

## Laktik Asit Bakterilerinde Otoliz ve Peynir Teknolojisindeki Önemi

Ömer Şimşek<sup>1</sup>, Oğuz Gürsoy<sup>2</sup>, Selime Hazır Dalca<sup>1</sup>, Yusuf Yılmaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli

<sup>2</sup>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş Tarihi (Received): 12.04.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 21.06.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ogursoy@mehmetakif.edu.tr (O. Gürsoy)

☎ 0 248 213 27 23 📠 0 248 213 27 04

### ÖZ

Laktik asit bakterileri (LAB) peynir teknolojisinde olgunlaşma için önemli olan proteoliz, lipoliz ve glikoliz gibi biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesinde kritik bir öneme sahiptir. Tüm bakterilerde olduğu gibi LAB'ler de sahip oldukları peptidoglikan hidrolaz enzimleri ile çeşitli koşullarda hücresel bütünlüklerini kaybederek otolize uğramaktadır. Otoliz sonucunda LAB'lerin hücresel enzimleri açığa çıkmakta ve peynir matriksine salıverilmektedir. Peynir ile ilgili mikroorganizmaların (starter ve starter olmayan mikroflora) olgunlaşmanın ilk evrelerinde erken otolizi hücre içi mikrobiyal enzimleri substratlarıyla daha kısa sürede buluşturmada ve bu olay peynirde lezzet bileşiklerinin oluşumunu hızlandırabilmektedir. Dolayısıyla, otoliz peynirlerin olgunlaşma süresini kısaltabilmektedir. Otoliz olgunlaşmayı hızlandırmasının yanı sıra peynir lezzeti üzerine olumlu etkilere de sahiptir. Bu derlemede, LAB'lerde otolizin mekanizması, özellikleri, peynir teknolojisindeki önemi ve peynirlerde starter otolizinin belirlenmesi ile ilgili bilgiler sunulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Laktik asit bakterileri, Otoliz, Peynir teknolojisi, Starter kültür

### Autolysis in Lactic Acid Bacteria and Its Importance in Cheese Technology

#### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are critically important in cheese technology because of their role in biochemical reactions such as proteolysis, lipolysis and glycolysis during ripening. Like all bacteria, LAB have been also autolyzed by losing their cellular integrity by their own peptidoglycan hydrolase enzymes. As a result of autolysis, cellular enzymes of LAB are released into the cheese matrix. Intracellular microbial enzymes reach to their substrates in a shorter time period because of the early autolysis of cheese related microorganisms (starter and non-starter microflora) in the beginning stages of a ripening period. Autolysis may accelerate the formation of flavor compounds; therefore, it can shorten the ripening period of cheese production. In addition to accelerating cheese ripening, autolysis has a positive effect on cheese flavor. In this review, the mechanism and properties of autolysis in LAB, its importance in cheese making technology and the determination of starter autolysis in cheeses are presented.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Autolysis, Cheese technology, Starter culture

#### GİRİŞ

Fermente gıdaların mikroflorasının temel üyesi olan LAB'ler düşük Guanin+Sitozin (G+C) oranına sahip, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, sporsuz ve asit toleran olan türleri içeren heterojen bir gruptur. Karbonhidratları

heterofermentatif veya homofermentatif yolla laktik aside indirgerler. Heterofermentatif türleri yan ürün olarak asetik asit, formik asit, etanol ve karbondioksit oluşturabilmektedir. Bu familya içerisinde *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

*Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olmak üzere 12 cins bulunmaktadır. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* cinsi üyeleri, fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır [1].

LAB'lerin 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 gıdalarda arzulanan fonksiyonel nitelikler de sağlanabilmektedir [1, 2]. Bunun örneklerinden birisi peynirin olgunlaştırılması sürecinde starter ve/veya starter olmayan LAB'lerin otoliz olarak peynirde olgunlaşmayı hızlandırması ve arzulanan tat aromanın sağlanmasına katkıda bulunmasıdır [3, 4]. Bu olayda LAB'lerin otolizi sonucunda ortama salıverilen hücre içi peptidazlar peptitleri daha küçük molekül ağırlığındaki peptitlere ve serbest amino asitlere kadar parçalamaktadır. Böylece uçucu aroma bileşiklerinin oluşumunda ön bileşik olan aromatik, dallanmış zincirli ve sülfür içeren amino asitler açığa çıkarılmaktadır [5, 6].

Otoliz, bakteri hücreleri içinde bulunan ve otolisinler olarak isimlendirilen 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 sistemi hücre popülasyonu içerisinde zayıflamış veya bozulmuş hücrelerin elimine edilmesini de sağlamaktadır [7, 8]. Bir bakteri hücresinde aynı anda farklı özgülüğe ve/veya yapıya sahip peptidoglikan hidrolazları bulunabilmekte ve bu durumda ilgili hidrolazlar kompleks bir enzimatik sistem meydana getirmektedirler [9, 10].

Bu derlemede, LAB'lerin otoliz davranışları, mekanizması ve özellikleri tartışılmış ve starter kültür otolizinin peynir teknolojisi açısından önemi vurgulanmıştır.

## LAB'LERDE OTOLİZ

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 hücreye elastik özellik kazandırır. Söz konusu 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 (parçalanması) ile sonuçlanır. Bakteri hücre duvarında bulunan ve otolisin olarak isimlendirilen enzimler tarafından peptidoglikan tabakanın hidrolizi ile hücre bütünlüğünün bozulması bakteriyel otoliz olarak tanımlanmaktadır [7, 8].

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 ortaktır. Şekil 1'de verildiği gibi peptidoglikan tabaka *N*-asetilmuramik asit (NAM), *N*-asetilglukozamin (NAG) olmak üzere iki tip şeker türevi ve az sayıda özgül amino asit içermektedir. Bu amino asitler, L-alanin, D-glutamik asit, diaminopimelik asit (DIP) ve D-alanindir. Gram-pozitif bakterilerde DIP yerine L-lizin veya başka bir L-formu amino asit olabilir. NAM ve NAG birbirine  $\beta(1-4)$  glikozidik bağı ile bağlıdır. Tetrapeptidler NAM'ye 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 amino asit D-glutamik asit, üçüncü DIP ve dördüncüsü ise D-alanindir. Daha önce de vurguladığı gibi en değişken olan üçüncü amino asit DIP olup Gram-pozitif bakterilerde bu amino asit aynen kalabildiği gibi yerine L-lizin veya diğer L formu diğer amino asitler gelebilir. Gram-negatif bakterilerde lipoprotein tabaka DIP'e bağlanır. DIP sadece prokaryotik hücre duvarında bulunur. Glikan zincirini oluşturan glikozit bağlar çok güçlü bağlar olmasına karşılık çapraz bağlar ile bu yapı yeterli güçlülüğe kavuşabilir. Yapının dayanıklılığını esas olarak veren esnek çapraz bağlardır [11].

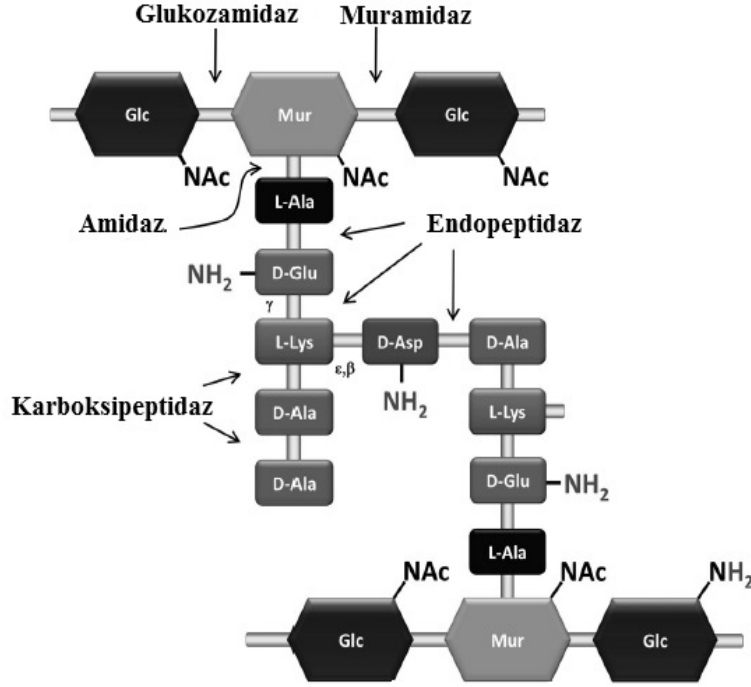
LAB'lerin peptit yapısında amino asitler L-alanin- $\gamma$ -D-glutamik asit-X-D-alanin olarak sıralanır. Üçüncü amino asit genellikle L-lizindir (örneğin *Lc. lactis* ve birçok laktobasilde). Fakat bazen bu amino asit mezo-diaminopimelik asit (mDAP) veya L-ornitin olabilmektedir. LAB'lerin hücre duvar yapısında bulunan peptidin 4. pozisyonunda hep D-alanin amino asidi bulunur. İki peptidoglikan arasında çapraz bağlanma peptit yapıların 1. ve 4. pozisyonundaki amino asitler arasında gerçekleşir. Bu peptit bağı, 3. pozisyonda mDAP bulunan *Lb. plantarum* gibi laktik suşlarda doğrudan kurulurken, bu pozisyonda lizin aminoasidini içeren *Lc. lactis* ve *Lb. casei* suşlarında birkaç D- veya L- amino asitlik köprü ile bağlanma sağlanır [10].

Otolisinler bakterilerin bölünme süreçlerinde veya stres koşullarında aktivite gösteren hücre içi peptidoglikan hidrolazlardır. Bugüne kadar farklı bağlar için hidrolitik özgülülüğüne göre farklı peptidoglikan hidrolaz enzimleri tanımlanmıştır. Bunlardan en sık rastlanılan peptidoglikan hidrolazlar; i) *N*-asetil muramik asit ve *N*-asetil glukozamin arasındaki  $\beta(1-4)$  bağına hidroliz eden *N*-asetilmuramidazlar, ii) *N*-asetil glukozamin ve *N*-asetil muramik asit arasındaki  $\beta(1-4)$  bağına hidroliz eden *N*-asetilglukozaminidazlar, iii) *N*-asetil muramik asit ile laktik grup arasındaki bağı hidroliz ederek L-alanin amino asidinin açığa çıkmasını sağlayan *N*-asetilmuramik-L-alanin amidazlar ve iv) peptidoglikan bağlarını hidroliz eden endopeptidaz ve karboksipeptidazları içeren peptidazlardır [11] (Şekil 1).

Bakteriyel peptidoglikan hidrolazlar modüler organizasyona ve hücre duvarına bağlanma domaini ile ilişkili katalitik bölgeye sahiptir. Katalitik bölge peptidoglikan tabaka için hidrolitik özgülülüğü tayin eder.

Çünkü bu fonksiyonel bölge hücre duvarı bileşenini tanıır, 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 [7, 8].



Şekil 1. Bakteri hücrelerinde bulunan peptidoglikan yapısı ve bu yapıyı hidroliz eden hidrolaz enzimleri ile spesifik kesim bölgeleri [10].

Genom sekans analizleri bakteride peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin 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'lerde 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 enzimi tespit edilmiştir [9] (Tablo 1).

Tablo 1. LAB peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin temel karakteristikleri [21].

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
Mur1	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

\*: Molekül ağırlığı, \*\*: İzoelektrik nokta

LAB'lerde ilk tespit edilen peptidoglikan hidrolaz, *Lc. lactis*'te AcmA'dır [12]. 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 [13]. LysM deseni peptidoglikan yapıya bağlanmadan sorumludur ve AcmA'nın bölünme düzlemine yerleşmesini sağlar [14]. *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 [8]. Bunların dışında  $\gamma$ -D-Glu-L-Lys endopeptidaz aktivitesi gösteren MspI ve Lc-p75 enzimleri sırasıyla *Lb. rhamnosus* [15] ve *Lb. casei* [16] suşlarında tespit edilmiştir. *S. thermophilus*ta bulunan Cse peptidoglikan hidrolaz enzimi CHAP bölgesini içermekte ve DL endopeptidaz aktivitesi ile peptidoglikan çapraz bağları arasında kesimler yapmaktadır [17]. *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  $\gamma$ -D-Glu-L-Lys-endopeptidazı (YjgB) bulunur [18].

Yukarıda sunulan LAB'lere ait peptidoglikan hidrolaz örnekleri temel otolisinlerdir. Bu enzimler özellikle kardeş hücre bölünmesinin tamamlanmasını sağlamaktadır. Herhangi bir bakteriyel hücrede bu enzimleri kodlayan genlerin inaktivasyonu kardeş hücre bölünmesinde kusura ve uzun zincir oluşumuna neden olmaktadır [19]. Rolüyle ilişkili olarak, bu enzimler hücre septumunda yer alır. Bölünmedeki rolünün yanında AcmA ve Acm2 enzimleri hasar görmüş bakteri hücrelerinin durağan faz ya da tampon içindeki otolizini de gerçekleştirmektedir [10, 20, 21].

Bakteriyel otolizi gerçekleştiren peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin regülasyonu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede gerçekleştirilmektedir. Post-translasyonel seviyedeki regülasyonlardan birisi, peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin aktivitesinin proteolitik parçalanma ile kontrol edilmesidir. *Lc. lactis*'te

temel otolisin olan AcmA'nın hücre dışı proteaz PrtP tarafından parçalandığı, *Lc. lactis* MG1363'te plazmid kodlu PrtPI ve PrtPIII enzimlerinin otoliz ile ilişkisinin tespiti ile anlaşılmıştır [12]. Aynı zamanda hücre için zorunlu olan HtrA proteazının da AcmA otolisini parçaladığı gösterilmiştir [22]. 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 bir çalışmada AcmA'nın LysM bölgelerinin peptidoglikan tabakaya bağlanmasının, ikincil polisakkarit yapıları tarafından maskelenerek engellendiği ortaya çıkmıştır [14].

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 [23].

## LAB'LERDE OTOLİZ ÜZERİNE ETKİLİ FAKTÖRLER

Bakteriler hücre duvarı kompozisyonuna, otolizi teşvik eden koşulların bulunmasına ve genom yapısındaki hatalara bağlı olarak farklı otolitik aktivite gösterebilirler [21]. Bunların dışında bölünme sırasında peptidoglikan yapısında oluşan farklılıklar aynı tür bakterilerin otoliz davranışlarını değiştirebilir [23]. LAB'lerde otolizi ise genetik yapının çeşitliliği, karbon kaynağı, sıcaklık, ozmotik konsantrasyon, büyüme fazı, tuz konsantrasyonu ve pH gibi faktörlerin etkilediği rapor edilmiştir. Tablo 2'de bazı LAB'lerin otoliz oranları ve ilişkili otoliz koşulları verilmiştir.

Tablo 2. Otolitik aktiviteye sahip bazı LAB'ler, otoliz koşulları ve oranları

LAB İzolatı	Otoliz Koşulu	Otoliz (%)	Kaynak
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Sodyum fosfat tamponu, (0.1M, pH: 5.2, %2 NaCl), 30°C,	75	[25]
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	48 saat inkübasyon	55	
<i>Lb. plantarum</i>		45	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		51	
<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 saat inkübasyon	41	[29]
	0.17M NaCl, pH: 7.0, 30°C, 24 saat inkübasyon	55	
	0.51M NaCl, pH: 5.4, 30°C, 24 saat inkübasyon	39	
	0.51M NaCl, pH: 7.0, 30°C, 24 saat inkübasyon	64	
<i>Lc. lactis</i> HMM81	Sitrat tamponu (0.50M, pH: 5.0, %1.5 NaCl), 13°C, 13 gün inkübasyon	48	[26]
<i>Lb. pentosus</i> 1091	Potasyum fosfat tamponu (0.50M, pH: 6.5), 30°C, 24 saat inkübasyon	94	[27]
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 12046	Sodyum fosfat tamponu (0.1M, pH: 7.0), 45°C, 24 saat inkübasyon	45	[30]
	Tris/HCl tamponu (0.1M, pH: 7.5), 45°C, 24 saat	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	[31]
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> INF-L4	Potasyum fosfat tamponu (0.05M, pH:7.0), 30°C, 8 saat inkübasyon	65	
<i>Lb. acidophilus</i>	Sodyum sitrat tamponu (0.025M, pH: 6.0), 37°C, 24 saat inkübasyon	32	[32]
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Potasyum fosfat tamponu (0.1M, pH:6.7), 32°C, 24 saat inkübasyon	65	[33]

Bie ve Sjöström [24], LAB'lerin otolitik özelliklerini etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla sıcaklık, pH ve iyonların etkisi üzerine araştırmalar yürütmüştür. Çalışmada LAB'lerin 19°C'de maksimum, 14°C'de ise minimum otoliz aktivitesine sahip olduğunu ve pH'nın 4.9'dan 5.9'a çıktığında da otoliz oranında artış görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca ortamdaki Mg<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> iyonlarının otolizi yavaşlattığı, Na<sup>+</sup> iyonlarının ise teşvik ettiği saptanmıştır. Çıbık ve Chapot-Chartier [27], 9 farklı *Lb. pentosus* suşunun otolitik aktivitesini araştırdıkları çalışmada, söz konusu suşları MRS ortamında geliştirdikten sonra tampon ortamına (potasyum fosfat, 50 mM, pH 6.5) transfer etmiştir. 24 saat inkübasyon sonucunda tampon ortamında suşların otoliz oranlarının %34 ile %94 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmanın devamında renatüre SDS-PAGE yöntemi ile suşların peptidoglikan hidrolaz profili izlenmiş ve en yüksek otolitik aktivite gösteren *Lb. pentosus* 1091 suşunda boyutları 58 ve 112 kDa olan iki farklı peptidoglikan hidrolaz enziminin bulunduğu tanımlanmıştır. Çalışmanın sonucunda *Lb. pentosus* suşlarında otoliz özelliklerinin suşa bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve en az iki otolisin enziminin bulunduğu değerlendirilmiştir. Kozáková ve ark. [28] ise *Lc. lactis* HMM81 ve *Lc. lactis* NIZO B643 suşlarının otolizi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 13, 30, 45 ve 56°C sıcaklıklarda 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 başka 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 [39].

Starter LAB'lerinin otolizi birçok araştırma grubu tarafından çalışma koşullarının çok iyi kontrol edilebildiği, yukarıda bazıları açıklanan tampon sistemlerde çalışılmıştır. Her ne kadar bu çalışmalar otoliz davranışlarının anlaşılması için değerli veriler sağlasa da tampon sistem koşullarının dezavantajı, peynir üretimi sırasındaki stres koşulları ile olgunlaşma süresince değişen kompleks peynir matriksi koşullarını tam olarak sağlayamamasıdır [42]. Laktik asit bakterilerinin peynir ortamındaki otolitik davranışlarının incelendiği bir çalışmada Dako ve ark. [25], 4 laktobasil, 4 laktokok ve 1 pediokokun peynir ortamındaki otolizini araştırdığı çalışmada, pH'sı 5.2 olan 0.1-0.2 M ve %2 NaCl/sodyum fosfat tamponunda 30°C'de 48 saat inkübasyon uygulaması ve laktobasil suşlarının otolizinin laktokok ve pediokoklara oranla yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca fosfat konsantrasyonundaki artışla birlikte otoliz oranlarında da artış rapor edilmiştir.

Peynirdeki tuz konsantrasyonunun starter kültürlerin otolizi üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada farklı konsantrasyonlarda tuz içeren [%<0.15, %1.2 ve %1.8 (ağırlık/ağırlık, w/w)] Samsøe peynirinde tuz konsantrasyonu ile starter otolizi arasında ters yönlü bir

ilişki olduğu belirlenmiştir [48]. Bu bulgu ile çelişkili olarak, Rulikowska ve ark. [49] tarafından yapılan bir çalışmada Cheddar peynirinde otolizin artan tuz konsantrasyonu ile arttığı rapor edilmiştir. Otolitik aktivitenin artan tuz konsantrasyonu ile arttığını [50] veya azaldığını [51] gösteren başka çelişkili sonuçlar da mevcut olup, söz konusu farklılıklar temelde ilgili çalışmalarda kullanılan starter kültürlerin (tür ve suş bazında), peynir tipinin, peynir kompozisyonunun ve kullanılan metotların farklılıklarına bağlanmaktadır [48, 49]. Otolitik aktivitenin suşa bağlı olduğunun gösterildiği bir başka çalışmada Boutrou ve ark. [26], 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 aktivite olarak 3 gruba ayırmıştır.

## LAB OTOLİZİNİN PEYNİR TEKNOLOJİSİNDEKİ ÖNEMİ

Peynir olgunlaşması proteoliz, lipoliz ve glikolizi de içeren çok sayıda ve kompleks biyokimyasal reaksiyonları kapsamakta ve söz konusu biyokimyasal reaksiyonlar peynirlere farklı lezzet karakteristikleri kazandırmaktadır. Olgunlaşma sırasında proteoliz peynir pıhtısında bulunan rennet ve plazmin, lipoliz ise lipazlar ve esterazların aktiviteleri ile gerçekleşmektedir. Starter olmayan LAB'ler ile peynir üretiminde kullanılan starter kültürlerin enzimleri yukarıda bahsedilen her üç biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır [56].

Peynir pıhtısında bulunan kazeinlerin rennet ve sütte doğal olarak bulunan plazmin vasıtasıyla hidrolize edilmesiyle peynir üretimi ve olgunlaşması sırasında büyük ve orta büyüklükteki peptitler oluşmaktadır. Bu peptitler starter LAB'lerin peptidazları ile daha ileri seviyede parçalanarak küçük molekül ağırlığındaki peptitler ve serbest amino asitler açığa çıkmaktadır. Farklı enzimatik yollarla serbest amino asitlerin katabolize edilmesi ile çok sayıda uçucu aroma bileşiği meydana gelmektedir [21]. Peynir lezzeti üzerine etkili söz konusu bileşiklerin önemli bir bölümü starter bakterilerin ve/veya destek kültürlerin etkileriyle oluşmaktadır. Peynir olgunlaşmasında önemli olan süt proteinleri (kazeinler), süt yağı ve laktoz üzerinden olan biyokimyasal dönüşümler Tablo 3'te gösterilmektedir [53]. Starter bakterilerin ve/veya destek kültürlerin erken lizisi, hücre içi enzimlerin söz konusu substratlara (Tablo 3) daha kolay ulaşmasını sağlamakta ve bu durum peynir lezzetinin gelişimini hızlandırabilmektedir [4-6]. Olgunlaşma süresince starter bakterilerin lizisini arttırmak için kullanılan yaklaşımlar; (i) otolitik starter bakterilerin seçimi, (ii) litik bakteriyofajların kullanımı ve (iii) üretimde bakteriyosin üreten destek kültürlerin kullanımı yöntemlerini içermektedir [34].

Tablo 3. Peynir olgunlaşmasında kazein, süt yağı ve laktozla ilgili önemli biyokimyasal dönüşümler [53]

Kazein	Süt Yağı	Laktoz
Peptitler	Yağ asitleri	Laktat
Amino asitler	Ketoasitler	Pirüvat
Asetik asit	Metil ketonlar	CO <sub>2</sub>
Amonyak	Laktonlar	Diasetil
Pirüvat		Asetoin
Aldehitler		2,3-Bütandiol
Alkoller		Asetaldehit
Karboksilik asitler		Asetik asit
Sülfür bileşikler		Etanol

Starter bakterilerin peynir matrisi içerisindeki otoliz davranışları, üretimde kullanılan starter bakterilerin tür ve suş farklılıkları ile peynir üretim koşullarından (pıhtının haşlanması, tuzlama ve tuzlama tekniği, son ürünün tuz konsantrasyonu) etkilenmektedir. Yine peynir üretiminde kullanılacak LAB otolitik aktivitelerinin belirli bir seviyede olmasının yanında peynir olgunlaşmasına katkı sağlayacak proteolitik ve/veya lipolitik enzim sistemlerine sahip olması gerekmektedir [42].

LAB'lerin bazı otolitik suşları peynir teknolojisinde olgunlaşmayı hızlandırmak ve lezzet gelişimini arttırmak amacıyla kullanılabilir [3, 5, 20, 40]. Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada [43], endüstriyel koşullarda üretilen ve 13 ay süre ile olgunlaştırılan Grana Padano peynirinin üretiminde kullanılan starter (*Lb. helveticus* ve *Lb. delbrueckii*) ve starter olmayan LAB'lerin (*Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* ve *P. acidilactici*) olgunlaşma süresince çoğalmaları ve otolizlerinin peynir olgunlaşması ve peynirde uçucu aroma bileşiklerinin oluşumu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda starter LAB'lerin özellikle salamurada tuzlama işlemi sonrasındaki otolizinin peynirde aroma oluşumundan sorumlu olduğu ve starter lizisinin özellikle olgunlaşmanın ilk iki ayı içerisinde görüldüğü belirlenmiştir. Bourdat-Deschamps ve ark. [46] otolitik *Lc. lactis* AM2 suşunun peynir modelinde, amino asitlerin aroma bileşiklerine dönüşümünde ilk basamak olan, aromatik amino asitlerin deaminasyonunu stimüle ettiğini belirlemişlerdir. Fenilalaninin katabolizmasında hücre lizisinin pozitif etkisi hem tampon sisteminde hem de peynir modelinde tespit edilmiştir. Araştırmacılar transaminasyon reaksiyonlarının otoliz ile stimüle olmasını, otolizler tarafından hücre duvarının hasara uğratılması ve bu nedenle aminotransferazların amino asitlere daha kolay ulaşmasına bağlamışlardır. Bozouidi ve ark. [44] tarafından yapılan bir çalışmada Yunanistan'da 3 farklı dağlık bölgede geleneksel olarak üretilen Feta peynirlerinin mikrofloralarından izole edilen LAB'lerin asit üretimi, proteolitik ve otolitik aktiviteleri ile inhibitör özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmada bütün peynirlerde mikrofloranın çoğunlukla laktokoklardan oluştuğu ve 1. ve 3. bölgelerden izole edilen izolatların 2. bölgeden elde edilen izolatlarla kıyasla daha yüksek otolitik ve proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Araştırmacılar yüksek otolitik aktiviteye bağlı olarak süt bileşenlerinin (özellikle proteinler) hızlı degradasyonunun sonucu olarak 1. ve 3. bölgede üretilen peynirlerin daha hızlı olgunlaştığı sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde Law [38], çoğu sert peynirin arzulan aromayı kazanabilmesinin ancak

ortalama 1-2 yıl olgunlaşma süresi ile olduğunu, bu sürenin kısaltılabilmesi için Cheddar peynirinin üretiminde otolitik aktiviteye sahip starter kültür kullanılmasının aroma ve kalitede olumlu sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Yine El Soda [39], Cheddar peynirinde *Lb. casei*'nin düşük ve yüksek otolitik aktiviteye sahip suşlarının aminopeptidaz aktivitesine etkisini gözlemlemiş, yüksek otolitik aktiviteye sahip suşun 2 günde geldiği olgunlaştırma seviyesine, düşük otolitik aktiviteye sahip suşun 1 hafta sonra geldiğini belirtmiştir.

Yapılan çalışmalarda yüksek otolitik suşların peynir üretiminde kullanımının peynirde proteolizi hızlandırdığı ve dolayısıyla peynir matrisinde bulunan serbest amino asit konsantrasyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir [35-37, 41, 52]. Kenny ve ark. [20] Cheddar peyniri üretiminde destek kültür olarak kullanılan *Lb. helveticus* suşlarının (DPC 4571 ve 5364) otolizinin olgunlaşma süresince peynirde proteoliz göstergesi olan serbest amino asit konsantrasyonunu kontrol peynirine kıyasla önemli derecede arttırdığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Wilkinson ve ark. [47] Cheddar peynirinin olgunlaşması sırasında *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 suşunun lizinin peynirde serbest amino asit konsantrasyonunu önemli düzeyde arttırdığını tespit etmiştir. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 suşunun otolizinin Cheddar peynirinde proteolize olan katkısı O'Donovan ve ark. [54] tarafından da belirlenmiştir.

LAB'lerin peynir üretimi ve olgunlaşması süresince lizisi peynirlerde olgunlaşmada önemli biyokimyasal reaksiyonlardan sadece proteolizi değil lipolizi de arttırmaktadır. Collins ve ark. [45] *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* HP suşlarını kullanarak ürettikleri Cheddar peynirlerinde 238 gün olgunlaşma periyodu boyunca ilgili bakterilerin lizisini ve peynirlerdeki lipolizi incelemişlerdir. AM2 suşunun peynirde canlı kalma süresinin HP suşuna göre daha kısa olduğu ve peynirden hidrolik presle elde edilen peynir suyunda otoliz için hücre içi işaret enzimi olan laktat dehidrogenaz (E.C. 1.1.1.27) enziminin seviyesinin AM2 suşundan üretilen peynirde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada AM2 suşu ile üretilen peynirlerde serbest bireysel yağ asitlerinden kaprik (C<sub>8:0</sub>), miristik (C<sub>14:0</sub>), palmitik (C<sub>16:0</sub>) ve stearik (C<sub>18:0</sub>) asit miktarlarının HP suşu ile üretilen peynirlere göre daha fazla olduğu (p<0.05) tespit edilmiştir. Çalışma sonunda araştırmacılar Cheddar peyniri olgunlaşması sırasında görülen starter kültür lizisi ile peynirin lipoliz seviyesi arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu sonucuna varmışlardır.

Peynirlerde acılık, starter otolizi, starterlerin neden olduğu proteoliz, rennet ve süt proteinazlarının konsantrasyonlarının yanı sıra üretim koşulları ile de etkilenmektedir. Basit bir ifadeyle, peynirlerde acı tat proteinaz ve endopeptidaz faaliyetleri ile acı peptidlerin üretimi ve bunların ekzopeptidaz aktivitesiyle (serbest amino asitlerin ve acı olmayan bazı küçük peptitlerin oluşumu) ortadan kaldırılması arasındaki dengedeki bozukluk ile ilişkilidir. Bu nedenle, peynirde acı tat kontrolü otoliz ve buna bağlı olarak artan peptidolizden

etkilenebilmektedir. Yapılan çalışmalar, acı peynirler ile karşılaştırıldığında, acı olmayan peynirlerde starter otolizi ve buna bağlı serbest amino asit konsantrasyonlarının yüksek olduğunu göstermiştir [42]. Konu ile ilgili bir çalışmada Hannon ve ark. [3], Cheddar peynirinin olgunlaşmasının hızlandırılması için peynir üretiminde starter ve/veya destek kültür olarak yüksek otolitik özelliğe sahip termofilik karakterli *Lb. helveticus* DPC4571 suşunu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda araştırmacılar otolitik starter kültür kullanımının Cheddar peynirinde lezzet gelişimini hızlandığını ve kontrol peyniri ile kıyaslandığında peynirdeki acılığı azaltarak duysal özellikleri iyileştirildiğini rapor etmişlerdir.

## PEYNİRLERDE STARTER OTOLİZİNİN BELİRLENMESİ

Peynirlerde starter otolizinin izlenmesi için (i) peynirdeki starter canlı hücre sayısındaki azalmanın takip edilmesi, (ii) elektron mikroskobu kullanılarak elde edilen gözlemler ve (iii) otoliz sonucunda hücre içinden peynir matriksine salıverilen enzimlerin belirlenmesi olmak üzere başlıca 3 yöntem kullanılmaktadır [42, 56]. Peynirdeki starter canlı hücre sayısındaki azalmanın takip edilmesi starter otolizinin izlenmesi için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olmasına rağmen kullanılan mikrobiyal sayım yöntemlerinde seçici besiyeri ya da seçici olarak starter sayısını gösteren yöntemler kullanılmadığı zaman yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir [42]. Elektron mikroskobu [42] veya taramalı elektron mikroskobu [21] çalışmaları ile otolizin belirlenmesi peynir matriksinde bulunan ve hücre duvarı tamamen (protoplast) veya kısmen (sferoplast) uzaklaştırılmış ancak ozmotik olarak korunmuş hücrelerin görüntülenmesi ile yapılmaktadır. Söz konusu hücreler normal ekim prosedürleri ile sayılamayan, canlı olmayan veya hücre hasarları restore edilemeyecek düzeyde olan ancak peynir matriksi içerisinde entegrasyonlarını sürdürebilen hücrelerdir [42]. Konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar hücre otolizinin her zaman hücrenin ölümüyle sonuçlanmadığını göstermiştir [55]. Peynirde otolizin belirlenmesinde kullanılan üçüncü yöntem, peynirden ekstrakte edilen peynir suyunda starterlerin hücre içi bileşenlerinin (enzimleri) analizine dayanmaktadır. Otolizin belirlenmesinde en yaygın kullanılan işaret (belirteç) enzimler laktat dehidrogenaz [20, 45, 47], glukoz-6-fosfat dehidrogenaz [47], post-prolin dipeptidil amino peptidaz (PepX) [47, 48] enzimleridir. Bunların dışında früktoz-1,6-bifosfat aldolaz, lisil-aminopeptidaz ve dipeptidaz enzimleri de hücre lizisinin belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır [21, 56]. Bu yöntemde en önemli aşama ilgili enzimlerin peynir matriksinden ekstrakte edilmesidir. Otolitik işaret enzimlerinin ekstraksiyon yöntemi ve/veya ekstraksiyonda kullanılan tampon çözeltilere dayanıklı (stabil) olması ve inaktif olmaması gerekmektedir. Peynirde otolizin belirlenmesi amacıyla kullanılan yukarıda açıklanan her bir yöntemin avantajlarının yanında dezavantajlarının bulunması nedeniyle bahsedilen yöntemlerin kombinasyon halinde kullanılması önerilmektedir [42].

## SONUÇ

Peynir teknolojisinde LAB'ler gerek starter olmayan mikroflora gerekse de starter kültür olarak rol oynamakta ve peynir olgunlaşması için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesine önemli katkılar sağlamaktadırlar. Starter kültür kullanımı ile temel starter özelliklerin yerine getirilmesinin yanında, üretim özellikleri ve koşullarına göre starter kültürlerin arzu edilen fonksiyonları da yerine getirmesi arzulanmaktadır. LAB'lerin otolizi sonucunda hücre içi enzimler peynir matriksi içerisine salıverilmekte ve bu sayede ilgili enzimler substratlarıyla (protein ve yağ gibi) daha kısa sürede buluşmaktadırlar. Enzimatik reaksiyonların daha kısa sürede gerçekleşmesi peynirde lezzet bileşiklerinin oluşumunu hızlandırabilmekte ve dolayısıyla olgunlaşma süresini kısaltabilmektedir. Otolizin peynirlerde acı tat gibi bazı lezzet kusurlarının önlenmesinde de önemli rol alabileceği tespit edilmiştir. Peynirlerde LAB'lerin otolizi farklı yöntemlerle izlenebilmesine rağmen ilgili yöntemlerin sahip oldukları bazı dezavantajları nedeniyle birlikte kullanılmaları önerilmektedir. Otolizin peynir teknolojisindeki önemi başta Cheddar peyniri olmak üzere yurt dışında üretilen bazı peynir çeşitlerinde detaylı olarak çalışılmasına karşın, ülkemizde bu konu ile yürütülen çalışmalar oldukça sınırlıdır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM-13/AR-GE/11 proje numarası ile desteklenmiştir. Bu yayındaki hiçbir görüş, tespit ve kanaat Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın resmi görüşü değildir.

## KAYNAKLAR

- [1] De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *J. Molecular Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- [2] Leroy, F., Verluysen, J., De Vuyst, L., 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 270–285.
- [3] Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A., Beresford, T.P., 2003. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 13: 313–323.
- [4] McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 127–144.
- [5] Valence, F., Deutsch, S.M., Richoux, R., Gagnaire, V., Lortal, L., 2000. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Dairy Res.* 67: 261–271.
- [6] Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259–274.
- [7] Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., Massidda, O., 1996. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins and autolysis. *Microb. Drug Resist.* 2: 95–98.

- [8] Crouigneau, A.A., Feuillat, M., Guilloux-Benatier, M., 2000. Influence of some factors on autolysis of *Oenococcus oeni*. *Vitis* 39:167-171.
- [9] Rolain, T., Bernard, E., Courtin, P., Bron, P.A., Kleerebezem, M., Chapot-Chartier, M.P., Hols, P., 2012. Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiol. Cell Fact.* 11: 137.
- [10] Chapot-Chartier, M., Kulakauskas, S., 2014. Cell wall structure and functions in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 13: 1-23.
- [11] Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çökmüş, C., (ed.), 11, Palme Yayıncılık.
- [12] Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K.I., Dabrowska, M., Venema, G., Haandrikman, A.I., 1995. 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.
- [13] Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K.J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A.L., Venema, G., Kuipers, O.P., Kok, J., 2003. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J. Biol. Chem.* 278: 23874-23881.
- [14] Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J., Kok, J., 2005. AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning". *FEBS J.* 272: 2854-2868.
- [15] Claes, I.J., Schoofs, G., Regulski, K., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.P., Rolain, T., 2012. Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS One* 7: 31588.
- [16] Regulski, K., Courtin, P., Meyrand, M., Claes, I.J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., 2012. Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactobacillus casei* and characterization of the major gamma-D-Glutamyl-L-Lysylendopeptidase. *PLoS One* 7: 32301.
- [17] Layec, S., Decaris, B., Leblond-Bourget, N., 2008. Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res. Microbiol.* 159: 507-515.
- [18] Redko, Y., Courtin, P., Mezange, C., Huard, C., Chapot-Chartier, M.P., 2007. *Lactococcus lactis* gene yjgB encodes a gamma-D-glutamyl-L-lysylendopeptidase which hydrolyzes peptidoglycan. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5825-5831.
- [19] El-Kholy, W., El-Soda, M., Ezzat, N., El Shafei, H., 1998. Autolysis and intracellular enzyme release from cheese related dairy lactobacilli. *Lait* 78: 439-452.
- [20] Kenny, O., FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K., 2006. Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 16: 797-804.
- [21] Lortal, S., Chapot-Chartier, M.P., 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy. J.* 15: 857-871.
- [22] Poquet, I., Saint, V., Seznec, E., Simoes, N., Bolotin, A., Gruss, A., 2000. HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* 35: 1042-1051.
- [23] Smith, T.J., Blackman, S.A., Foster, S.J., 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiol.* 146: 249-262.
- [24] Bie, R., Sjöström, G., 1975. Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part II- Experiments with fluid substrates and cheese. *Milchwissenschaft* 30: 739-747.
- [25] Dako, E., El-Soda, M., Vuilleumard, J.C., Simard, R.E., 1995. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 28: 503-509.
- [26] Boutrou, R., Sepulchre, A., Pitel, G., Durier, C., Vassal, L., Gripon, J.C., Monnet, V., 1998. Lactococcal lysis and curd proteolysis: two predictable events important for the development of cheese flavour. *Int. Dairy J.* 8: 609-616.
- [27] Çibik, R., Chapot-Chartier, P., 2004. Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 459-463.
- [28] Kozáková, D., Solich, K., Ondráčková I., Sviráková, E., Plocková, M., 2010. Effect of some environmental factors on autolysis of lactococci used for cheese production. *J. Food Nut. Res.* 49: 1-9.
- [29] Nunez, J.R., Medrano, R.R., Moorillon, G.V.N., Mendez, N.G., 2011. Effect of pH and salt gradient on the autolysis of *Lactococcus lactis* strains. *Brazil. J. Microbiol.* 42: 1495-1499.
- [30] Lortal, S., Rousseau, M., Boyaval, P., van Heijenoort, J., 1991. Cell wall and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. *J. Gen Microbiol.* 137:549-559.
- [31] Ostlie, H.M., Vegarud, G., Langsrud, T., 1995. Autolysis of lactococci: detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 3598-3603.
- [32] Higgins, M.L., Coyette, J., Shockman, G.D., 1973. Sites of cellular autolysis in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 116: 1375-1382.
- [33] Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29: 807-813.
- [34] Oumer, A., Gaya, P., Fernandez-Garsia, E., Mariaca, R., Gadre, S., Medina, M., Nunez, M., 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 68: 1117-1219.
- [35] Crow, V.L., Martley, F.G., Coolbear, T., Roundhill, S.J., 1995. The influence of phage assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML8 on Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 5: 451-472.



- [36] Lepeuple, A.S., Van Gemert, E., Chapot-Chartier, M.-P., 1998. 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.
- [37] Meijer, W., Dobbelaar, C., Hugenholtz, J., 1998. Thermo inducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: Implications for cheese ripening. *Int. Dairy J.* 8: 275-280.
- [38] Law, B.A., 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11: 383-398.
- [39] El Soda, M., 1993. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 239-252.
- [40] Deutsch, S.M., Neveu, A., Guezenc, S., Ritzenthaler, P., Lortal, S., 2003. Early lysis of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303 in Swiss cheese is not prophage-related. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 147-157.
- [41] Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P., 2007. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* 17: 316-327.
- [42] Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H., 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5: 855-875.
- [43] Lazzi, C., Povolo, M., Locci, F., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M., 2016. Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. *Int. J. Food. Microbiol.* 233: 20-28.
- [44] Bozoudi, D., Kotzamanidis, C., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Menexes, G., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2015. A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *Int. J. Food Microbiol.* 200: 87-96.
- [45] Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Res.* 70(1): 105-113.
- [46] Bourdat-Deschamps, M., Le Bars, D., Yvon, M., Chapot-Chartier, M.-P., 2004. Autolysis of *Lactobacillus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *Int. Dairy J.* 14: 791-800.
- [47] Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., O'Callaghan, D.M., Fox, P.F., 1994. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *J. Dairy Res.* 61(2): 249-262.
- [48] Sondergaard, L., Rysse, M., Svendsen, C., Hoier, E., Andersen, U., Hammershoj, M., Moller, J.R., Arneborg, N., Jespersen, L., 2015. Impact of NaCl reduction in Danish semi-hard Samsøe cheeses on proliferation and autolysis of DL-starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 213: 59-70.
- [49] Rulikowska, A., Kilcawley, K.N., Doolan, I.A., Alonso-Gomez, M., Nongonierma, A.B., Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., 2013. The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. *Int. Dairy J.* 28: 45-55.
- [50] Moller, K.K., Rattray, F.P., Bredie, W.L.P., Hoier, E., Ardö, Y., 2013. Physicochemical and sensory characterization of Cheddar cheese with variable NaCl levels and equal moisture content. *J. Dairy Sci.* 96: 1953-1971.
- [51] Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., Fox, P.F., 1994. Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 4: 141-160.
- [52] Crow, V.L., Coolbear, T., Holland, R., Pritchard, G.G., Martley, F.G., 1993. Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.* 3: 423-460.
- [53] Urbach, G., 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int. Dairy J.* 5: 877-903.
- [54] O'Donovan, C.M., Wilkinson, M.G., Guinee, T.M., Fox, P.F., 1996. An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 6: 1149-1165.
- [55] Krishna, B.M., Dutta, S.M., 1976. Studies on the autolytic changes in *S. cremoris* under starvation conditions. *Milchwissenschaft* 31: 741-744.
- [56] El Soda, M., Farkye, N., Vuilleumard, R.E., Simard, R.E., Olson, N.F., Kholy, W., Dako, E., Medrano, E., Gaber, M., Lim, L., 1995. Autolysis of lactic acid bacteria: impact on flavour development in cheese. In: Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence, G. Charalambous (Ed.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp: 2205-2223.