,21	20,74
1M14	11,90	9,71	16,42	19,88	5M16	22,31	26,92	25,19	24,13
1M15	14,57	16,48	17,70	19,26	5M18	6,30	12,89	15,11	9,83
1M16	13,64	13,91	15,80	16,20	5M20	10,91	14,69	17,91	21,39
1M17	0,00	0,00	0,00	0,00	8M05	0,59	1,58	8,23	12,24
1M18	15,45	13,34	11,87	12,48	8M07	0,00	0,00	0,00	0,00
1M19	11,50	14,05	14,99	14,16	8M09	5,69	18,64	17,83	18,51
1M20	0,00	0,00	2,23	9,90	8M11	2,75	31,56	19,53	13,66
2M01	0,98	4,21	6,90	5,30	8M13	11,17	23,55	34,75	44,10
2M04	17,33	19,22	19,17	19,49	8M15	0,00	1,60	2,67	3,04
2M06	0,00	0,84	5,40	11,72	8M17	0,97	0,85	0,33	0,00
2M07	0,00	6,11	11,90	19,18	9M05	5,23	9,75	11,18	12,53
2M08	6,67	16,08	30,08	33,33	9M07	5,57	12,46	13,39	14,22
2M10	1,65	0,00	0,53	3,74	9M09	3,09	8,57	8,10	8,74
2M12	4,71	15,39	25,46	22,76	9M11	2,13	10,54	13,64	14,79
2M14	0,00	4,68	8,83	11,75	9M13	0,00	7,90	9,18	10,34
2M16	0,00	0,00	0,00	0,00	9M15	0,00	8,24	6,52	7,41
2M18	0,00	1,26	4,64	8,11	9M17	1,98	2,82	0,43	0,00
2M20	0,00	0,00	2,11	5,35	9M19	12,48	18,98	21,77	18,74
3M01	0,00	0,00	0,00	0,00	10M01	1,11	6,81	5,95	7,63
3M03	0,00	10,91	21,55	16,88	10M02	22,48	24,64	30,54	35,88
3M04	15,01	21,15	24,74	27,02	10M04	12,68	17,78	26,33	30,91
3M05	0,13	9,26	16,97	0,00	10M06	2,62	6,91	10,20	13,22
3M06	22,81	30,86	34,81	37,57	10M07	0,00	0,00	0,00	4,64
3M07	8,74	5,31	6,89	10,15	10M08	17,14	20,87	27,84	33,23
3M08	0,00	0,00	0,00	0,00	10M09	0,00	10,09	7,64	7,05
3M09	0,00	3,71	9,22	11,36	10M10	0,00	4,89	19,41	30,45
3M10	3,40	4,28	4,73	4,87	10M12	8,85	11,93	23,32	32,09
3M11	0,00	6,88	15,38	15,93	10M14	0,00	10,31	15,98	19,66
3M12	0,00	0,00	0,00	0,00	10M15	0,00	0,00	0,00	0,00
3M13	0,50	0,77	1,82	3,57	10M16	6,51	12,57	18,35	22,94
3M14	0,00	0,00	0,00	0,00	10M17	0,00	0,00	0,00	0,00
3M15	0,00	0,00	0,00	0,00	10M18	3,36	11,53	20,83	28,41

Tablo 3.3: (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
10M19	0,00	13,19	36,77	46,76	14M01	20,53	25,65	30,96	38,39
10M20	3,17	9,44	16,22	21,64	14M02	4,18	7,12	7,65	10,31
11M01	10,66	17,00	19,25	20,40	14M03	0,00	4,56	8,13	9,90
11M02	12,57	18,84	20,53	22,01	14M04	3,99	5,94	6,59	3,26
11M04	4,76	12,37	16,89	20,12	14M05	0,00	0,00	4,70	3,95
11M05	7,66	16,64	20,43	23,43	14M06	7,47	11,70	13,33	17,97
11M06	0,80	6,17	14,37	19,84	14M08	0,00	0,00	0,00	0,00
11M07	0,00	0,00	4,82	6,78	14M09	0,00	2,43	5,69	7,70
11M09	0,00	4,60	7,68	9,52	14M10	9,89	10,68	10,31	12,31
11M10	0,62	6,44	10,94	15,30	14M11	0,00	6,16	9,81	11,77
11M11	0,00	0,00	0,00	0,00	14M12	0,00	0,00	0,00	0,00
11M12	20,58	27,86	34,09	36,61	14M13	2,31	6,91	4,81	2,96
11M13	3,54	7,68	14,02	16,85	14M15	1,55	0,00	13,55	10,83
11M14	11,11	21,47	28,03	32,78	14M17	0,00	0,00	0,00	0,00
11M15	0,00	1,81	10,20	17,99	14M18	7,27	6,87	6,32	4,72
11M16	10,70	20,12	28,80	34,32	14M19	4,72	2,92	3,37	2,32
11M18	4,81	10,66	15,23	19,43	14M20	0,00	0,00	0,00	0,00
11M19	0,00	0,00	0,00	0,00	15M01	5,71	0,99	0,00	0,00
11M20	22,14	41,30	44,65	48,55	15M02	25,24	36,38	31,81	34,86
12M01	0,00	1,77	16,56	19,60	15M03	0,00	0,00	14,94	34,52
12M03	9,10	5,12	4,73	2,94	15M04	0,00	6,27	0,00	0,00
12M04	0,00	0,00	0,00	0,00	15M05	0,00	0,00	20,19	29,13
12M05	2,32	7,62	10,96	14,60	15M06	0,00	2,11	6,12	18,39
12M06	0,00	0,00	0,00	0,00	15M08	0,00	0,00	0,00	3,40
12M07	12,81	20,18	21,36	22,10	15M09	3,70	12,57	0,29	11,67
12M08	13,50	11,74	11,59	9,40	15M10	0,99	10,54	0,00	0,00
12M09	0,00	0,00	0,00	0,00	15M12	10,83	11,25	10,20	11,80
12M11	5,60	4,87	6,36	4,53	15M14	10,21	14,63	21,56	25,36
12M13	6,84	13,59	18,73	20,35	15M15	5,35	9,02	19,37	22,44
12M15	9,23	32,52	50,91	65,83	15M16	4,35	11,27	18,73	24,12
12M17	0,75	9,26	11,27	13,93	15M17	8,44	20,30	28,22	30,04
12M18	17,33	11,93	11,12	11,85	15M18	0,00	5,29	10,68	19,60
12M20	0,00	0,00	0,00	4,12	15M20	0,00	0,00	0,00	0,00
13M02	1,97	4,09	0,00	6,83	16M02	14,44	14,46	15,14	15,79
13M06	5,11	11,10	8,94	7,13	16M04	12,41	18,65	5,90	2,61
13M10	14,59	27,67	34,03	41,46	16M06	0,00	0,00	6,08	12,59
13M12	5,81	14,03	18,84	26,06	16M08	7,32	10,84	8,48	11,64
13M13	2,15	13,79	17,42	19,98	16M10	1,84	9,05	27,63	33,96
13M14	0,00	0,00	0,00	19,48	16M11	3,95	10,11	7,39	7,23
13M15	0,00	15,98	15,30	16,54	16M12	13,61	17,72	16,00	17,92
13M16	7,31	14,08	20,26	23,69	16M14	0,00	4,62	10,34	11,94
13M16	9,64	15,21	22,39	26,33	16M16	8,10	12,14	14,72	16,58
13M18	13,57	23,47	29,39	30,53	16M18	6,74	8,23	2,24	13,60
13M19	5,51	21,30	24,61	26,95	16M20	5,63	11,25	11,23	12,98
13M20	8,04	15,68	20,76	31,18	17M04	0,00	0,00	9,75	29,35

Tablo 3.3 (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
17M06	0,00	0,00	0,00	6,99	21M20	0,00	6,52	9,21	9,64
17M08	0,47	4,65	12,94	30,62	22M01	11,17	17,17	22,40	23,95
17M10	11,59	13,03	16,69	18,29	22M02	0,00	8,36	19,90	24,35
17M12	8,42	13,08	17,65	22,44	22M03	26,57	22,11	29,65	17,70
17M16	0,62	2,41	17,95	20,25	22M04	0,00	12,58	21,57	16,32
17M18	21,47	23,04	25,52	28,34	22M05	6,52	10,83	9,39	7,97
17M20	19,82	25,05	37,84	44,30	22M06	0,00	2,98	10,05	16,29
18M01	0,00	0,00	0,00	0,00	22M07	2,71	7,63	10,64	11,34
18M05	0,00	0,00	0,00	0,00	22M08	1,98	10,69	13,86	14,08
18M07	0,00	0,00	0,00	0,00	24M07	14,15	25,34	31,50	34,41
19M02	30,05	32,07	35,66	40,07	22M10	2,11	14,29	23,02	25,26
19M04	53,35	57,79	59,49	60,07	22M11	6,62	14,55	15,12	13,93
19M06	26,79	24,79	27,12	36,35	22M14	4,23	2,68	0,00	0,00
19M08	1,36	0,00	20,49	22,47	22M15	0,04	3,63	5,00	3,08
19M10	6,20	13,30	20,57	25,31	22M16	0,00	0,00	0,00	0,00
19M12	1,57	2,80	7,13	9,59	22M17	1,58	12,34	15,76	17,87
19M14	0,00	0,00	0,00	0,00	22M18	5,17	11,82	14,61	14,82
19M16	10,99	9,46	15,49	19,49	22M19	12,84	18,53	18,90	17,60
19M18	7,82	3,93	5,09	6,50	22M20	4,02	7,90	11,28	12,96
19M19	8,94	6,42	1,62	0,00	23M02	4,28	6,70	4,41	5,27
19M20	17,52	20,82	20,98	21,30	23M04	1,09	4,96	6,91	8,56
20M02	2,97	10,28	16,00	18,35	23M06	0,00	1,78	5,88	10,20
20M04	1,65	21,85	24,92	27,96	23M08	3,68	7,09	13,17	19,94
21M01	0,00	8,87	10,43	5,38	23M10	12,11	14,15	15,11	16,02
21M02	1,68	8,11	13,24	18,31	23M12	9,97	2,71	3,66	3,14
21M04	0,00	0,00	0,00	0,00	23M14	0,00	0,00	6,12	14,47
21M05	14,79	22,22	21,88	22,70	23M16	3,45	8,46	12,96	15,04
21M06	0,00	0,00	0,00	0,00	23M18	0,00	5,74	15,95	22,65
21M07	0,77	9,98	12,54	13,92	23M20	0,00	0,00	0,00	0,00
21M08	0,00	0,00	0,00	0,00	24M01	0,00	5,51	8,36	8,94
21M09	10,36	10,93	8,11	3,11	24M02	31,75	35,09	38,10	39,45
21M10	12,59	16,01	20,01	25,48	24M03	0,25	7,02	9,78	10,39
21M11	0,00	12,77	15,63	16,97	24M04	0,00	10,14	15,96	21,37
21M12	0,00	0,00	1,43	4,99	24M05	30,75	46,13	50,79	53,71
21M13	0,00	4,21	3,07	1,51	24M06	2,90	11,06	19,41	29,03
21M14	0,00	5,09	10,90	15,36	22M09	0,52	5,30	12,89	13,97
21M15	6,54	14,42	17,31	18,77	24M08	3,97	8,48	19,75	30,09
21M16	2,63	11,73	18,22	21,68	24M09	0,23	9,09	12,31	15,66
21M17	0,00	0,00	0,05	2,61	24M10	0,00	11,17	15,00	19,87
21M18	0,00	0,00	6,90	14,09	24M11	3,09	8,54	12,60	16,11
21M19	0,00	8,85	10,31	12,82	24M12	19,10	27,36	35,26	38,27

Tablo 3.3 (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
24M13	0,00	0,00	2,76	5,45	30M11	8,77	10,04	10,78	7,66
24M14	7,28	17,94	27,62	34,91	30M13	5,58	11,16	13,20	13,23
24M15	12,63	15,03	17,39	19,98	31M01	0,25	5,79	6,12	5,73
24M16	0,00	0,00	0,00	5,00	31M03	2,28	7,78	9,38	8,21
24M17	8,93	13,09	15,84	18,51	31M05	0,00	6,12	8,18	6,95
24M18	0,00	1,79	5,80	3,72	31M07	1,30	7,36	8,70	6,87
24M19	7,09	15,97	21,03	24,40	31M09	0,00	0,00	3,88	5,79
24M20	0,00	10,28	20,79	27,40	31M11	0,00	4,65	9,50	9,45
30M01	12,69	20,99	25,17	25,33	31M13	0,00	2,75	4,54	3,92
30M03	4,09	10,65	14,39	15,75	31M15	14,18	25,28	23,01	18,55
30M05	8,16	8,68	9,79	10,74	31M17	7,93	17,11	20,59	23,24
30M07	0,00	0,00	3,18	3,20	31M19	0,00	1,42	2,93	3,63
30M09	0,00	8,41	10,66	11,64					

Tablo 3.4: Çiğ süttten izole edilen termofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri

<div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; background-color: #c6e0b4; padding: 2px;"> %0 %50 %100 </div>									
İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
2T02	0,00	6,98	8,04	10,68	5T20	0,00	0,00	0,00	0,00
2T04	0,00	1,11	3,39	6,47	8T03	14,08	25,10	29,98	38,49
3T01	8,01	14,56	17,75	17,63	8T04	1,67	3,51	4,12	4,39
3T02	0,00	0,00	3,96	5,50	8T05	19,89	28,37	34,43	45,41
3T03	11,29	19,71	25,70	30,64	8T06	0,00	0,00	0,58	2,05
3T04	7,64	13,75	16,28	18,98	8T08	0,00	0,00	0,00	0,00
3T05	3,58	12,79	20,42	28,95	8T09	0,00	0,85	1,09	6,59
3T06	9,04	16,18	20,06	22,12	8T10	0,00	0,00	0,58	2,05
3T07	6,07	15,37	25,11	31,22	8T12	0,00	0,60	1,46	2,15
3T08	6,97	3,61	0,00	0,31	8T14	0,00	5,11	7,32	8,63
3T09	3,57	12,18	26,27	31,51	8T16	0,00	0,00	0,00	0,00
3T10	0,41	6,55	7,65	9,48	8T17	16,31	19,47	22,81	25,01
3T11	0,00	37,86	48,62	16,63	8T18	10,30	9,70	18,23	25,97
3T12	1,73	3,10	8,63	12,11	8T19	4,10	14,13	21,98	27,76
3T13	0,00	12,26	24,89	34,49	8T20	0,00	1,56	2,95	3,37
3T14	0,00	0,00	0,00	0,43	9T02	6,05	11,85	15,74	17,38
3T15	2,11	9,27	17,16	22,96	9T04	0,00	0,00	0,00	0,00
3T16	10,76	14,91	14,75	16,76	9T06	0,57	1,45	2,36	2,73
3T17	16,09	27,68	38,80	48,54	9T07	3,93	9,09	10,79	11,80
3T20	0,00	6,77	11,50	9,13	9T08	0,00	0,00	0,00	0,00
4T02	12,31	19,94	26,50	30,66	9T09	0,43	1,01	1,10	2,34
4T04	0,00	0,00	0,00	0,00	9T10	0,00	0,00	0,00	0,00
4T06	0,00	0,00	0,00	0,00	9T11	0,00	0,00	0,00	0,00
4T08	0,00	0,00	0,00	0,00	9T13	0,74	6,74	10,35	11,46
4T10	0,00	15,47	18,00	15,14	9T14	0,00	0,00	0,00	0,00
4T12	20,36	24,93	27,53	32,16	9T15	0,00	0,00	7,76	5,72
4T14	0,00	0,00	0,00	0,00	9T16	0,00	0,00	0,00	0,00
4T16	0,00	0,00	0,00	5,02	9T17	0,00	4,42	8,11	8,10
4T18	12,44	19,73	24,07	29,29	9T19	5,69	7,44	5,63	4,64
4T20	17,84	30,02	36,59	37,61	10T02	0,46	7,02	10,52	13,07
5T02	0,00	3,11	8,01	10,28	10T04	1,23	12,75	19,12	23,48
5T04	0,00	0,00	0,00	0,00	10T05	0,00	21,05	23,16	23,81
5T06	0,00	4,27	5,31	5,86	10T06	0,00	15,20	8,16	28,83
5T08	14,84	36,58	45,41	48,85	10T07	0,00	32,58	35,46	35,46
5T10	5,59	9,03	11,49	12,84	10T08	9,76	14,48	16,67	15,49
5T12	2,29	3,67	0,59	0,34	10T09	0,00	8,90	11,84	11,33
5T14	1,53	2,15	5,34	14,83	10T11	1,95	15,01	17,65	13,23
5T16	1,95	6,99	4,83	5,43	10T12	3,77	15,56	20,63	24,57
5T18	0,00	6,83	10,90	14,34	10T13	0,00	0,00	0,00	0,00
					10T14	8,81	25,73	29,57	31,91

Tablo 3.4 (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
10T15	3,61	10,16	10,43	10,63	13T14	0,00	11,72	22,71	22,61
10T16	9,59	11,53	12,89	14,23	13T16	11,69	21,33	20,97	24,75
10T17	8,95	19,93	21,45	24,54	13T18	10,10	18,77	24,28	33,73
10T18	18,68	21,83	24,17	26,94	13T20	6,23	12,91	11,95	11,89
10T19	11,53	15,40	17,43	19,76	14T02	0,00	0,00	0,00	0,00
10T20	0,00	0,00	0,00	4,91	14T04	0,00	0,00	0,00	0,00
11T01	11,93	14,43	15,75	17,50	14T05	5,56	7,68	6,56	5,76
11T02	2,18	9,74	16,07	21,94	14T06	0,00	0,00	0,00	0,00
11T04	15,15	16,44	12,53	13,58	14T07	0,00	0,00	0,00	0,00
11T05	29,33	25,36	25,81	25,89	14T08	2,81	3,72	1,22	1,17
11T06	16,87	18,59	21,24	23,37	14T09	6,29	11,58	11,04	10,04
11T07	0,00	1,30	19,92	34,82	14T10	0,00	0,00	0,00	0,00
11T08	2,92	9,94	13,77	17,27	14T11	0,00	3,85	0,00	0,00
11T10	9,91	19,84	25,65	28,71	14T12	0,00	0,00	0,00	0,00
11T11	24,41	24,99	27,81	28,90	14T13	0,00	4,03	12,19	15,79
11T12	10,12	18,73	23,82	26,94	14T14	0,00	0,00	0,00	0,00
11T13	15,60	24,72	30,94	40,29	14T18	0,00	0,00	0,00	0,00
11T14	0,00	4,87	10,82	14,24	14T20	0,00	0,00	0,00	0,00
11T15	7,13	17,04	22,64	26,31	15T01	0,00	0,00	0,00	0,00
11T16	11,14	15,85	19,54	21,60	15T03	0,00	0,00	0,00	0,00
11T17	19,12	21,20	24,51	25,33	15T05	0,00	0,00	0,00	0,00
11T18	1,09	9,41	14,76	18,77	15T07	0,00	0,00	0,00	0,00
11T20	6,98	8,69	14,36	18,09	15T09	0,00	0,00	0,00	0,00
12T02	5,92	9,33	11,86	13,67	15T11	0,00	0,00	0,00	0,00
12T06	12,52	17,66	20,79	21,67	15T13	3,68	3,06	2,80	3,62
12T08	24,64	30,92	35,77	41,28	15T15	0,00	0,00	0,00	0,00
12T10	10,43	11,57	14,86	14,70	15T17	0,00	0,00	0,00	0,00
12T12	9,08	21,08	27,97	36,56	15T19	0,00	0,00	0,00	0,00
12T14	8,91	11,08	15,11	19,01	17T01	6,02	3,44	3,99	6,02
12T16	0,00	1,21	2,21	2,86	17T13	0,00	0,00	0,00	0,00
12T18	0,00	0,51	0,19	1,70	17T15	6,68	9,13	11,83	12,66
12T20	12,31	22,04	28,66	35,39	17T17	16,10	32,90	43,33	49,54
13T02	9,93	17,87	22,31	21,15	17T19	2,18	17,83	24,99	30,25
13T04	8,56	18,98	25,68	25,84	18T13	0,77	1,00	2,99	5,20
13T06	0,00	12,53	21,19	23,69	18T15	0,57	0,52	2,40	4,59
13T08	6,52	9,32	9,69	10,01	18T17	0,86	3,65	5,20	6,49
13T10	13,91	22,94	21,79	20,76	18T19	7,62	10,33	11,76	11,25
13T12	0,00	14,29	17,62	20,82	21T01	1,97	0,00	0,00	0,00

Tablo 3.4 (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
21T03	10,39	3,68	2,03	1,54	30T17	7,46	13,78	15,81	18,20
21T07	16,29	22,58	23,24	24,20	30T18	0,00	0,00	0,00	0,00
21T09	14,17	16,40	18,97	20,91	30T19	2,80	10,21	10,19	11,55
21T11	15,01	16,62	15,16	13,66	31T01	5,23	2,29	0,04	0,00
21T13	6,56	1,23	2,56	2,53	31T03	0,00	4,03	4,88	5,28
21T15	7,24	11,53	14,46	21,24	31T05	0,00	0,00	3,58	3,37
21T17	12,42	15,04	18,56	21,49	31T09	14,94	22,17	24,19	25,41
21T19	0,00	0,00	0,00	0,00	31T11	9,93	14,38	16,92	18,94
22T01	19,57	26,18	26,32	24,39	31T13	11,98	21,89	25,96	27,21
22T03	13,93	21,10	22,45	18,28	31T15	17,92	30,35	34,64	36,97
22T05	12,61	19,79	18,09	13,52	31T17	9,38	19,15	18,85	18,60
22T07	5,80	12,25	12,16	8,48	32T01	7,81	15,30	19,12	22,29
22T11	6,36	12,50	10,44	0,00	32T02	2,59	0,00	0,00	0,00
22T11	6,36	12,50	10,44	0,00	32T03	0,00	0,00	2,61	9,00
22T13	1,66	6,04	3,34	0,00	32T04	0,00	0,00	0,00	1,88
22T15	6,22	9,77	12,04	9,82	32T05	10,40	20,53	22,16	22,91
22T17	15,72	23,94	23,71	22,32	32T09	0,00	7,06	12,40	11,86
22T19	4,98	9,62	7,68	0,00	32T10	0,32	0,00	0,00	0,00
27T07	9,95	7,30	5,86	4,39	32T11	0,00	6,86	9,39	8,88
27T11	0,00	1,14	3,36	7,64	32T13	0,00	2,27	6,23	8,85
27T13	16,30	19,13	18,00	17,88	32T14	0,00	0,00	0,00	0,95
27T15	18,11	18,70	19,48	20,30	32T15	7,92	17,79	22,63	24,96
27T17	0,00	0,00	0,00	0,00	32T16	0,00	0,00	0,00	0,48
27T19	7,55	13,38	15,51	16,51	32T17	4,49	9,93	10,03	9,62
30T01	14,27	20,18	20,91	20,89	32T18	0,00	0,00	0,00	0,00
30T02	0,00	0,00	0,00	0,00	32T19	3,43	7,50	6,70	8,23
30T03	3,23	11,19	14,43	14,07	32T20	0,00	0,00	0,00	0,00
30T04	0,00	0,00	0,00	0,00	33T01	0,68	2,24	3,02	0,00
30T05	15,39	22,71	23,27	22,76	33T02	8,94	12,48	20,32	27,66
30T06	0,00	0,00	0,00	0,00	33T03	0,64	3,64	5,82	6,55
30T07	10,78	16,20	17,95	16,66	33T04	1,22	1,66	3,63	6,52
30T08	0,00	0,00	0,00	1,29	33T05	0,35	3,71	6,14	6,06
30T09	9,77	16,38	17,94	16,91	33T06	3,43	0,14	0,85	3,36
30T10	6,30	3,42	2,69	5,64	33T10	0,00	0,00	0,00	0,00
30T11	3,75	14,55	19,40	20,94	34T01	0,00	14,14	21,80	22,07
30T12	6,29	11,19	14,53	17,34	34T03	3,36	7,21	3,07	2,10
30T14	3,33	0,00	0,00	0,00	34T05	1,54	16,88	26,32	24,62
30T15	0,00	0,00	1,20	4,33	34T07	8,96	22,36	21,92	19,39
30T16	4,96	5,89	5,50	6,13	34T09	0,00	0,00	6,99	7,46

Tablo 3.5: Peynirden izole edilen mezofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> %0 %50 %100 </div>									
İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
35M01	0,66	5,35	14,50	18,94	38M10	0,00	0,00	4,76	5,13
35M03	0,00	0,00	0,00	1,94	38M12	2,04	1,11	3,33	4,01
35M05	0,00	6,25	8,18	9,36	38M14	0,00	0,00	0,00	0,00
35M07	7,05	14,45	19,66	22,10	38M16	22,98	16,37	15,70	13,41
35M09	0,00	1,76	0,56	0,56	38M18	0,00	1,85	8,74	13,89
35M13	11,24	10,39	13,33	14,48	38M20	2,96	5,58	9,43	10,76
35M15	0,00	3,66	14,00	16,40	39M01	0,00	0,00	0,00	0,00
35M17	4,66	10,21	12,01	9,89	39M02	0,00	1,35	2,69	2,88
35M19	0,00	5,35	7,86	9,96	39M03	0,00	0,00	0,00	0,00
36M01	0,00	0,00	0,00	0,00	39M04	0,91	4,70	8,59	9,88
36M03	0,00	6,67	12,10	15,91	39M05	4,46	0,00	0,00	5,52
36M05	0,00	0,00	9,71	15,00	39M06	0,00	0,49	3,40	4,17
36M07	0,00	5,19	11,24	14,46	39M07	20,80	24,46	25,17	26,17
36M10	0,00	0,00	0,00	0,00	39M08	0,00	0,22	2,30	3,75
36M12	2,02	13,31	19,07	17,50	39M09	3,68	6,87	9,09	12,12
35M14	21,11	29,60	33,27	36,79	39M10	0,00	0,00	2,68	4,09
36M16	11,15	8,50	13,69	17,31	39M12	0,00	0,00	0,00	0,00
36M18	3,06	6,30	10,24	13,01	39M14	0,00	3,66	3,67	6,68
36M20	0,00	0,00	0,00	0,00	39M16	0,00	0,00	1,99	7,13
37M01	6,94	14,03	17,29	17,93	39M18	0,00	0,00	0,23	0,06
37M02	0,00	6,80	11,47	14,05	39M20	0,00	0,00	0,00	1,60
37M03	0,00	0,00	0,00	0,64	40M01	2,46	8,63	11,60	15,22
37M04	4,21	10,46	14,42	16,48	40M02	5,76	16,25	19,41	19,03
37M05	9,55	12,72	12,71	12,45	40M03	0,33	2,93	2,12	3,80
37M06	5,22	14,94	19,06	21,37	40M04	0,00	0,00	0,00	1,50
37M07	1,31	5,54	7,86	8,83	40M05	0,00	2,19	6,21	10,20
37M08	1,05	8,39	12,12	13,81	40M06	0,00	0,00	3,48	9,12
37M09	12,96	11,02	13,62	14,88	40M07	0,00	0,00	0,00	1,82
37M10	3,53	0,00	0,00	2,59	40M08	0,00	3,69	3,17	3,75
37M12	14,05	14,66	15,40	16,02	40M09	0,00	5,01	13,04	20,09
37M14	6,15	11,62	14,79	16,86	40M10	3,41	5,85	0,00	0,00
37M16	0,53	2,59	6,36	9,20	40M11	0,00	0,51	0,64	2,16
37M18	6,01	11,75	13,47	15,30	40M12	0,00	0,00	0,00	0,05
37M20	0,00	0,00	0,00	0,00	40M13	0,00	0,00	0,00	0,00
38M02	3,77	4,56	4,41	4,14	40M14	17,38	6,68	6,52	9,40
38M04	4,65	5,71	7,50	8,84	40M15	5,91	10,38	5,59	8,94
38M06	1,66	6,09	8,62	9,45	40M16	9,63	7,06	12,50	16,87
38M08	1,36	4,09	6,06	5,64					

Tablo 3.5 (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
40M17	0,00	0,00	0,18	0,73	43M07	0,00	0,00	9,51	11,21
40M18	2,72	8,17	4,69	6,27	43M08	0,00	11,15	16,73	20,82
40M19	0,57	9,94	15,33	18,17	43M09	0,00	0,00	3,77	4,85
40M20	11,72	14,63	15,28	19,04	43M10	2,40	4,94	6,03	8,11
41M01	7,85	15,70	20,35	23,11	43M11	2,17	3,96	4,16	4,99
41M02	0,00	0,00	4,61	8,79	43M13	0,00	0,00	0,00	0,00
41M03	5,91	13,61	15,10	16,22	43M15	0,00	0,00	0,00	0,00
41M04	0,00	7,76	13,95	19,59	43M17	0,00	0,00	0,00	0,00
41M05	5,42	10,53	13,07	14,68	43M19	0,00	0,00	0,00	0,00
41M07	8,03	16,02	17,31	17,74	44M01	16,96	19,62	21,52	23,00
41M09	2,88	11,89	17,04	19,87	44M02	4,10	4,15	6,13	6,23
41M11	11,73	18,17	19,61	20,83	44M03	54,68	60,49	59,75	60,40
41M13	7,51	14,44	17,95	19,48	44M04	0,00	0,64	1,69	1,49
41M15	0,00	0,17	2,14	3,57	44M05	0,00	0,00	0,00	0,06
41M17	4,16	10,88	12,77	13,80	44M06	0,00	0,00	0,25	0,84
41M19	9,74	18,05	18,84	18,36	44M07	0,00	0,00	0,00	0,00
42M01	11,81	18,04	21,97	23,18	44M08	3,94	0,00	0,00	0,00
42M02	4,64	13,79	16,87	18,56	44M09	0,00	0,00	0,41	0,96
42M03	0,00	0,00	0,00	0,00	44M10	0,00	3,48	10,49	12,67
42M04	0,00	0,00	0,00	0,00	44M12	0,00	0,00	0,00	0,00
42M05	0,00	0,00	0,00	0,00	44M14	9,29	0,00	0,00	0,00
42M06	0,11	2,68	5,82	7,19	44M16	15,26	17,13	15,53	13,00
42M07	30,91	36,06	38,41	38,87	44M18	3,70	5,85	7,88	8,15
42M08	0,00	0,00	0,00	0,00	44M20	0,00	0,00	0,00	0,00
42M09	0,00	0,00	0,00	0,00	45M01	1,73	6,64	9,49	11,20
42M10	0,00	0,00	0,00	0,00	45M02	2,41	6,58	10,88	14,98
42M11	23,88	33,03	35,97	36,62	45M03	0,00	0,00	0,00	0,00
42M12	18,45	12,04	8,11	5,94	45M04	8,81	11,81	16,40	18,90
42M13	27,25	35,02	38,50	39,50	45M05	0,00	0,00	0,00	0,00
42M14	5,06	9,22	9,15	8,61	45M06	0,00	0,00	0,00	1,11
42M15	0,00	26,26	32,81	35,22	45M07	2,20	0,00	0,00	0,00
42M16	0,00	0,00	0,00	0,91	45M08	0,00	0,00	0,00	0,54
42M17	0,00	0,00	0,00	0,00	45M09	5,62	11,09	15,44	25,07
42M18	0,04	4,04	6,05	7,35	45M10	0,00	3,31	7,90	11,25
42M19	22,84	28,86	30,02	30,64	45M11	0,00	0,00	0,00	0,00
42M20	15,94	18,95	21,30	22,80	45M12	0,00	0,00	0,00	0,65
43M01	0,00	0,43	1,34	2,08	45M13	0,94	3,02	5,95	7,29
43M02	7,58	4,39	5,32	5,80	45M14	3,24	0,00	2,82	9,73
43M03	0,00	0,00	0,83	0,79	45M15	6,65	12,41	15,27	21,34
43M04	5,23	4,34	3,89	5,54	45M16	12,72	14,34	19,43	22,26
43M05	0,00	0,00	0,00	0,00	45M17	0,00	0,00	0,00	0,00
43M06	0,00	0,00	13,05	17,45	45M18	7,83	16,26	20,78	23,53

Tablo 3.5 (Devam)

İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
45M19	0,00	0,00	0,00	0,00	48M01	17,87	20,93	17,85	21,25
45M20	0,00	0,00	0,00	0,00	48M03	15,19	17,31	18,31	20,12
46M01	0,00	0,00	0,00	0,01	48M04	6,70	7,94	6,08	4,16
46M02	0,00	0,00	0,00	0,00	48M05	3,07	0,77	5,22	7,46
46M03	0,00	0,00	0,00	1,09	48M07	12,81	17,70	19,73	20,81
46M04	0,00	0,00	0,00	0,00	48M08	0,00	0,42	4,38	7,41
46M05	0,00	0,00	0,00	0,00	48M09	9,51	14,46	17,03	18,69
46M06	0,00	0,00	0,00	0,00	48M10	0,00	0,00	0,00	3,64
46M07	0,00	0,00	0,00	0,00	48M11	0,00	0,00	0,00	0,00
46M08	0,00	0,00	0,00	0,00	48M13	7,54	3,06	0,00	0,00
46M09	0,00	0,00	0,00	0,00	48M15	20,15	22,91	23,96	25,45
46M10	0,00	0,00	0,00	0,00	48M17	12,27	16,30	17,47	18,79
46M11	8,09	1,96	3,14	14,91	48M19	2,54	1,37	4,59	8,80
46M12	5,38	12,42	0,80	0,00	49M01	27,17	26,26	28,19	29,55
46M13	0,00	0,00	0,00	0,00	49M02	0,00	6,03	11,00	15,09
46M14	18,37	26,26	30,47	33,30	49M03	31,65	31,35	30,44	32,87
46M15	0,00	0,00	0,00	1,93	49M04	0,00	0,00	1,95	3,39
46M16	0,00	0,00	0,00	0,00	49M05	0,00	0,00	0,00	0,00
46M17	0,00	0,00	0,00	0,00	49M06	0,00	0,00	0,00	0,00
46M18	0,00	2,00	2,82	3,91	49M07	28,06	27,05	17,36	19,26
46M19	0,00	0,00	0,00	3,61	49M08	0,00	0,00	0,00	0,00
46M20	0,00	0,00	0,05	1,51	49M09	6,38	14,81	1,06	0,00
47M01	14,25	25,30	30,76	34,69	49M10	2,68	5,18	4,75	2,94
47M02	0,00	0,00	0,00	0,14	49M12	0,00	0,00	0,00	8,37
47M03	13,55	20,34	22,22	23,12	49M14	13,95	11,83	9,67	9,72
47M04	0,00	0,00	0,00	0,00	49M16	0,00	3,98	7,56	8,30
47M05	14,51	21,55	24,12	25,70	49M18	0,00	0,00	2,95	8,45
47M06	0,00	0,00	0,00	0,00	49M20	0,00	0,00	0,00	0,00
47M07	15,11	27,54	33,71	36,88	50M01	17,04	24,81	19,71	29,85
47M08	2,87	5,14	8,60	9,26	50M02	0,00	7,78	10,17	13,45
47M09	12,63	23,91	28,95	32,55	50M03	1,39	5,53	3,20	7,84
47M10	1,63	6,37	7,13	7,59	50M04	3,66	0,00	0,00	0,00
47M11	6,39	16,01	20,64	22,72	50M05	0,00	0,00	0,00	0,00
47M12	0,00	9,63	16,08	26,60	50M06	5,90	5,02	8,61	15,11
47M13	0,00	2,40	3,59	3,98	50M07	0,00	0,00	0,00	18,12
47M14	0,00	3,01	1,11	1,40	50M08	18,38	23,68	31,05	38,83
47M15	15,16	22,02	26,00	26,78	50M09	28,62	39,90	43,78	34,41
47M16	0,00	7,37	7,80	8,38	50M10	11,62	15,20	18,62	11,50
47M17	14,43	23,26	27,19	29,07	50M12	12,88	10,73	0,00	0,00
47M18	0,00	0,69	3,47	3,78	50M16	9,97	12,79	15,29	17,36
47M19	13,90	22,78	27,15	29,43	50M18	0,00	0,00	0,00	0,00
47M20	0,00	0,00	0,00	0,00	50M20	9,73	9,40	4,85	4,39

Tablo 3.6: Peynirden izole edilen termofil LAB izolatların 24 saatlik inkübasyon boyunca % otoliz değerleri



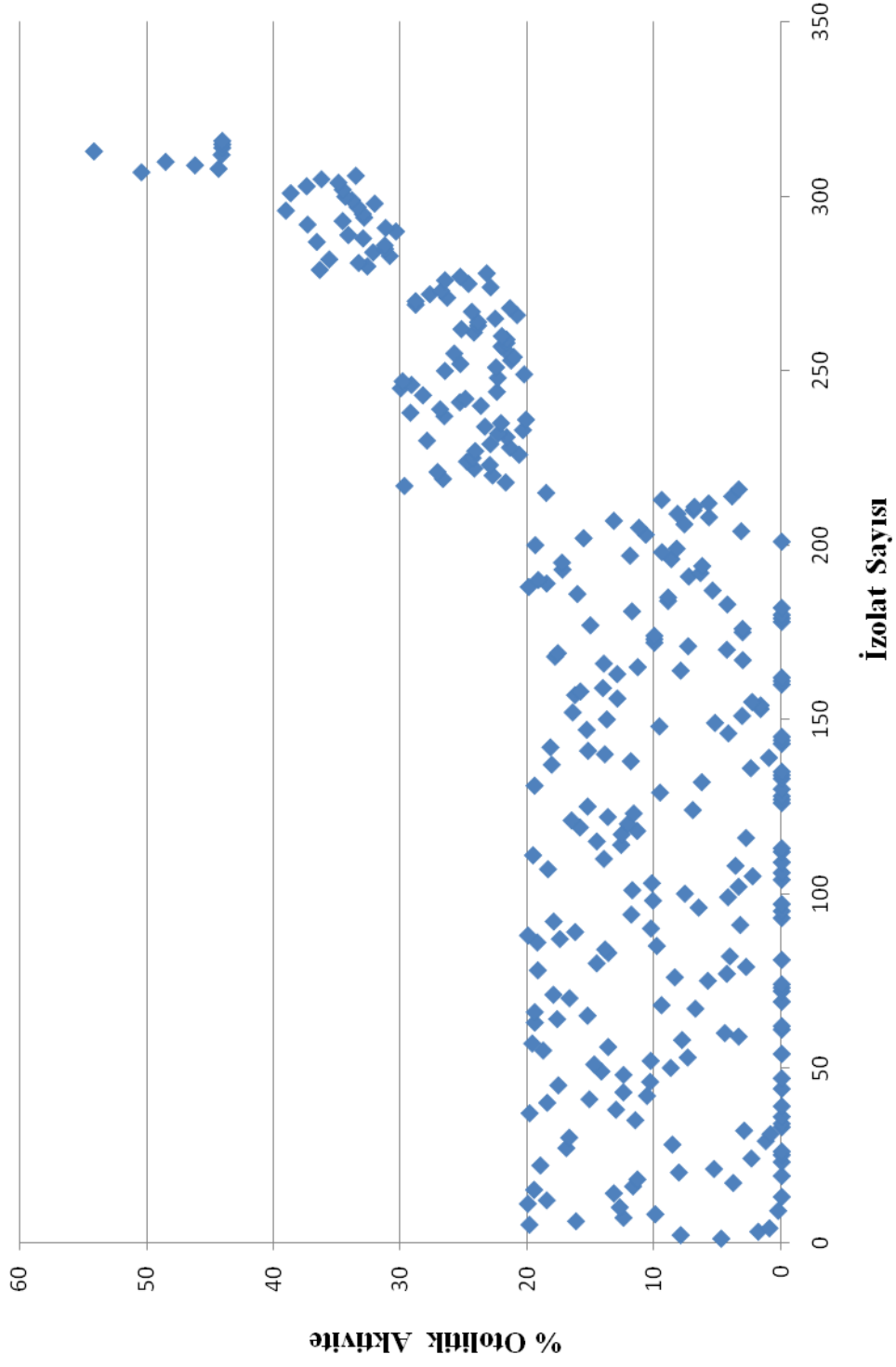
İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
35T01	15,35	22,41	22,54	25,00	41T06	0,00	0,00	0,00	0,00
35T03	17,71	21,28	22,85	24,27	41T07	0,00	0,00	0,00	0,00
35T05	2,04	14,74	16,69	18,92	41T08	0,00	3,89	0,00	0,00
35T07	7,06	5,98	9,95	14,05	41T09	0,00	0,00	0,00	0,00
35T09	0,00	3,88	7,33	8,12	41T10	1,57	9,85	0,00	0,00
37T01	5,30	13,98	17,64	20,29	41T11	13,93	8,99	6,11	11,18
37T09	22,96	23,05	24,48	26,04	41T12	0,00	0,00	3,22	2,69
39T01	8,51	12,14	13,07	15,94	41T14	0,00	0,45	6,75	13,47
39T03	4,19	7,80	9,86	11,75	41T16	2,44	0,69	3,80	7,07
39T06	6,69	7,85	8,93	25,60	41T18	0,00	1,87	5,86	3,33
39T07	2,92	7,02	8,24	12,40	41T20	0,00	0,00	1,98	2,52
39T08	0,00	0,00	0,00	0,00	42T01	2,28	9,54	13,39	17,42
39T10	0,00	0,00	2,28	15,44	42T03	0,00	0,00	0,00	0,00
39T12	0,56	4,17	6,81	25,66	42T05	1,70	12,89	21,17	21,75
39T13	0,00	0,00	0,00	0,00	42T07	0,00	0,00	1,74	2,62
39T14	0,00	1,92	6,24	11,02	42T09	0,00	4,69	10,50	15,01
39T16	0,00	1,17	0,10	11,60	42T11	0,00	0,00	0,00	0,00
39T18	0,96	0,00	0,00	0,00	42T13	0,00	0,00	0,00	0,00
39T02	0,00	2,52	9,46	18,63	42T15	3,34	2,56	0,00	0,00
39T20	0,00	0,00	0,00	0,00	42T17	0,00	0,00	0,00	0,00
39T04	0,00	0,00	0,67	9,99	42T19	0,00	0,52	0,63	0,86
39T08	0,00	8,73	0,00	25,89	44T01	0,00	0,00	0,00	0,00
39T09	0,00	0,00	0,00	0,00	44T02	0,00	0,00	0,00	0,00
40T01	9,48	16,63	14,93	16,15	44T03	0,00	0,00	0,00	0,00
40T02	15,05	17,09	16,30	21,64	44T04	0,00	0,00	0,00	0,22
40T03	0,00	4,37	6,66	11,51	44T05	0,00	0,00	0,00	0,00
40T04	15,63	16,30	16,94	21,39	44T06	0,00	0,00	0,00	0,00
40T05	0,00	0,00	0,00	0,00	44T07	0,00	0,00	0,00	0,00
40T06	0,00	0,00	0,00	0,00	44T08	9,13	6,65	4,04	2,74
40T07	0,00	0,00	0,00	0,36	44T09	0,00	0,00	0,00	0,00
40T10	0,00	0,00	0,00	10,02	44T10	2,81	9,61	16,42	20,31
40T11	8,48	16,21	19,78	22,53	44T11	0,26	0,50	0,00	0,00
40T12	1,43	6,07	3,95	3,26	44T13	0,81	3,40	4,46	4,86
40T14	0,00	0,00	0,00	0,00	44T12	0,00	0,00	0,00	3,98
40T15	0,00	0,00	0,00	0,00	44T14	0,54	0,78	1,83	4,25
40T16	0,00	0,61	1,47	2,06	44T15	0,00	0,00	0,00	0,00
40T17	0,00	0,00	0,00	0,00	44T16	0,00	8,86	14,66	18,27
40T18	0,00	0,00	0,00	0,00	44T17	0,00	0,00	0,29	0,21
40T19	3,49	3,59	3,03	1,66	44T18	0,00	0,51	1,70	10,44
41T01	0,00	0,00	0,00	0,00	44T20	0,00	0,00	0,00	0,00
41T02	0,00	0,00	0,00	0,00	44T19	0,00	0,00	0,00	0,00
41T03	0,64	0,00	0,00	0,00	45T01	2,37	11,67	11,94	13,91
41T04	2,38	6,57	9,74	11,90	45T02	0,00	0,00	7,61	19,93
41T05	6,58	11,25	12,83	14,27					

Tablo 3.6 (Devam)

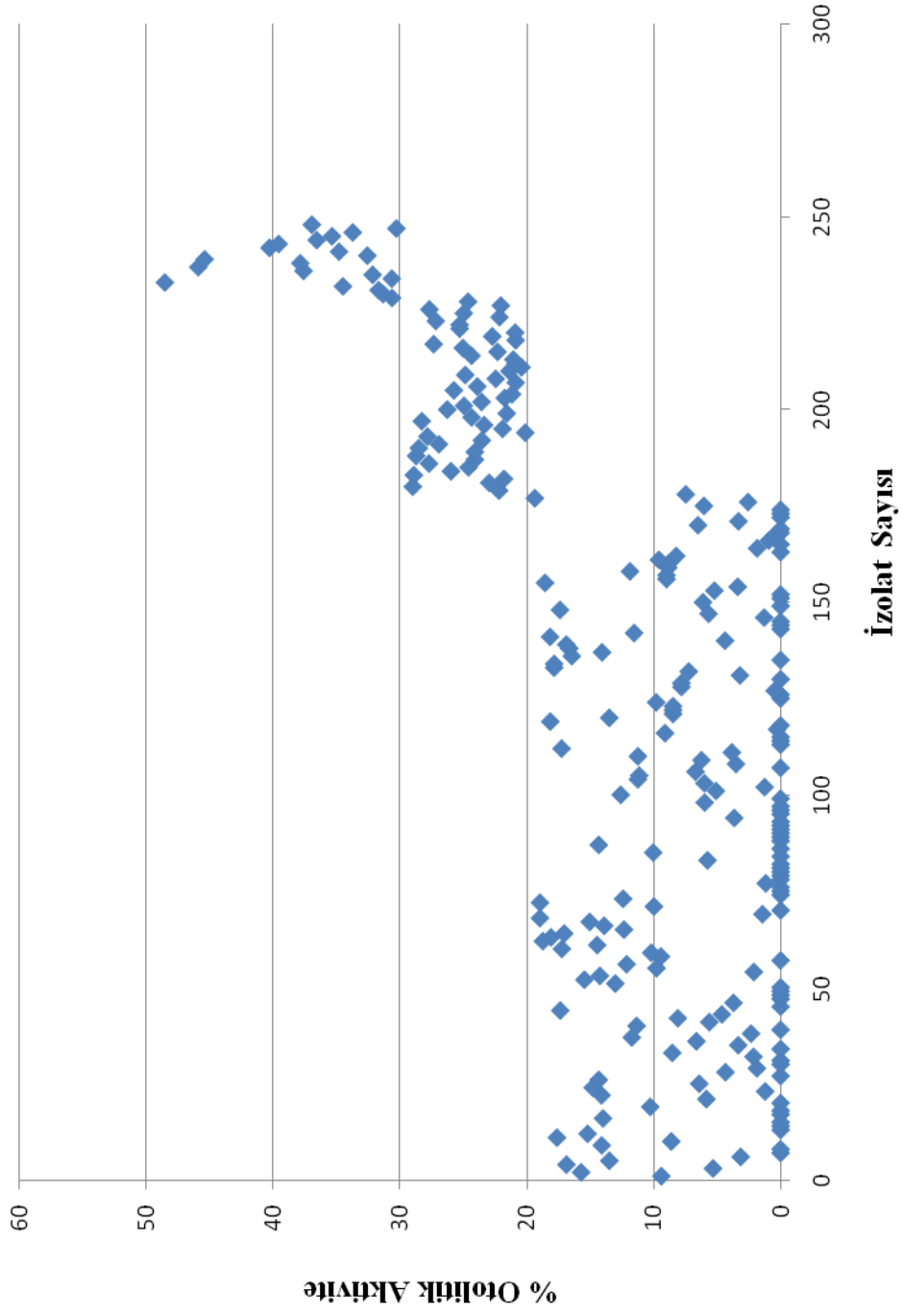
İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
45T03	0,00	17,62	22,17	19,25	47T05	1,83	0,00	0,00	0,00
45T04	0,00	0,00	12,45	25,79	47T06	0,00	0,00	0,00	14,26
45T05	7,60	15,93	23,40	25,53	47T07	0,82	0,00	0,00	0,00
45T06	2,91	8,14	10,34	10,93	47T08	0,00	0,00	0,97	11,02
45T07	1,24	14,17	20,02	25,24	47T09	4,56	5,42	3,16	3,51
45T08	0,00	0,00	0,00	0,00	47T10	0,00	0,00	2,10	19,67
45T09	2,12	6,88	10,82	15,21	47T11	11,74	16,93	17,64	17,07
45T10	0,00	0,00	1,38	7,42	47T12	0,00	0,00	12,85	27,26
45T11	0,00	0,00	0,00	0,00	47T13	0,00	0,00	0,00	3,89
45T12	0,00	2,01	15,56	24,05	47T14	0,00	0,00	8,19	27,02
45T13	1,19	18,53	19,30	18,75	47T15	0,00	6,50	9,47	19,89
45T14	0,00	0,00	0,00	0,00	47T16	0,00	0,00	0,56	23,03
45T15	15,02	21,81	22,08	21,28	47T17	0,00	0,00	0,00	0,00
45T16	2,45	1,85	3,21	4,90	47T18	0,00	0,00	8,88	29,80
45T17	0,00	0,00	0,00	0,00	47T19	0,00	0,00	0,00	0,00
45T18	0,00	0,00	0,00	0,00	48T01	0,00	0,00	0,00	0,00
45T19	0,65	1,89	1,91	5,73	48T03	0,00	0,00	0,00	0,00
45T20	0,00	0,00	16,35	33,64	48T05	0,00	0,00	0,00	0,00
46T01	0,00	0,00	0,00	0,00	48T11	13,82	0,00	0,00	0,00
46T02	0,00	0,35	19,81	34,84	48T13	0,00	0,00	0,00	0,00
46T03	0,00	0,00	0,00	0,00	48T19	4,50	4,09	2,19	2,39
46T04	0,00	0,00	12,62	31,01	49T01	0,00	0,00	0,00	0,00
46T05	0,00	0,00	0,00	0,00	49T02	7,49	20,52	23,13	20,00
46T06	0,00	0,00	22,68	36,76	49T04	0,00	0,00	0,00	5,85
46T07	0,57	0,00	0,00	0,00	49T05	0,00	0,00	23,62	25,18
46T08	0,00	0,00	0,00	0,00	49T06	0,00	0,00	3,80	12,60
46T09	0,00	0,00	0,00	0,00	49T07	6,32	8,34	11,24	14,89
46T10	0,00	0,00	2,59	10,29	49T08	0,00	0,00	0,00	0,00
46T11	0,73	0,00	0,00	0,00	49T09	0,00	0,00	9,72	12,84
46T12	0,00	0,00	0,00	0,00	49T10	0,00	0,00	0,00	0,00
46T13	0,00	0,00	0,00	0,00	49T11	5,63	10,93	13,53	14,91
46T14	0,00	0,00	9,87	29,21	49T12	0,89	6,68	9,21	7,39
46T15	0,00	0,00	0,00	9,75	49T13	0,70	4,80	21,38	26,44
46T16	0,00	0,00	6,23	19,11	49T14	0,00	0,00	0,00	0,00
46T18	0,00	6,24	10,29	12,51	49T15	11,34	9,16	0,00	0,00
46T19	1,97	1,28	3,33	10,93	49T16	8,82	16,63	18,70	17,00
46T20	0,00	0,00	22,50	40,53	49T17	15,05	20,92	22,26	21,70
47T01	0,00	0,00	0,00	0,00	49T18	2,22	10,55	15,82	18,18
47T02	0,00	0,00	11,28	22,40	49T19	0,88	11,41	8,06	8,73
47T03	0,00	0,00	0,00	0,00	49T20	1,33	3,86	3,69	9,84
47T04	0,00	0,00	10,40	23,39					

Tablo 3.6 (Devam)

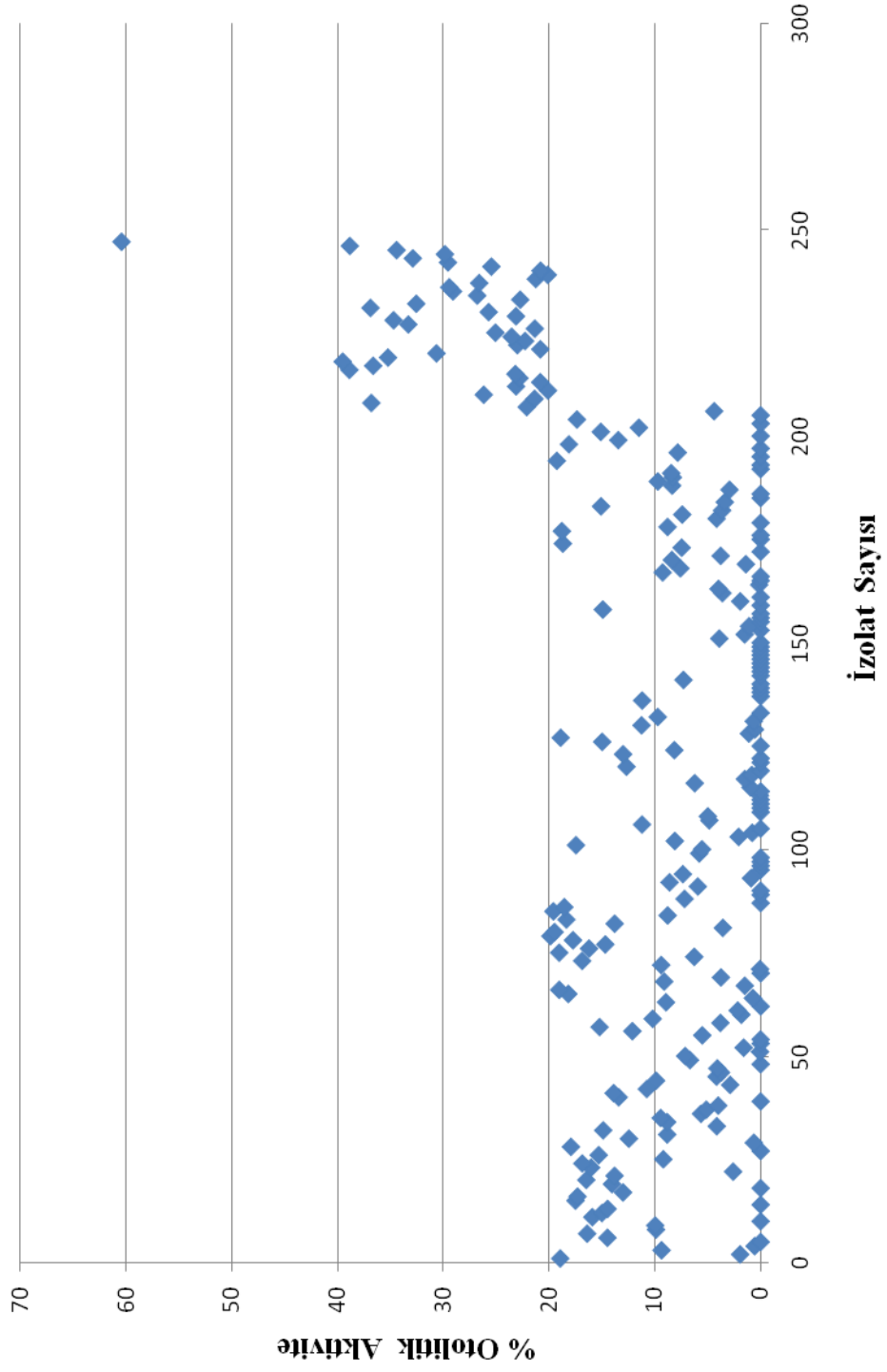
İZOLAT KODU	İNKÜBASYON				İZOLAT KODU	İNKÜBASYON			
	6 sa	12 sa	18 sa	24 sa		6 sa	12 sa	18 sa	24 sa
50T01	0,00	0,00	0,00	0,00	50T09	7,94	36,23	36,98	38,18
50T02	0,02	2,66	2,47	5,02	50T10	0,00	0,00	1,93	10,55
50T03	0,00	0,00	0,00	0,00	50T12	7,13	2,68	0,18	0,92
50T04	0,00	0,00	0,00	0,79	50T14	0,00	0,00	1,28	2,94
50T05	11,19	16,21	16,71	18,41	50T16	0,00	0,00	0,00	0,00
50T06	0,58	0,00	0,00	0,00	50T18	0,00	0,00	0,00	3,85
50T07	5,94	30,47	32,41	33,99	50T20	0,00	0,00	0,00	0,00
50T08	0,00	0,00	0,00	0,00					



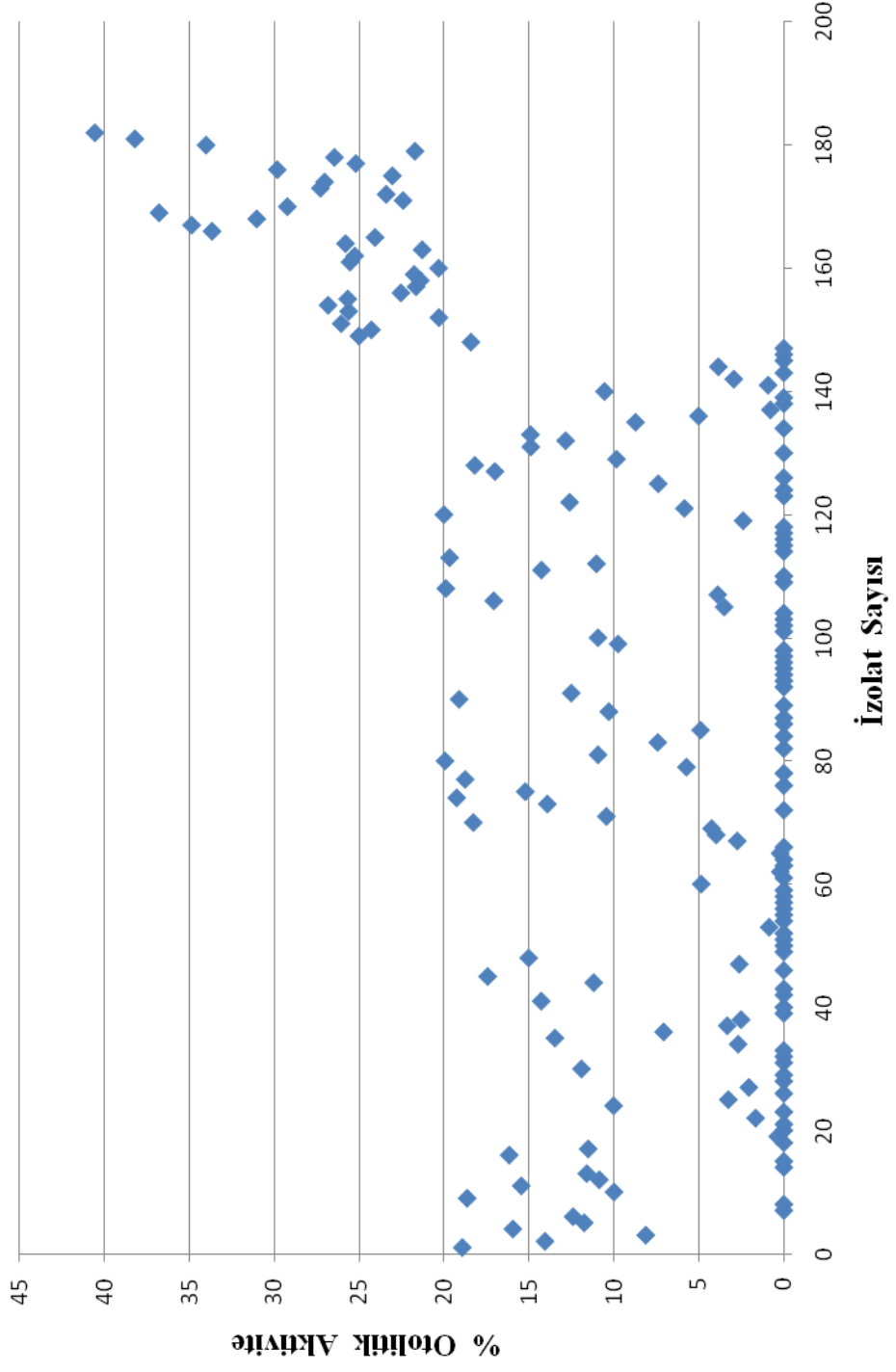
Şekil 3.1: Çiğ sütlerden izole edilen mezofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı



Şekil 3.2: Çiğ sütlerden izole edilen termofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı



Şekil 3.3: Peynirlerden izole edilen mezofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı



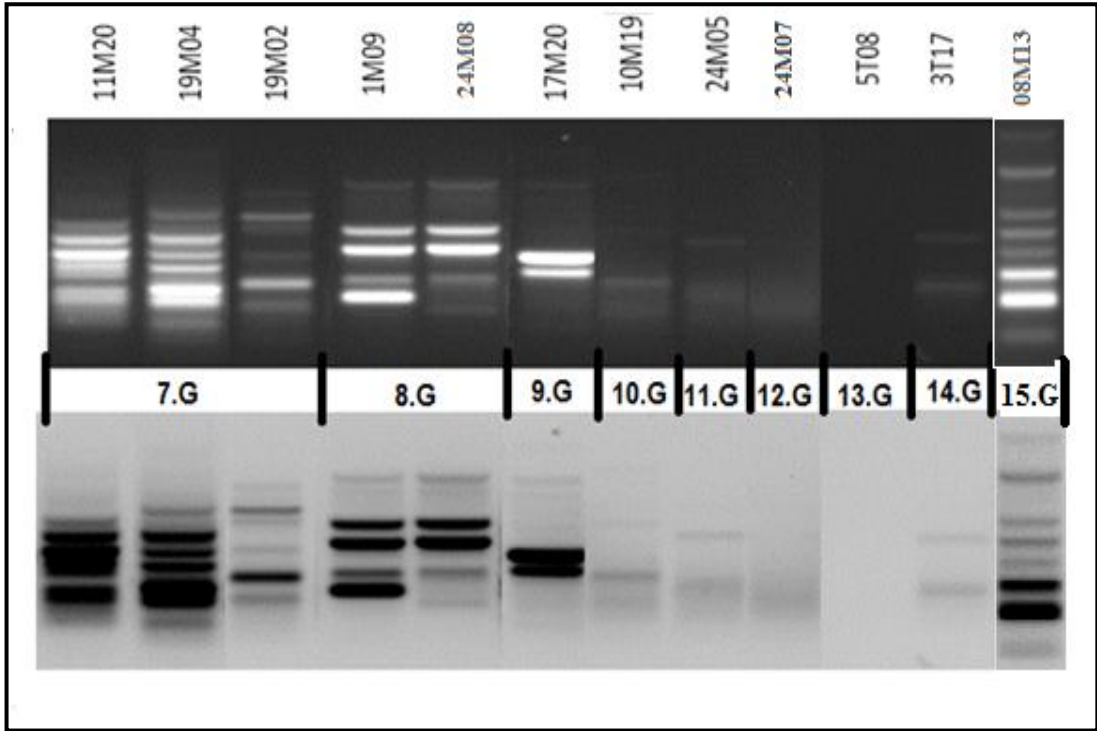
Şekil 3.4: Peynirlerden izole edilen termofil karakterli suşların % otolitik aktivite değerlerinin dağılımı

3.3 Çiğ Süt ve Peynirlerden İzole Edilen ve Yüksek Otolitik Aktiviteye Sahip LAB İzolatlarının Tanımlanması

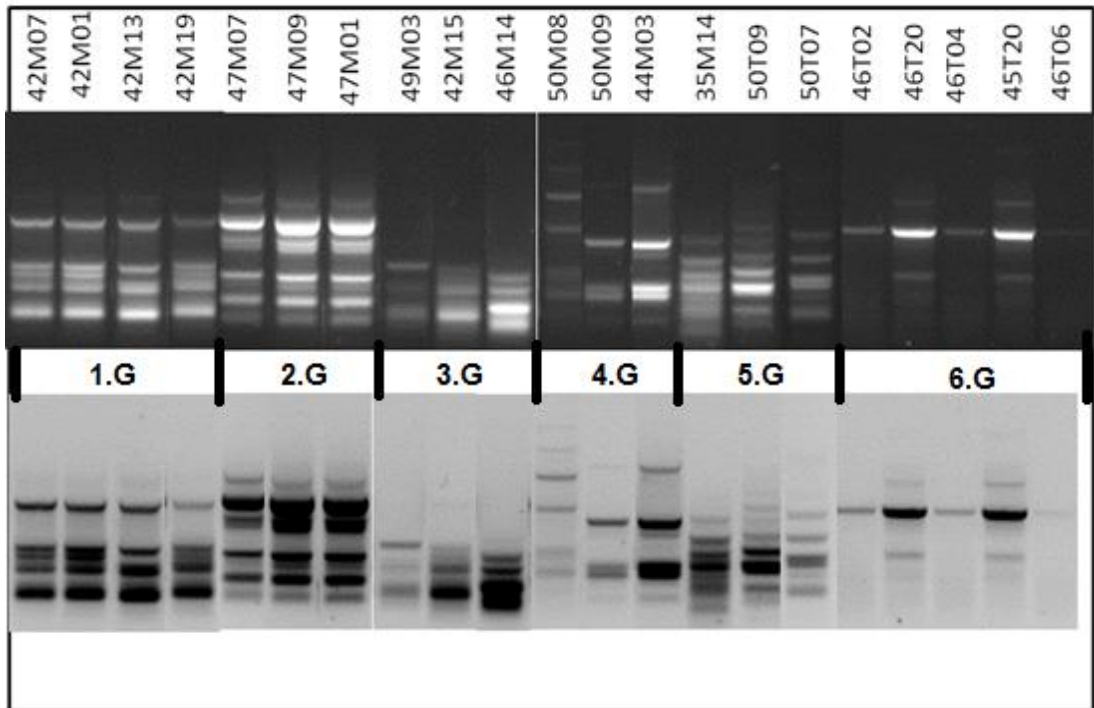
Çalışmanın amacı doğrultusunda izole edilen izolatların arasından yüksek otoliz oranlarına sahip LAB izolatları seçildi ve ardından tür tanısı yapıldı. Çiğ süt ve peynirlerden toplanan mezofil ve termofil LAB izolatların otoliz oranlarının dağılımı sırasıyla Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Buna göre çiğ süt izolatları için % 40'dan; peynir izolatları için % 30'dan daha yüksek otoliz olan toplam 33 adet LAB izolatı seçildi. Buna göre çiğ süttten seçilen mezofil LAB izolatları: 1M09, 08M13, 10M19, 11M20, 17M20, 19M02, 19M04, 24M05, 24M07, 24M08, termofil LAB izolatları ise 3T17, 5T08'dir. Diğer yandan peynirden seçilen mezofil LAB izolatları: 35M14, 42M07, 42M11, 42M13, 42M15, 42M19, 44M03, 46M14 49M03, 47M01, 47M07, 47M09, 50M08, 50M09 termofil LAB izolatları ise 45T20, 46T02, 46T04, 46T06, 46T20, 50T07, 50T09'dur.

3.3.1 Otolitik LAB İzolatlarının (GTG)₅ Parmak-izi ile Sınıflandırılması

Aynı suşların ileri tanımlama analizlerinde tekerrürlü kullanımının engellenmesi ve yüksek çeşitliliğe ulaşmak amacıyla (GTG)₅ parmak izi profili benzerliklerine göre seçilen 33 izolat kendi içerisinde 15 farklı gruba ayrılmış ve farklı bant veren suşlar nihai tanımlanmak üzere seçilmiştir. Buna göre çiğ süt ve peynirlerden izole edilen farklı (GTG)₅ parmak izi profillerine sahip suşların birlikte yürütüldüğü jel görüntüsü Şekil 3.5 ve Şekil 3.6 'da verilmiştir.



Şekil 3.5: Çiğ süttten izole edilen otolitik LAB izolatların (GTG)₅ parmak izi profilleri ve gruplandırılması (G)



Şekil 3.6: Peynirlerden izole edilen otolitik LAB izolatların (GTG)₅ parmak izi profilleri ve gruplandırılması (G)

3.3.2 Otolitik LAB İzolatlarının 16S rDNA Dizi Analizi ile Tür Tanısı

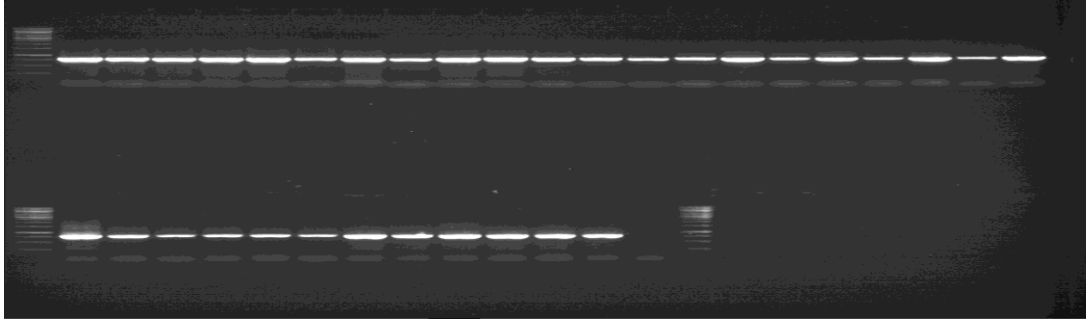
Çalışma kapsamında seçilen 33 LAB izolatın tür seviyesindeki nihai tanısı için 16S rRNA geninin birbiri ile çakışan iki farklı bölgesi çoğaltıldı ve söz konusu genin 1464 bç'lik bölümün dizi analizi ile tanımlama gerçekleştirildi. Böylece rRNA geninin hemen hemen bütününe yakın kısmı değerlendirildi. Bu bölgelerin çoğaltılması amacıyla 16S-27F/16S-780R ve 16S-529F/1491R primer çiftlerinden yararlanıldı. Daha sonra NCBI veri tabanına kayıtlı dizi sonuçları ile karşılaştırılarak, otolitik LAB izolatlarının hangi türle homolog oldukları belirlendi.

Çiğ süt ve peynirlerden izole edilip seçilen 33 adet otolitik LAB izolatın genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan ve 16S rRNA genine ait fragmentler Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Bu şekillerden izlendiği gibi, 16S-27F/16S-780R primer çifti kullanıldığında her bir LAB izolatından 753 bç uzunluğunda bir adet, 16S-529F/1491R primer çifti ile de 962 bç uzunluğunda bir adet DNA fragmentinin çoğaltıldığı agaroz jel üzerinde tespit edildi. Bu sonuç otolitik LAB izolatlarından doğru bölge ve büyüklükte çoğaltma yapıldığına işaret etti. Özellikle DNA fragmentlerin bir adet olması primerlerin özgül olduğunu ve doğru çalıştığını gösterdi. Bu aşamadan sonra LAB izolatlarından alınan DNA fragmentlerinin temizlendikten sonra DNA dizisi çıkarıldı.

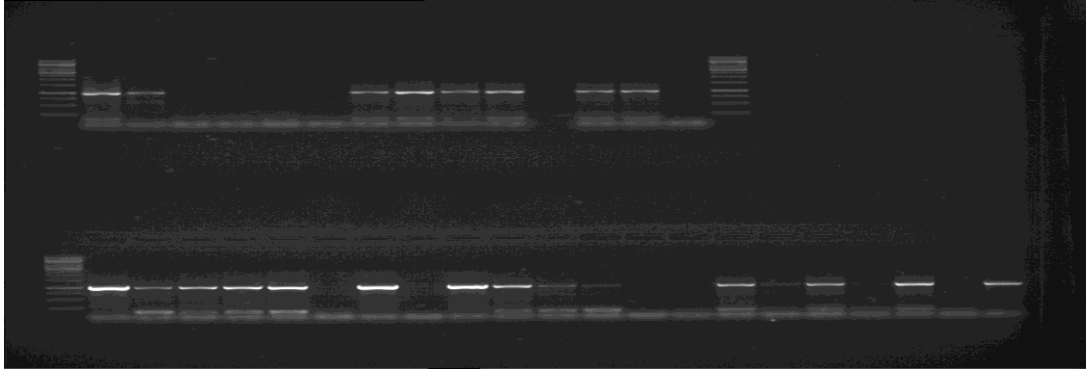
NCBI veri tabanı kullanılarak yapılan karşılaştırma sonucunda otolitik LAB izolatların tür düzeyindeki tanımlanma sonuçları ve yüzdeleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Ayrıca söz konusu fragmentlerin nükleotit dizileri de tezin ekler kısmında sunulmuştur. Buna göre çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen otolitik özellikteki 27 adet LAB izolatlarının; 1 adedi *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (17M20), 2 adedi *Lc. lactis* subsp. *lactis* (1M09, 24M08), 6 adedi *Lb. casei* (42M07, 42M11, 42M13, 42M15, 42M19, 49M03), 2 adedi *Lb. plantarum* (47M01, 47M07), 1 adedi *Lb. pentosus* (47M09) , 1 adedi *Lb. rhamnosus* (50T09), 1 adedi *Lb. helveticus* (5T08), 8 adedi *E. faecium* (24M05, 24M07, 50M08, 45T20, 46T02, 46T04, 46T06, 46T20), 1 adedi *E. durans* (3T17), 1 adedi *E. faecalis* (19M02), 1 adedi *Str. macedonicus* (8M13), 1 adedi *Leu. mesenteroides* (10M19) ve 1 adedi *P. acidilactici* (50T07) türleri ile %97'nin üzerinde benzer bulundu. Kalan 6 izolatın LAB suşları olmamasından dolayı tezden çıkarıldı.

Tanımlama sonuçları daha önce belirlenen ve otolitik aktivite bakımından yüksek bulunan LAB ile kıyaslandığında oldukça benzer bulundu. Özellikle *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşları birçok çalışmada otolitik aktivite açısından ön plana çıkarılmıştır (Higgins ve diğ. 1973, Terzaghi ve Sandine 1975; Lortal ve diğ. 1991, Ostlie ve diğ. 1995, Dako ve diğ. 1995, Boutrou ve diğ. 1998, Nunez ve diğ. 2011, Çıbık ve Chapot-Chartier 2004, Piraino ve diğ. 2008, Xu ve Kong 2013, Zuo ve diğ. 2014). Buna karşın bu çalışmada otolitik aktivite açısından önemli oranda olan *Lb. rhamnosus* (50T09) suşu bu yönde yapılmış çalışmalar açısından farklı olarak dikkati çekmektedir.

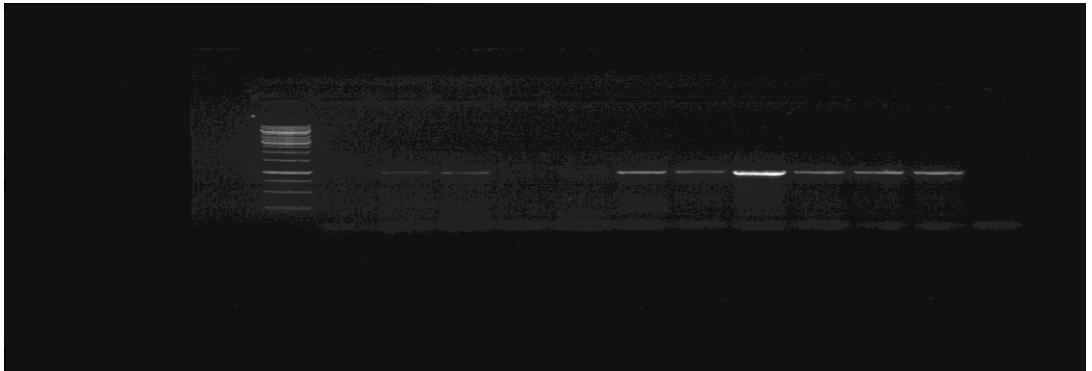
İzolatların tanımlama sonuçları otoliz oranları ile değerlendirildiğinde, aynı türlerin otoliz oranlarının da oldukça benzer olduğu gözlemlendi. Her ne kadar bakterilerin otolitik davranışları suşa bağlı bir özellik olsa da (Pillidge ve diğ. 2002), çalışmadan elde edilen (GTG)₅ parmak izi sonuçları ile birlikte düşünüldüğünde bu türlerin aynı suşlar olmasından bu durumun ileri geldiği varsayılabilir.



Şekil 3.7: Çiğ süt ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarından 16S-27F/16S-780R primerleri kullanılarak çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri



Şekil 3.8: Çiğ süt ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarından 529F/1491R primerleri kullanılarak çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri



Şekil 3.9: Çiğ süt ve peynirlerden izole edilen LAB izolatlarından 529F/1491R primerleri kullanılarak çoğaltılan 16S rDNA fragmentleri

Tablo 3.7: Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilip, seçilen otolitik LAB izolatlarının rRNA geni dizi analizine göre tanımlama sonuçları.

PUFEC Kodu	İzolat Kodu	İzolasyon Kaynağı	Tür	Tanımlama Yüzdesi (%)
PFC229	01M09	Süt	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
PFC236	05T08	Süt	<i>Lb. helveticus</i>	100
PFC235	03T17	Süt	<i>E. durans</i>	97
PFC255	08M13	Süt	<i>Str. macedonicus</i>	98
PFC234	10M19	Süt	<i>Leu. mesenteroides</i>	98
PFC233	17M20	Süt	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	97
PFC239	24M08	Süt	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
PFC232	24M05	Süt	<i>E. faecium</i>	98
PFC247	24M07	Süt	<i>E. faecium</i>	99
PFC254	19M02	Süt	<i>E. faecalis</i>	100
PFC240	42M07	Köy Peyniri	<i>Lb. casei</i>	100
PFC241	42M11	Köy Peyniri	<i>Lb. casei</i>	98
PFC230	42M13	Köy Peyniri	<i>Lb. casei</i>	100
PFC242	42M15	Köy Peyniri	<i>Lb. casei</i>	99
PFC243	42M19	Köy Peyniri	<i>Lb. casei</i>	99
PFC249	45T20	Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i>	99
PFC250	46T02	Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i>	99
PFC251	46T04	Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i>	99
PFC252	46T06	Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i>	99
PFC253	46T20	Tulum Peyniri	<i>E. faecium</i>	99
PFC244	49M03	Ezine Peyniri	<i>Lb. casei</i>	96
PFC245	47M01	Tulum Peyniri	<i>Lb. plantarum</i>	97
PFC231	47M07	Tulum Peyniri	<i>Lb. plantarum</i>	97
PFC246	47M09	Tulum Peyniri	<i>Lb. pentosus</i>	98
PFC248	50M08	Ezine Peyniri	<i>E. faecium</i>	98
PFC237	50T07	Ezine Peyniri	<i>P. acidilactici</i>	99
PFC238	50T09	Ezine Peyniri	<i>Lb. rhamnosus</i>	99

3.4 Otolitik LAB'lerinin Otolizine Çevresel Koşulların Etkisi

Yapılan moleküler tanımlama sonucunda 27 izolat arasından benzer türlerden bir adet alınarak 10 adet LAB'nin (PFC229, PFC230, PFC231, PFC232, PFC233, PFC234, PFC235, PFC236, PFC237, PFC238) otoliz özelliklerine pH, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklığı ile LAB'lerin gelişme ortamında kullanılan şeker çeşitliliğinin etkisi araştırıldı.

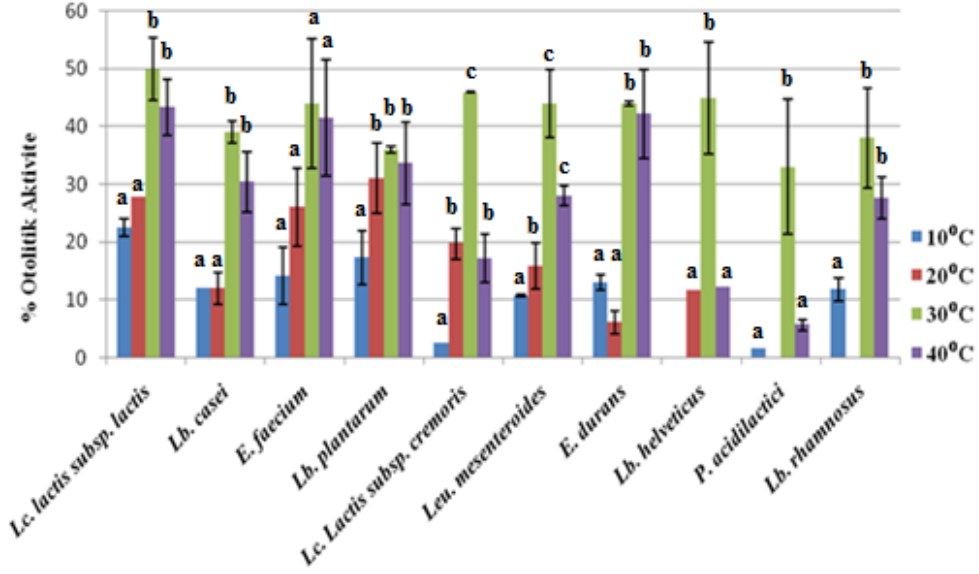
3.4.1 LAB Suşlarının Otolizi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Seçilen 10 adet LAB'nin otolizi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, söz konusu suşların potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH7.0) 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklarda 24 sa inkübasyonla otolizi gerçekleştirildi. Tüm suşların farklı sıcaklık derecelerindeki otoliz oranları Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Buna göre sıcaklık artışı ile birlikte tüm suşların otolitik aktivitesinde artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Özellikle 20°C'den sonra LAB suşlarının otoliz oranlarında 2 kata yakın artış meydana geldi. Ancak 30°C ile 40°C arasında tüm suşlar benzer otolitik aktivite gösterdi. Aynı şekilde 10°C ile 20°C arasında da LAB suşlarının otolizi benzer düzeyde ölçüldü ($p > 0,05$). Söz konusu bu sonuçlar literatür verileri ile kıyaslandığında benzer şekilde Crouigneau ve diğ. (2000), *Oenococcus oeni* suşunda 10°C'den 40°C'ye otoliz oranının arttığını rapor etmiştir.

LAB'lerinin en yüksek otolizi 30°C'de olduğu ölçüldü ($p < 0,05$). 30°C de en yüksek otolitik aktivite *Lc. lactis* subsp *lactis*'te tespit edildi. En düşük otoliz oranı ise *P. acidilactici*'de belirlendi. Buna ilaveten *Lb. plantarum* suşunun otolitik davranışının ise sıcaklık değişiminden en az etkilendiği gözlemlendi. Kozáková ve diğ. (2010) ise iki farklı laktokok suşunun otolitik aktivitesine sıcaklık faktörünün etkisini değerlendirmek için 12 gün boyunca *Lc. lactis* HMM81 ve *Lc. lactis* NIZO B643 suşlarını 13, 30, 45 ve 56 °C'de inkübe etmiş, ilk 6 günde 30 °C de maksimum otoliz değerleri elde edilmiştir.

Peynirin olgunlaşma sıcaklığı açısından sonuçlar değerlendirildiğinde, 10°C'de en yüksek otoliz *Lc. lactis* subsp *lactis*'te meydana geldi bunu ise *Lb. plantarum* takip etti. Ancak tüm suşların otoliz oranı maksimum otoliz oranlarına

kıyasla %50 oranında azaldı ($p < 0,05$). Çalışmada *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşunun otolitik aktivitesinin diğerlerine kıyasla yüksek olması, bu suşun peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılması ve olgunlaşmada önemli rol alması (Crow ve diğ. 1995) açısından önemlidir.



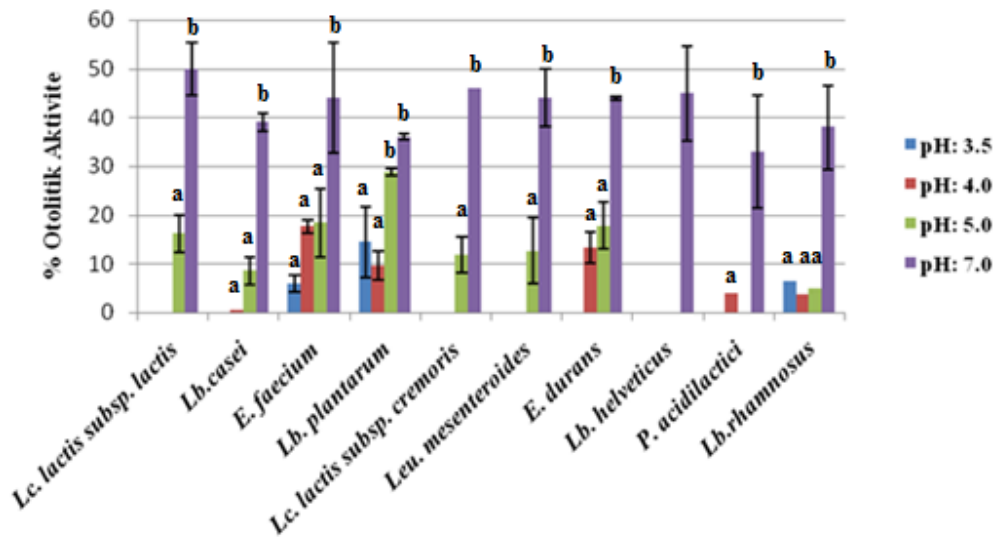
Şekil 3.10: Çiğ süt ve peynirden izole edilen ve seçilen LAB'lerin otolizi üzerine sıcaklığın etkisi. Farklı harfler $p < 0,05$ düzeyinde farklı olduğunu ifade etmektedir.

3.4.2 LAB Suşlarının Otolizi Üzerine pH'ın Etkisi

Farklı pH'ya ayarlanan potasyum fosfat tamponunda 30°C'de 24 sa inkübe edilen 10 adet LAB'nin otoliz oranları Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Potasyum fosfat tamponunun pH'sının 7,0'den aşağıya düşmesi durumunda tüm suşların otoliz oranında önemli ($p < 0,05$) düşüş belirlendi. Diğer suşlardan farklı olarak *Lb. plantarum* suşunda söz konusu pH'nın düşmesi otolitik aktivitede daha ılımlı bir düşüşe neden oldu. Tampon pH değerinin 3,5'e düşürülmesi durumunda 7 suşta (*Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. casei*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides*, *E. durans*, *Lb. helveticus* ve *P. acidilactici*) otoliz meydana gelmedi. LAB'lerinde pH düşüşü ile birlikte otoliz oranlarının önemli miktarda düşmesi, peptidoglikan hidrolaz enzimlerin çalışması için gerekli optimum pH ile ilişkili olduğu ileri sürülebilir. Çünkü bakterilerde otoliz peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakayı hidroliz ederek gerçekleşmektedir (Chapot-Chartier

ve Kulakauskas 2014). Nitekim bu çalışmanın sonuçları ile benzer şekilde Ostlie ve diğ. (1995) *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'te pH 5,0'ten 7,0'ye otoliz oranının arttığı ileri pH değerlerinde yeniden düştüğünü rapor etmiştir. Aynı yazarlar düşük pH'da otolizin düşmesini hücre sistemlerinde bulunan ve peptidoglikan hidrolaz enzimini parçalayan başka peptidaz enzimlerin aktifleşmesine bağlamıştır. pH düşüşü ile birlikte LAB'lerinde otolitik aktivitenin düştüğü benzer şekilde Kozáková ve diğ. (2010) tarafından da rapor edilmiştir. Ancak Huard ve diğ. (2004) ve Nunez ve diğ. (2011) çalışmalarında pH düşüşü ile birlikte otoliz değerlerinin yükseldiğini ifade etmiştir. Bu durumu Huard ve diğ. (2004) AcnB, AcnD'nin pI değerlerinin nötr pH değerlerine yakın olması ile açıklamıştır.

Peynirin olgunlaştırılmasında ortamının pH'sının 5,0 civarında olması suşlar arasından *Lb. plantarum*, *E. faecium*, *E. durans* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* otoliz aktivitesinin orta düzeyde devam etmesi nedeniyle peynir teknolojisi açısından ön plana çıkmaktadır.



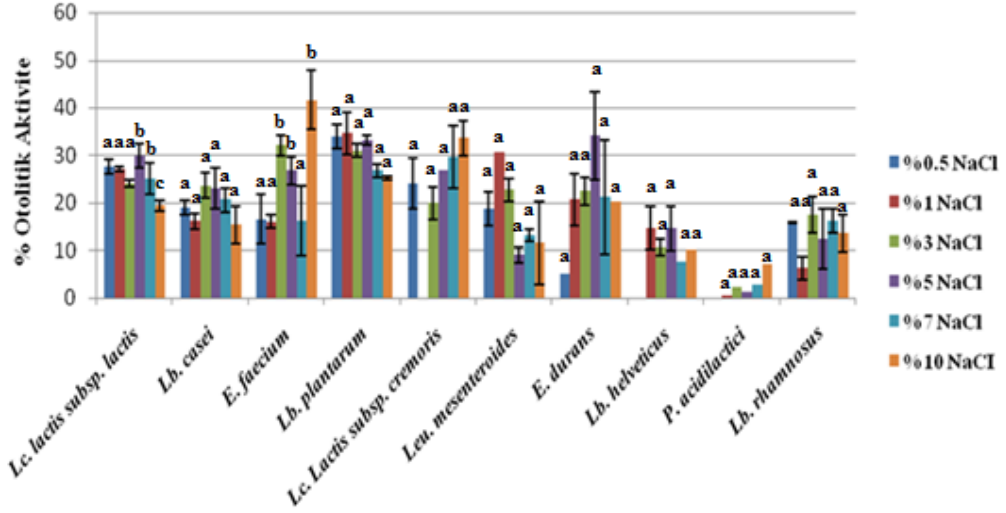
Şekil 3.11:Çiğ süt ve peynirden izole edilen ve seçilen LAB'lerin otolizi üzerine pH'ın etkisi. Farklı harfler p<0.05 düzeyinde farklı olduğunu ifade etmektedir.

3.4.3 LAB Suşlarının Otoliz Üzerine Farklı Tuz Konsantrasyonunun Etkisi

Çalışmada seçilen 10 adet LAB'nin farklı tuz konsantrasyonlarına ayarlanmış (%0,5, %1, %3, %5, %7, %10) potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH:7,0) 30 °C'de 24 sa inkübasyon sonunda otoliz değerleri Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Buradan izlendiği gibi LAB'nin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki otoliz davranışları farklılıklar gösterdi ($p>0,05$). Her bir suşun maksimum otolizi farklı NaCl konsantrasyonunda gerçekleşti. Tüm suşlar değerlendirildiğinde en yüksek otoliz *E. faecium* PFC232'de %41 oranında %10 NaCl varlığında meydana geldi. Diğer taraftan *Lc. lactis*, *Lb. casei* ve *Lb. plantarum* suşlarının otoliz oranlarının NaCl konsantrasyonu artışı ile değişmediği gözlemlendi ($p>0,05$).

Bu LAB'lerinin peynir üretiminde starter kültür veya destek kültür olarak kullanılabileceği varsayıldığında; peynir olgulaştırılmasında kullanılan %3-5 aralığındaki NaCl konsantrasyonunda en yüksek otoliz *Lb. plantarum* PFC231 (%30-33) ile *Lc. lactis* subsp. *lactis* PFC229 (%24-29) suşlarında belirlendi. Ayrıca bu suşların NaCl konsantrasyon değişimlerinden çok fazla etkilenmeyerek benzer otoliz oranlarına sahip oldukları da izlendi.

Benzer bir çalışmada *Lc. lactis* HMM81 ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* N120B643 suşlarının 0-15 g/L NaCl kullanılan ortamdaki otoliz oranları belirlenmiş, buna göre bu suşların en yüksek otolizi 6,5 g/L NaCl oranında meydana gelmiştir. Diğer taraftan bu çalışmada da tuz konsantrasyonu ile LAB suşlarının otoliz arasında ilişkili bir korelasyon bulunamamıştır (Kozáková ve diğ. 2010).

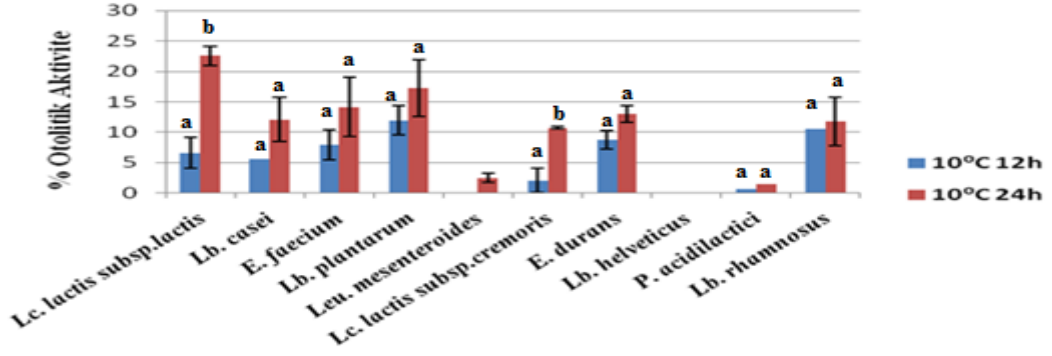


Şekil 3.12: Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB'lerin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki % otolitik aktivite değerleri. Farklı harfler $p < 0.05$ düzeyinde farklı olduğunu ifade etmektedir.

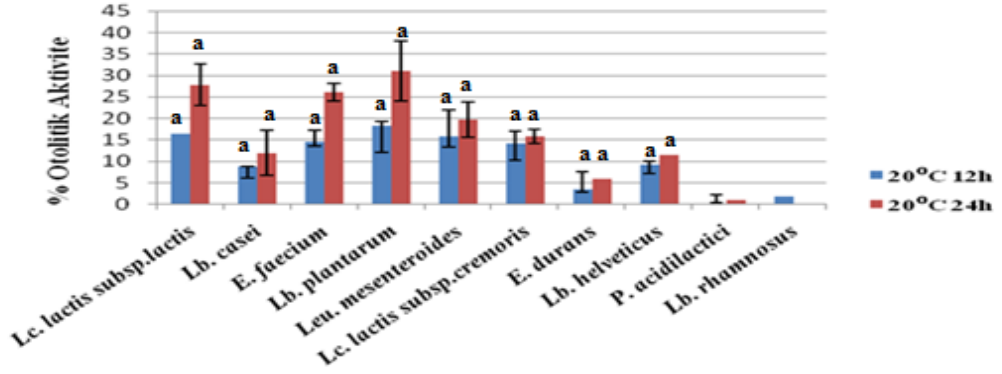
3.4.4 Otoliz üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

LAB'lerin otolizi üzerine farklı sıcaklıklardaki inkübasyon süresinin etkisini belirlemek amacıyla, LAB'ler potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH 7,0) 10°C, 20°C ve 40°C'de ayrı ayrı 12 ve 24 sa inkübe edildi. LAB'lerin farklı sıcaklık ve sürelerdeki otoliz oranları Şekil 3.13 a, b ve c'de sunulmuştur. Buna göre tüm inkübasyon sıcaklıklarında 24 saatlik inkübasyon sonunda, 12 saate göre LAB'lerinde daha yüksek otoliz gerçekleşti. Ancak inkübasyon sıcaklığının yükselmesi ile 24 saat sonunda 12 saate göre LAB'lerin otoliz değerlerinin daha fazla arttığı saptandı ($p < 0,05$). Tüm sıcaklıklarda inkübasyon süresinin artışı ile birlikte en fazla otoliz artışı *Lc. lactis subsp. lactis* PFC229, *Lb. plantarum* PFC231 ve *E. faecium* PFC232 suşlarında meydana geldi. Bu sonuçlar peynir olgunlaştırılmasında süreye bağlı olarak LAB'lerin otolizinin artacağına işaret etmiştir.

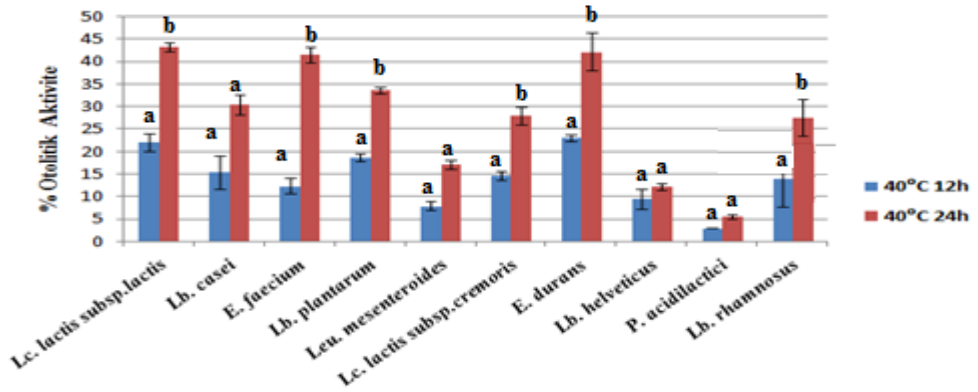
a



b



c



Şekil 3.13: Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB'lerin 10°C (a), 20°C (b) ve 40°C'de (c) 12 ve 24 saat inkübasyon sonucu ölçülen % otoliz değerleri. Farklı harfler p<0.05 düzeyinde farklı olduğunu ifade etmektedir.

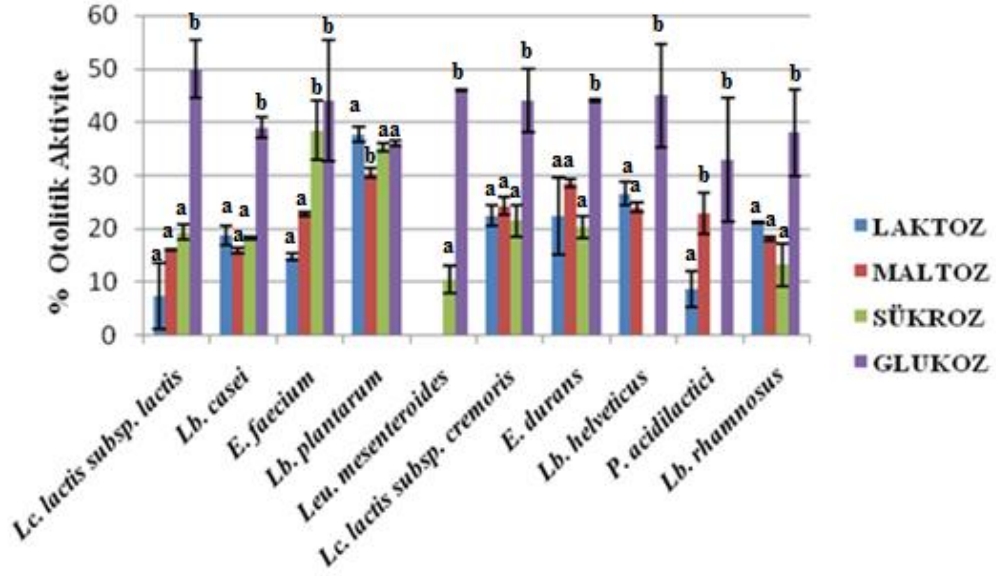
3.4.5 Bakteri Gelişme Ortamında Kullanılan Şeker Tipinin LAB Suşlarının Otolizi Üzerine Etkisi

LAB'lerin gelişme ortamında farklı şeker (laktoz, maltoz, sukroz ve glukoz) kullanımının hücre otolizi üzerine etkisi Şekil 3.14'de gösterilmiştir. *Lb. plantarum* PFC231 dışında tüm suşlarda en yüksek otoliz, glukozun gelişme ortamında kullanılması ile gerçekleşti ($p<0,05$). *Lb. plantarum* PFC231 suşunda ise en yüksek otoliz laktoz şekeri ile birlikte %37 oranında meydana geldi. Ancak glukoz dışında diğer şekerlerin kullanılması durumunda LAB suşlarının otoliz oranlarında önemli farklılık gözlenmedi. Otoliz açısından etkili olduğu gözlenen glukozun gelişme ortamında kullanılması durumunda en yüksek otoliz (%50) *Lc. lactis* subsp. *lactis* PFC229 suşunda meydana gelirken, bunu *Leu. mesenteriodes* PFC234 suşu (%46) takip etti.

Gelişme ortamında farklı şeker kullanımının LAB'lerinin otolizi üzerine etkisi değerlendirildiğinde dikkati çeken sonuçlardan en önemlisi *Lb. plantarum* PFC231 suşunun otolizinin laktoz kullanılması durumunda daha fazla olması ve diğer şekerlerin de laktoz kadar otolize neden olmasıdır. Bu durum özellikle peynir olgunlaşması açısından oldukça önemlidir. Çünkü peynir üretimi ve olgunlaşma sürecinde ortamda bulunan laktoz bu suşun starter veya destek kültür kullanılması durumunda otolizini teşvik edeceğinden peynirin olgunlaşmasına katkı da bulunacağı öne sürebilir.

Çalışmadan alınan sonuçlara göre glukozun LAB'lerde otolizi teşvik ettiği, diğer şekerlerin otolizi baskıladığı açık bir şekilde gözlenmiştir ($p<0,05$). Benzer bir şekilde Vegarud ve diğ. (1983) gelişme ortamında karbon kaynağı olarak laktoz yerine glukoz kullanımının suşların gelişimini ve otolizini arttırdığını belirtmişlerdir. Şeker farklılığı ve otoliz ilişkisini ortaya koyan başka bir çalışmada da ortamda galaktoz bulunduğunda durağan fazdaki *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 suşlarının ortamda glukoz varlığına kıyasla daha az otoliz olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada her iki suşta otolisin olan *Acma*'nın hücresel ifadesinde bir farklılığın olmadığını tespit edilmiştir. Ancak ilave denemeler galaktozun hücre duvarı lipoteikoik asit (LTA) yapısında değişikliğe neden

olduğundan AcmA'nın peptidoglikan yapısına bağlanamadığına işaret etmiştir (Buist ve diğ. 2008).



Şekil 3.14:Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB 'lerin gelişme ortamında farklı şeker tiplerinin kullanılması durumunda ölçülen % otoliz oranları. Farklı harfler p<0.05 düzeyinde farklı olduğunu ifade etmektedir.

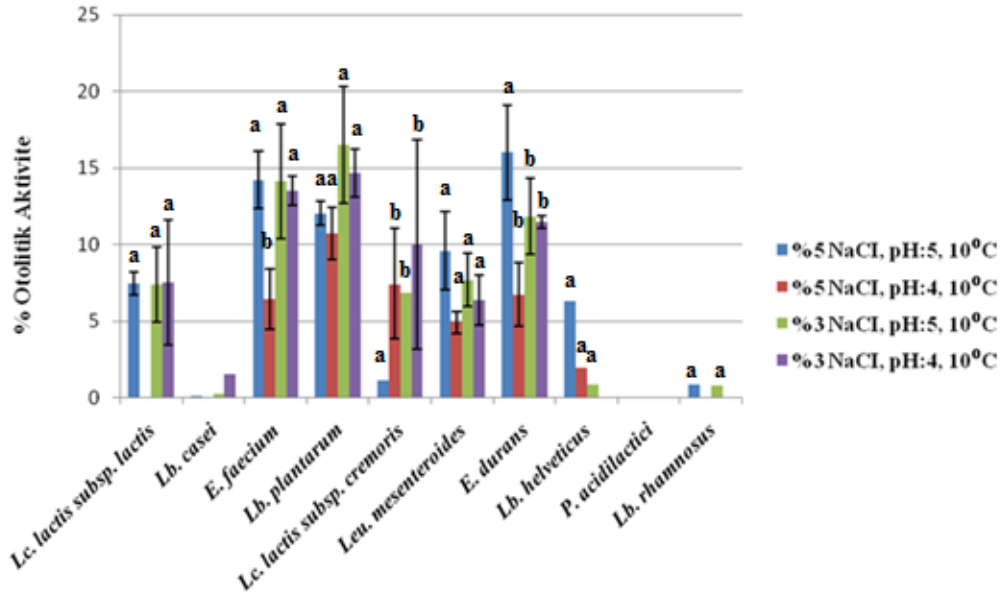
3.4.6 Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonu Kombinasyonlarının LAB'lerin Otolizine Etkisi

Tez çalışmasında araştırılan çevresel faktörlerin LAB'lerin otolizi üzerine birlikte etkisi, bu suşların peynirin olgulaştırıldığı koşullardaki otoliz davranışı hakkında bilgi alabilmek için araştırıldı. Buna göre Materyal ve Metot kısmındaki Tablo 2.1'de verilen 4 farklı kombinasyonun uygulanması sonucunda LAB suşlarının otoliz oranları Şekil 3.15'de verilmiştir. Tüm kombinasyonların uygulanması 10°C inkübasyon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. 10 adet LAB'den 6'sında en yüksek otolizin izlendiği kombinasyon %5 NaCl+pH 5 değerlerinde gerçekleşti. Bunun dışında 3 adet LAB'de ise en yüksek otoliz %3 NaCl+pH 4 kombinasyonunda oluştu. Bu sonuçlar LAB suşlarında çevresel faktörlerin kombinasyonunda pH'ın otoliz üzerinde daha fazla etkili olduğuna işaret etti (p>0,05).

Tuz konsantrasyonu ve pH'ın kombinasyonlu denemelerinde en yüksek otoliz, *Lb. plantarum* PFC231 suşunda %3 NaCl+pH 5 kombinasyonu ile % 16,48

oranında tespit edildi. Bu değer söz konusu suşun potasyum fosfat (100 mM, pH 7,0) tamponundaki otoliz oranına kıyasla %55 daha düşüktür. Buna ilavaten aynı suşun %3 tuz konsantrasyonu ve pH 5'teki otoliz oranlarına göre de sırasıyla %48 ve %42 düşük olduğu hesaplandı. Tüm bu karşılaştırmalar pH ve tuz konsantrasyonu kombinasyonunun *Lb. plantarum* PFC231 'de olduğu gibi LAB'de otolizi düşürdüğü sonucuna varıldı. Ancak peynir olgulaştırmasında kullanılan tuz konsantrasyonu ve pH değerleri dikkate alındığında (Lortal ve Chapot-Chartier 2005) başta *Lb. plantarum* PFC231 olmak üzere, *E. durans* PFC235 ve *E. faecium* PFC232 suşlarının peynir olgulaştırmasında otoliz olarak katkı sağlayabilecekleri öne sürebilir.

Peynir ortamını modelleyen koşullarda yapılan bir çalışmada *Lc. lactis* suşunun farklı türlerinde 0,17 M NaCl konsantrasyonunda pH 5,4'de, pH 7,0'a göre, ilavaten 0,51 M NaCl konsantrasyonunda ise pH 7,0'de, pH 5,4'e göre daha yüksek otoliz oranları belirlenmiştir (Nunez ve diğ. 2011). Bu literatür verisi ile tez sonuçları kıyaslandığında ortam koşullarında tuz konsantrasyonu ve pH'nın birlikte artırıldığında LAB'lerinin otoliz oranlarının da artırdığı sonucu bakımından uyumludur.

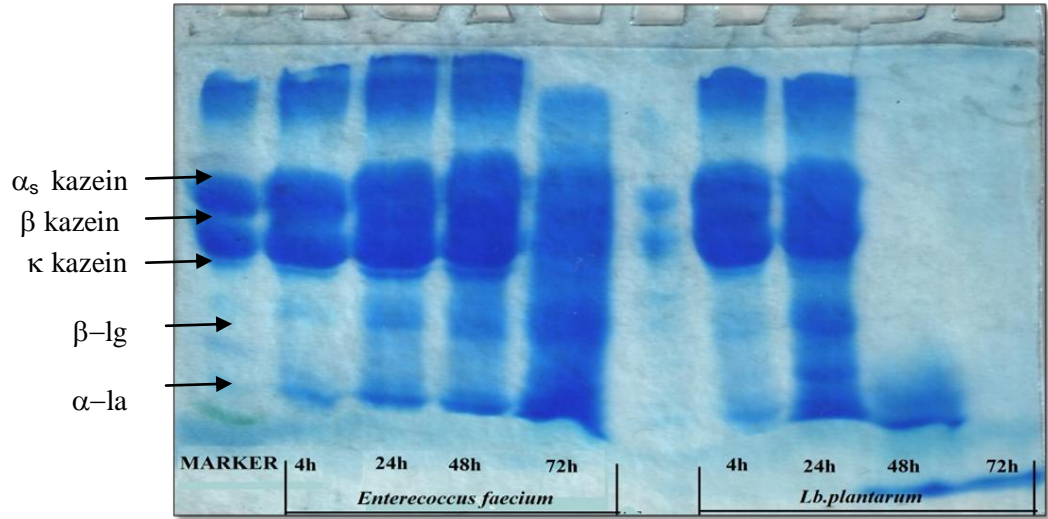


Şekil 3.15: Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB'lerin % otolitik aktivite değerlerine tuz (%3-5), pH (4-5) ve sıcaklığın (10°C) birlikte etkisi. Farklı harfler p<0.05 düzeyinde farklı olduğunu ifade etmektedir.

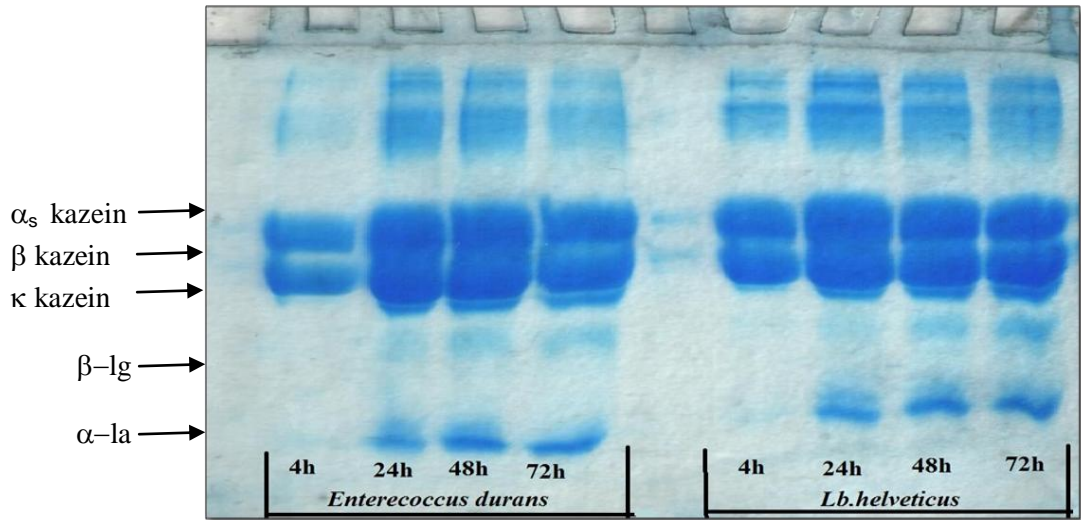
3.5 Otolizin Proteolitik Aktiviteye Etkisi

Yüksek otolitik aktiviteye sahip ve tanımlanmış 10 adet LAB suşunun otoliz olduktan sonra hücre içi proteolitik aktivitesi, söz konusu suşlardan elde edilen hücre içi preparatların farklı inkübasyon sürelerinde (4, 24, 48 ve 72. sa) kazeini parçalama spesifiteleri SDS-PAGE jeli üzerinde görüntülenerek belirlendi. Buna göre Şekil 3.16'da görüldüğü üzere *E. faecium* PFC232'un 24. sa sonunda kazeini parçalamaya başladığı ancak 72. sa sonunda düşük molekül ağırlıklı protein bantları oluşturduğu gözlemlendi. *Lb. plantarum* PFC231 24. sa'ten sonra kazeini parçaladığı, 48. sa sonunda ise kazein bantlarının tamamen izlenemediği görülmüştür. Şekil 3.17 ve Şekil 3.18 incelendiğinde ise, *E. durans* PFC235, *Lc. lactis* subsp. *lactis* PFC229 ve *Lb. helveticus* PFC236 izolatlarının bantlarında zamanla herhangi bir değişim gözlemlenmedi. Şekil 3.19 ve 3.20 ise *Leu. mesenteroides* PFC234 ve *P. acidilactici* PFC237 suşlarının 48. sa'ten sonra yoğun proteolitik aktivite göstererek kazeini parçaladığı 72. sa'ten sonra ise herhangi bir protein izinin bulunmadığı görüldü. *Lb. casei* PFC230 suşunda ise sadece 72. sa'te kazeinin parçalanabildiği gözlemlendi. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* PFC233 suşunun proteolitik aktivitesi 24. sa'te başlayıp, 48. sa'te ortamda sadece düşük molekül ağırlıklı proteinler kaldı. *Lb. rhamnosus* PFC238 suşunda ise 24. sa'te kazein parçalanmaya başladı ve 48. sa sonunda kazein bantları tamamen kayboldu.

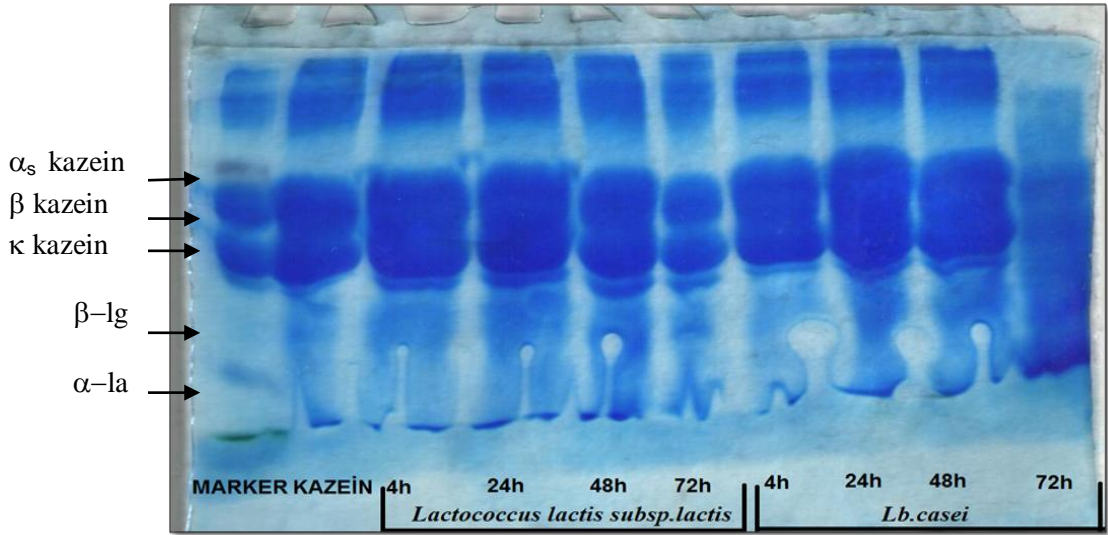
Lb. plantarum PFC231 suşunun 48. sa sonunda kazeini tamamen parçalamasından dolayı, hücre içi proteolitik aktivitesi yüksektir. Bu suşa ilaveten *Leu. mesenteroides* PFC234, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* PFC233, *P. acidilactici* PFC237, *Lb. rhamnosus* PFC238 suşlarının da yüksek olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar başta *Lb. plantarum* PFC231 suşu olmak üzere diğer sayılan LAB'lerin otoliz olduktan sonra ortama salıverilen hücre içi proteolitik enzimlerin kazein gibi proteinleri parçalayabileceği ve böylece peynir olgunlaşmasına katkıda bulunabileceğine işaret etti. Nitekim birçok çalışmada peynirin olgunlaştırılmasında matrikste bulunan bakterilerin otolizi sonucu hücre içi peptidaz enzimlerinin proteinleri indirgeyerek peptitlere ve hatta amino asitlere kadar parçaladıkları bu reaksiyonların da peynirin aromasının geliştirilmesinde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Sheehan ve diğ. 2005, Boutrou ve diğ. 1998, Hannon ve diğ. 2007).



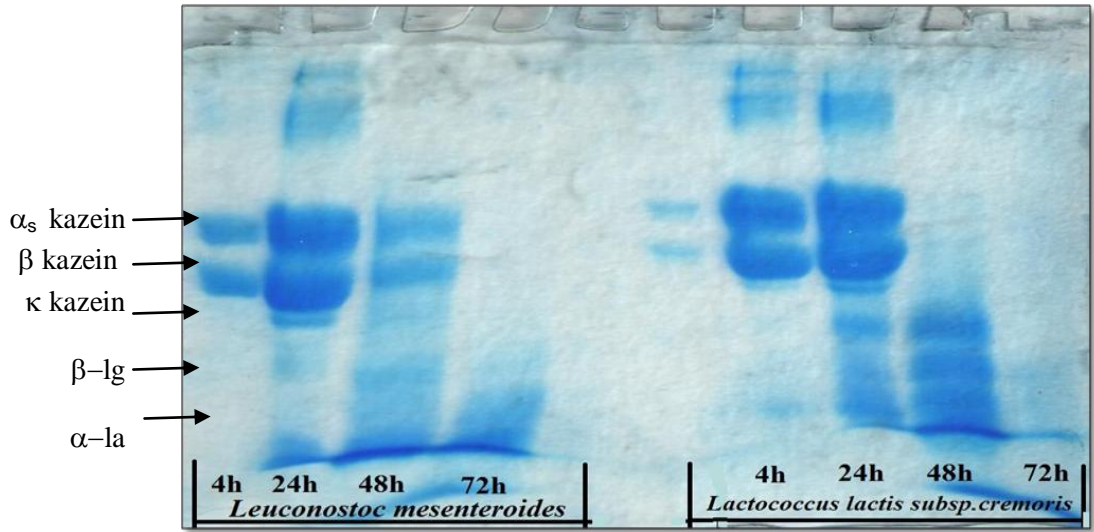
Şekil 3.16: *E. faecium* PFC232 ve *Lb. plantarum* PFC231 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü



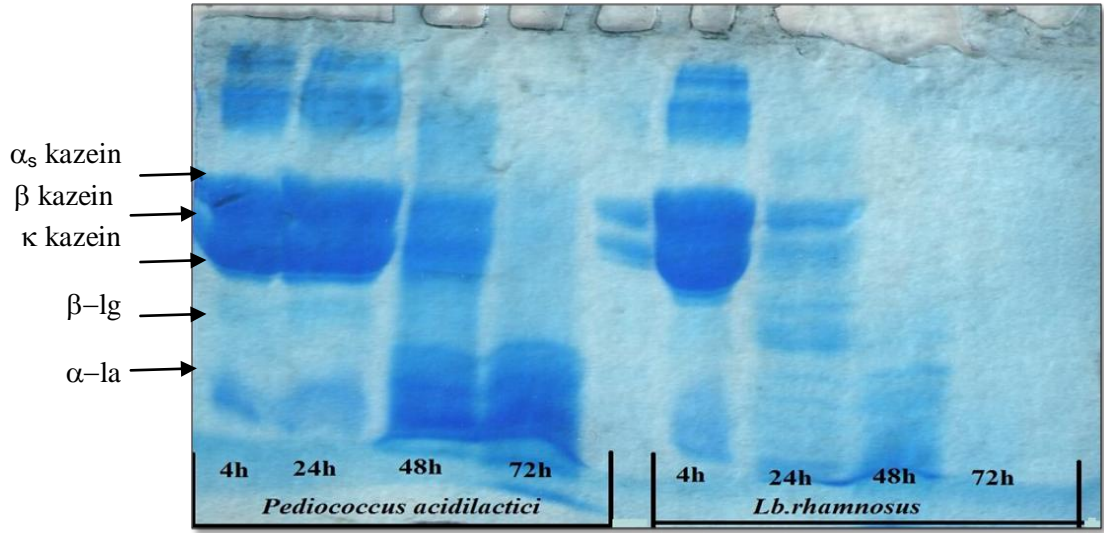
Şekil 3.17: *E. durans* PFC235 ve *Lb. helveticus* PFC236 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü



Şekil 3.18: *Lc. lactis subsp. lactis* PFC229 ve *Lb. casei* PFC230 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü



Şekil 3.19: *Leu. mesenteroides* PFC234 ve *Lc. lactis subsp. cremoris* PFC233 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü



Şekil 3.20: *P. acidilactici* PFC237 ve *Lb. rhamnosus* PFC238 izolatlarının otoliz sonrası hücre içi enzimleri tarafından kazeinin parçalanmasının SDS-PAGE jel görüntüsü

4. GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında çiğ süt ve peynir örneklerinde yüksek oranda otoliz olabilen LAB'lerin izolasyonu, tanımlanması ve otolitik davranışlarının karakterizasyonu araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışma sonuçları, *Lb. plantarum* PFC231 suşunun, gerek yüksek otoliz özellikleri, gerekse de peynir olgunlaştırmasında öne çıkan düşük sıcaklık, pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında otolitik davranışlarını sürdürmesi nedeniyle peynir üretimi için starter kültür olarak önemli olduğunu göstermiştir. Bunun dışında çalışmada elde edilen diğer sonuçlar ve öneriler aşağıda sıralanmıştır.

- 1) Denizli bölgesinden toplanan çiğ süt ve peynir örneklerinin mikroflorasında bulunan LAB'lerin otoliz oranları genel olarak literatür bulguları ile uyumlu olsa da, maksimum otoliz değerleri bakımından literatürde rapor edilen değerlerden daha yüksek suş izolasyonu yapılamamıştır. Bu durumun yapılan otoliz koşullarının farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.
- 2) Ortam koşulunun pH'sı, çalışmada kullanılan LAB'leri en fazla etkileyen faktör olmuştur. pH'nın otoliz üzerindeki belirleyici etkisi muhtemelen hücre otolisininin çalışmasını etkilemesinden ileri gelmektedir. Ancak bu durum peynirin olgunlaşmasında kullanılabilecek bir parametredir. Peynir matrikslerinde pH'nın düzenlenmesi ile otolizin de düzenlenebileceği önerilebilir.
- 3) LAB'lerin yüksek otoliz olması, peynir olgunlaştırılması açısından katkı sağlayabileceği ya da destek kültür olarak kullanılabileceği yönünde yeterli değildir. Çalışma sonuçlarında da görüldüğü gibi *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *E. durans*, *Lb. helveticus*, otoliz olmasına rağmen kazeini parçalayamamıştır. Bu nedenle otoliz çalışmalarında hücre içi enzimatik aktivite de bu yönde yürütülecek çalışmalar için düşünülmesi gerekir. Örneğin çalışmada izole edilip tanımlanan *Lb. plantarum* PFC231, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* PFC233 ve *Lb. rhamnosus* PFC238 suşlarının gösterdiği yüksek hücre içi proteolitik aktivite araştırılmalıdır.

5. KAYNAKLAR

Axelsson, L., “ Lactic acid bacteria: Classification and physiology”, (eds: S. Salminen, A. Von Wright), Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2, New York: *Marcel Dekker Inc.*, 1–72, (1998).

Ayad, E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T.M. and Smit, G., “Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin”, *Int. Dairy J.*, 9, 725–735, (1999).

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M., “Recent advances in cheese microbiology”, *Int. Dairy J.*, 11, 259-274, (2001).

Bie, R. and Sjöström, G., “Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part II- Experiments with fluid substrates and cheese”, *Milchwissenschaft*, 30,739-747, (1975).

Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D. and Webb, C., “Cereal based fermented foods and beverages”, *Food Res. Int.*, 36, 527-543, (2003).

Botina, S.G., Tsygankov, Y.D. and Sukhodolets, V.V.,”Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing”, *Russian Journal of Genetics*, 12 (42), 1367-1379, (2006).

Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, R.,“Preliminary characterization of microflora of Comte cheese”, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 123-131, (1998).

Boutrou, R., Sepulchre, A., Pitel, G., Durier, C., Vassal, L., Gripon, J.C., and Monnet, V., “Lactococcal lysis and curd proteolysis: two predictable events important for the development of cheese flavour”, *Int. Dairy J.*, 8, 609-616, (1998).

Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J. and Moineau, S., “Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review”, *J. Dairy Sci.*,86, 407–423, (2003).

Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K.I., Dabrowska, M., Venema, G. and Haandrikman, A.I., “Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation”, *J. Bacteriol.*, 177, 1554-1563,(1995).

Buist, G., Steen, A., Kok, J. and Kuipers, O.P.,“LysM, a widely distributed protein motif for binding to peptidoglycans”,*Mol. Microbiol.*, 68, 838–847, (2008).

Buist, G., Venema, G. and Kok, J., "Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis", *J. Bacteriol.*, 180, 5947–5953, (1998).

Chapot-Chartier, M.P., "Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages", *Front. Microbiol.*, 22(5), 236, (2014).

Chapot-Chartier, M., and Kulakauskas, S., "Cell wall structure and functions in lactic acid bacteria", *Microbial Cell Factories*, 13, 1-23, (2014).

Cibik R, Cetinkaya F, Gunes N, et al. "Autolysis of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and clinical specimens", *Medycyna Weterynaryjna*, 62 (11), 1242-1244, (2006).

Çıbık, R. and Chapot-Chartier, P., "Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*", *Let. Appl. Microbiol.*, 38, 459-463, (2004).

Claes, I.J., Schoofs, G., Regulski, K., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.P., Rolain, T., et al., "Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG", *PLoS. One.*, 7, e31588, (2012).

Coelho, M.C., Silva, C.C., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E. and Rosa, H.J.D., "Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria", *Int. J. Food Microbiol.*, 191(1), 53-59, (2014).

Crougneau, A.A., Feuillat, M. and Guilloux-Benatier, M., "Influence of some factors on autolysis of *Oenococcus oeni*", *Vitis*, 39(4), 167-171, (2000).

Crow, V., Curry, B. and Hayes, M., "The Ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar", *Int. Dairy J.*, 11, 275-283, (2001).

Crow, V.L., Martley, F.G., Coolbear, T., and Roundhill, S.J., "The influence of phage assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML8 on Cheddar cheese ripening", *Int. Dairy J.*, 5, 451-472, (1995).

Çelik, Ş., Özdemir, C., Özdemir, S. ve Sert, S., "Diyarbakır yöresinde tüketime sunulan salamura beyaz peynir örneklerinin mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri", *V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu*, MPM Yayınlar, No: 621, 351-360, (1998).

Dako, E., El-Soda, M., Vuilleumard, J.C., and Simard, R.E., "Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria", *Food Res. Int.*, 28, 503-509, (1995).

De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R. and Gobbetti M., "Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses

based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2011-2020, (2001).

De Vuyst, L. and Degeest, B., “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153–177, (1999).

De Vuyst, L. and Leroy, F., “Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications”, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 194–199, (2007).

El Soda, M., “The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 239-252, (1993).

El-Kholy, W., El-Soda, M., Ezzat, N. and El Shafei, H., “Autolysis and intracellular enzyme release from cheese related dairy lactobacilli”, *Lait*, 78, 439-452, (1998).

Ganzle, M.G., Vermeulen, N. and Vogel, R.F., “ Carbonhydrate, peptide and lipid metabolizm of lactic acid bacteria in sourdough”, *Food Microbiol.*, 24(2), 128-138, (2007).

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L. and Omar, N.B., “Bacteriocin-based strategies for food biopreservation”, *Int. Jour. Food. Microbiol.*, 120, 51–70, (2007).

Gonzalez, L., Zarate, V., “Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture”, *J. Dairy Sci.*, 82(2), 236-241, (2015).

Guldfeldt, L.U., Sørensen, K.I., Ströman, P., Behrndt, H., Williams, D., and Johansen, E., “Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening”, *Int. Dairy J.*, 11, 373-382, (2001).

Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A., and Beresford, T.P., “Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese”, *Int. Dairy J.*, 13(4), 313–323, (2003).

Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P., “Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*”, *Int. Dairy J.*, 17, 316–327, (2007).

Higgins, M.L., Coyette, J. and Shockman, G.D., “Sites of cellular autolysis in *Lactobacillus acidophilus*”, *J. Bacteriol.*, 116 (3), 1375-1382, (1973).

Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., Wessner, F., Foster, S.J., Chapot-Chartier, M.P., “Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: identification of a third N-acetylglucosaminidase, AcnC”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3493–3499, (2004).

Kenny, O., FitzGerald, R.J., O’Cuinn, G., Beresford, T., and Jordan, K., “Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during cheddar cheese ripening”, *Int. Dairy J.*, 16,797-804, (2006).

Kleerebezem, M., Hols, P. and Hugenholtz, J., “Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering”, *Enz Microbial. Technol.*, 26, 840–848, (2000).

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C.h. and Reuter, G., “Taxonomy and physiology of probiotics lactic acid bacteria”, *Int. J. Food Microbiol.*, 42, 103-125, (1998).

Korakli, M., Ganzle, M.G., and Vogel, R.F., “Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*”. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 958-965, (2002).

Korakli, M., Rossman, A., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F., “Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *L. sanfranciscensis*”, *J. Sci. Food Agric.*, 49, 5194–5200, (2001).

Kozáková, D., Solich, K., Ondráčková I., Sviráková, E. and Plocková, M., “Effect of some environmental factors on autolysis of lactococci used for cheese production”, *J. Food Nut. Res.*, 49, 1-9 , (2010).

Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B., “Bacterial exopolysaccharides a perception”, *J. Basic Microb.*, 47,103–117, (2007).

Laemmli, U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature (London)*, 227, 680–685, (1970).

Law, B.A., “Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies”, *Int. Dairy J.*, 11, 383-398, (2001).

Layec, S., Decaris, B. and Leblond-Bourget, N., “Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation”, *Res. Microbiol.*, 159, 507–515, (2008).

Lepeuple, A.S., Van Gemert, E. and Chapot-Chartier, M.-P.”Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel electrophoresis: identification of a prophage encoded enzyme”, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65, 4142–4148, (1998).

Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L., “Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation”, *Int. J. Food Microbiol.*, 106 (3), 270–285, (2006).

- Liu, C.F., Tseng, K.C., Chiang, S.S., Lee, B.H., Hsu, W.H., et al. “Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides*“, *J. Sci. Food Agric.*, 91, 2284–2291, (2011).
- Lortal, S. and Chapot-Chartier, M.P., “Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese”, *Int. Dairy J.*, 15, 857–871, (2005).
- Lortal, S., Rousseau, M., Boyaval, P. and van Heijenoort, J., “Cell wall and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046”, *J. Gen Microbiol.*, 137, 549-559, (1991).
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Çökmüş, C., (ed.), Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi , 11, Palme Yayıncılık, (2010).
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. et al., “Comparative genomics of the lactic acid bacteria”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103, 15611–15616, (2006).
- Martinez, R.C.R., Staliano, C.D., Vieira, A.D., Villarreal, M.L.M., Todorov, S.D., Saad, S.M.I., Franco, D.G.M., “Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread”, *Food Microbiol.*, 48, 143-152, (2015).
- Martinez-Cuesta, M.C., Requena, T. and Pelaez, C., “Use of a bacteriocin-producing transconjugants as starter in acceleration of cheese ripening”, *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 79-88, (2001).
- McSweeney, P.L.H., “ Biochemistry of cheese ripening”, *Int. J. Dairy Technol.*, 57(2-3), 127-144, (2004).
- Meijer, W., Dobbelaar, C., and Hugenholtz, J., “Thermo inducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: Implications for cheese ripening”, *Int. Dairy J.*, 8, 275–280, (1998).
- Nunez, J.R., Medrano, R.R., Moorillon, G.V.N. and Mendez, N.G., “Effect of pH and salt gradient on the autolysis of *Lactococcus lactis* strains”, *Brazil. J. of Microbiol.*, 42, 1495-1499, (2011).
- Ostlie, H.M., Vegarud, G., Langsrud, T., “ Autolysis of lactococci: detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 10, 3598-3603, (1995).
- Oumer, A., Gaya, P., Fernandez-Garsia, E., Mariaca, R., Gadre, S., Medina, M. and Nunez, M., “ Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture”, *J. Dairy Res.*, 68, 1117-1219, (2001).

Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventrino, V. and Pepe, O., "Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture", *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 2737-2747, (2012).

Perez, R.H., Zendo, T. and Sonomoto, K. "Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications", *Microb. Cell Fact.*, 13(1), S3, (2014).

Pillidge, C., Rallabhandi, P., Tong, X.Z., Gopal, P., Sullivan, P., "Autolysis of *Lactococcus lactis*", *Int. Dairy J.*, 12, 133-140, (2002).

Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeney, P., Parente, E., "Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from Pasta Filata Cheeses: A multivariate screening study", *Int. Dairy J.*, 18, 81-92, (2008).

Poquet, I., Saint, V., Sez nec, E., Simoes, N., Bolotin, A., Gruss, A., "HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing", *Mol Microbiol.*, 35, 1042–1051, (2000).

Redko, Y., Courtin, P., Mezange, C., Huard, C. and Chapot-Chartier, M.P., "*Lactococcus lactis* gene *yjgB* encodes a gamma-D-glutaminy l-L-lysylendopeptidase which hydrolyzes peptidoglycan", *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5825–5831, (2007).

Regulski, K., Courtin, P., Meyrand, M., Claes, I.J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., et al., "Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactobacillus casei* and characterization of the major gamma-D-Glutamyl-L-Lysylendopeptidase", *PLoS. One*, 7, e32301, (2012).

Robitaille, G., Tremblay, A., Moineau, S., St-Gelais, D., Vadeboncoeur, C. and Britten, M., "Fat-free yogurt made using a galactose-positive exopolysaccharide-producing recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*", *J. Dairy Sci.*, 92, 477–482, (2009).

Rolain, T., Bernard, E., Courtin, P., Bron, P.A., Kleerebezem, M., Chapot-Chartier, M.P. and Hols, P., "Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1", *Microbiol. Cell Fact.*, 11, 137, (2012).

Schagger, H. and von Jagow, G., "Tricine-sodium dodecyl sulphate-poly-acrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa.", *Anal. Biochem.*, 166, 368-379, (1987).

Sheehan, A., O'Loughlin, C., O'Cuinn, G., Fitzgerald, R. J., Wilkinson, M. G., "Cheddar cheese cooking temperature induces differential lactococcal cell permeabilization and autolytic responses as detected by flow cytometry: implications for intracellular enzyme accessibility", *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1007-1018, (2005).

Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R. and Massidda, O., "Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins and autolysis", *Microb. Drug Resist.*, 2, 95-98, (1996).

Smith, T.J., Blackman, S.A. and Foster, S.J., "Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions", *Microbiol.*, 146, 249-262, (2000).

Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J. and Kok, J., "AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning", *FEBS J.*, 272, 2854-2868, (2005).

Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K.J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A.L., Venema, G., Kuipers, O.P., Kok, J., "Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents", *J. Biol. Chem.*, 278, 23874-23881, (2003).

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H., "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1-29, (1997).

Svensson, M., Waak, E., Svensson, U. and Radstrom, P., "Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6398-6400, (2005).

Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E., "Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages". *Appl. Microbiol.*, 29(6), 807-813, (1975).

Tieking, M., and Ganzle, M.G., "Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli"., *Trends Food Sci. Technol.*, 16(1-3), 79-84, (2005).

Valence, F., Deutsch, S.M., Richoux, R., Gagnaire, V. and Lortal, L., "Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains", *J. Dairy Res.*, 67, 261-271, (2000).

van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., von HylckamaVlieg, J., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G. and Siezen, R.J., "Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis", *Int. Dairy J.*, 12, 111-121, (2002).

Vegarud, G., Castberg, H.B. and Langsrud, T., "Autolysis of group N streptococci: effects of media composition, modifications and temperature", *J. Dairy Sci.*, 66, 2294-2302, (1983).

Weerkamp, A.H., Klijn, N., Neeter, R. and Smit, G., "Properties of mesophilic lactic acid bacteria from raw milk and naturally fermented raw milk products", *Neth. Milk Dairy J.*, 50, 319–332, (1996).

Williams A.G., Noble, J. and Banks J.M., "Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese", *Int. Dairy J.*, 11(4–7), 203–215, (2001).

Wood, B., *Microbiology of Fermented Foods*, London: Blackie, (1998).

Xu, Y. and Kong, J. "Construction and potential application of controlled autolytic systems for *Lactobacillus casei* in cheese manufacture", *J. Food Prot.*, 76(7), 1187-1193, (2013).

Zuo, F.L., Feng, X.J., Chen, L.L. and Chen, S.W., "Identification and partial characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products produced by herders in the western Tianshan Mountains of China", *Lett. Appl. Microbiol.*, 59(5), 549-556, (2014).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selime HAZIR DALCA

Doğum Yeri ve Tarihi : MERSİN / 21.01.1990

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Elektronik posta : selime_hazir09@hotmail.com

İletişim Adresi : Çamlaraltı Mah. 6005 Sok.No:17 Çağdaş Apt.No:8 Kat:3 Kınıklı/ DENİZLİ

Yayın Listesi :

Kaya, H.I., Hazır, S. ve Şimşek, Ö., (2015) Tarhana kaynaklı bazı laktobasil suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikleri, İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi, Poster Sunum, s:255, 28-30 Nisan, Nevşehir.

Gökbel, Ö., Taşoğulları, N, Hazır, S. ve Şimşek, Ö., (2015) Nisin üreticisi *Lactococcus lactis* N8 ve LL27 suşlarının canlılığı üzerine liyofilizasyonun etkisi, Pamukkale Gıda Sempozyumu III, Poster sunum, s:70, 13-15 Mayıs, Denizli.

EKLER

EKLER

EK A.1 Tablolar

Tablo A.1: Çiğ süt ve peynirden izole edilen LAB izolatlarının 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması sonucu elde edilen PZR ürünlerinin jel üzerinde görülen DNA bantlarının dizileri.

İzolat Kodu	Tanımlama Sonucu	DNA Dizisi
17M20	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	AAAAATTTCCATGCGCTGCCTCATAATACACTTGACGCATGAAATTGGTGCTTGCA CCAATTTGAAGAGCAACGAACGGGTGAATAACCCGTGGGAATCTGCCTTTGAGC GGGGGACAACATTTGGAAACCAATGCTAATACCGCATAATAACTTTAAACACAAG TTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAG GTAGGTGGGGAGGGAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGG GTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAG TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA GAAGGGTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGGTATAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGG AAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGTAGGGCCCGAGCGGTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAG CGAGCGCAGTGGTTTATTAAGTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATG CCTTGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGAATCCATGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGAACACCGGTGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGGC TGTAAGTACTGACTGAGCTCAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATAGAAATACCCT AGGTAAAAC
10M19	<i>Leu. mesenteroides</i>	GCCTATACATGCAGTCGACGCACAGCGAAAGGTGCTTGACACCTTCAAGTGAGTGG CGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGG AAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAAGG CGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGTAA AGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTG GGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCACA ATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCCGGTCCG TAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTAGTTGACG GTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA TGTCCCGAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTA AGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAGTGGTTAA CTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT ATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAG GCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATA

Tablo A.1 (Devam)

24M05	<i>E. durans</i>	<p>GTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGCC GAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGG AAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAG GCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA GGTAACGGCTCACCAAGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC ACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT TTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTT ATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCA TTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGC GGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT CTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAAATAATA CCCTGGT</p>
24M07	<i>E. faecium</i>	<p>CGTGCCTATACATGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGG AAAAAGAAGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGA AGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCAT GGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCA TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTG AGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCG GTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG ATGAGAGTAACTGTTTATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT CAACCGGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT GGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGC GAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA A</p>
1M09	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<p>TGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGT AACGCGTGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGAAACGAATGCTA ATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCAT CACTCAAAGATGATCCCGCTTGTATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAAGGCTCACC AAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAG ACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAAC TCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAAGCTCATCAAGTGACGGTA ACTACCCAGAAAGGGACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGG TCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTTATAA GTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGAAAAGTGGTAGAC TTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA</p>

Tablo A.1 (Devam)

24M08	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<p>CAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTG AGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGGAAACGAATGC TAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAAGATGCAATTGCAT CACTCAAAGATGATCCCGCTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAA GGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACA CGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAG TCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTT GGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCC AGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTCCCGAGC GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGT AAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGTGCAG GAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA CACCGGTGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACTGACTGAGGCTCGAAAAGCG TGGGGAGCAAAC</p>
8M13	<i>S.macedonicu</i> <i>s</i>	<p>GACGCTGAAGACTTTAGCTTGCTAGAGTTGGAAGAGTTGCGAACGGGTGAGTAAC GCGTAGGTAACCTGCCTATTAGCGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATAC CGCATAATAGTGTAAACACATGTTAGAGACTTAAAAGATGCAATTGCATCACTAG TAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGAC GATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGAC CGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAG AGAAGAACGTGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACAGTGCAGGTAACCTACCAGAAA GGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTCCCGAGCGTTGT CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAAATAGTCTGAAGTAAAAG GCAGTGGCTTAACCATTGTTCCGCTTTGGAACTGTTAAACTTGAGTGCAGAAGGGG AGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGG TGCGGAAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGA GCAAACAGGTAGAA</p>
5T08	<i>Lb. helveticus</i>	<p>GGCGCGTGCTATACTGCAGTCGTACGTTCTTTTTCCACCGAGCTTGCTCCACC GGAAAAAGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAG AAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAAACCGCAT GGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAT TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAG AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT GAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAG TAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG CGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAG GGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT GGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAACAT</p>
3T17	<i>E. durans</i>	<p>TATACTGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGAGCTTGCTCCACCGAAAAAGAA GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATCAGAAGGGGATAAC ACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTG AAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT GAGGTAACGGCTACCAAGGCTACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC CACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT CGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATC CCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGT GACGCTGAGGCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAC</p>

Tablo A.1 (Devam)

47M07	<i>Lb. plantarum</i>	<p>TGCCTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGAT TTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGA AGCGGGGATAACACCTGAAAACAGATGCTAATACCGCATAAACACTTGGACCG CATGGTCCGAGTTTGAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGC GTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGAC CTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGG AGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACAT ATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG CTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA GTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTG CGAAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAG CAAACA</p>
42M19	<i>Lb. casei</i>	<p>TGCCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGA TTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTT AAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCG GCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGGCCG AACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACG GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAAT GGTCGGCAGAGTAACTGTTGTGCGGCGTGACGGTATCCAACCGAAGGCCACGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATT TATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG GCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAC AGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGT GGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTA GCGACA</p>
50M08	<i>E. faecium</i>	<p>CTATACATGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAA GAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGG ATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTT TGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGC AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCGCGTGAGT GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGAGTGAAGA GTAACGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTA AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGG GGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTC CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC GGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG TA</p>
42M07	<i>Lb. casei</i>	<p>TATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCA ACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGT GGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCAT GGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGGT ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACT GAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG TGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAACCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTTCG GCAGAGTAACTGTTGTGCGGCGTGACGGTATCCAACCGAAGGCCACGGTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTT AACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG GAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG AAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGA CAG</p>

Tablo A.1 (Devam)

42M11	<i>Lb. casei</i>	CGCGTGCCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGA GATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCT TAAGTGGGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGC GTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACT GAGAGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTG AGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGCA GAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTA AA
49M03	<i>Lb. casei</i>	CGTGCCTATACTGCAGTCGAACGAGGTCTCGTGATGTCCGGTGCTTGCCCGAGATTC ACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTACCACGTGGGTAACTGCCCTTAGGTG GGGGATAACATTTGAAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCAGTGG TTCTTGGCTGATAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGTATTA GCTAATTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTACCCGAACTGAGAG GTTGATCGGCCACATTGAGACTGACACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGA AGAATGCTTTCGGGTCGAAAACTCTGGTGTGGAGAAGAAATGGTCGGCAGAGTA ACTGTTGTCCGGTGACGGTATCCAACCACAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGTAATACGCAGGTGTATAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTATAGCGA GCGCAGGCGGATTTTAAAGGCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCT GCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAC AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTA TATGGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGTGAAGGCGACTGTCTG GGTCTGTA ACTGACGCTGACGCTCGAATATTGGGGCCATCGAACAGGTGAAAAA
47M09	<i>Lb. pentosus</i>	GCTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTA CATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCG GGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCCGATGG TCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTA GCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGA AGAAGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTA ACTGTTACGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG AGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTG CATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGG TCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGATAGAATATAAC CCTGGG
47M01	<i>Lb. plantarum</i>	TACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGG ATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCCGATGGTCCG AGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTA GATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTA ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAA GGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGT TCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATC GGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGT AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAG

Tablo A.1 (Devam)

42M13	<i>Lb. casei</i>	<p>TGCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATT CAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGT GGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGG TTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGGCTATTAG CTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTT GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG GCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTG TCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAAC TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACG CTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGACAGCAA</p>
42M15	<i>Lb. casei</i>	<p>CTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAA CATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGG GGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCT TGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGGCTATTAGCTAG TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA ATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCT TTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG GCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAGACTGG GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTG AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATAGAAATTAACCCTG</p>
50T09	<i>Lb. rhamnosus</i>	<p>ATACATGCAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGTGCTTGCATCTTGATTTAATTT TGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGA TAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGG CTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGGCTATTAAGTATTG GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGG CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC GGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCG TGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTT TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAACTGGGA AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAG GCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATAGATATATCCCTGGG</p>
46T02	<i>E. faecium</i>	<p>AGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAAGAAGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGAAACA GGTGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGTTTC GGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC ACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGA GACACGGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCG TTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCA GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCGAGCAGCCGCGGTAACGTAGGTGGCAAGCGT TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA AGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGAAGAAG AGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG AGCAAACAGGATTAGAATAACCCTGGTA</p>

Tablo A.1 (Devam)

46T20	<i>E. faecium</i>	CGCGTGCTATACATGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAA AAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGA TAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGAT TTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTC GGATCGTAAAACCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCT TGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTT TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGA GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
46T04	<i>E. faecium</i>	TGCTATACTGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGA AGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAC ACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGA AAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA GGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCG GCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGAT CGTAAAACCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGAC GGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAA GTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACT TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGCA
45T20	<i>E. faecium</i>	GCCTATACTGCAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAG AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAA CACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTG AAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA TCGTAAAACCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTA AGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAGAAATACCCTGGGTA
46T06	<i>E. faecium</i>	GCTATACATGGCAGTCGACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAG AAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAA CACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTG AAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA TCGTAAAACCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGA CGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTA AGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGTAAAAAAAACACCCCTGGTATA

Tablo A.1 (Devam)

50T07	<i>P.acidilactici</i>	<p>TGCTATACTGCAGTCGACGAACTCCGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCACTGAA TGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG CCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAA AACCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGC GGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCG ACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGG GTGAGAGTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGG GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAGCCTTCGGCTCAACC GAAGAAGTGCATTGGAGCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCC ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGACAG</p>
-------	-----------------------	--