



## GELENEKSEL TEKNİKLERLE ÜRETİLEN YOĞURTLARDAN VE DOĞADAKİ BİTKİSEL ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN YOĞURT BAKTERİLERİNİN BAKTERİYOLİTİK AKTİVİTELERİ

Hakan TAVŞANLI\* Tülay ELAL MUŞ\*\* Figen ÇETİNKAYA\*\*\* Recep ÇİBIK\*\*\*

### ÖZET

Bu çalışmada, geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan, bitkilerden, yağmur suyundan ve çiy damlasından izole edilen 45 *Lactobacillus delbrueckii* spp. ve 66 *Streptococcus thermophilus* suşunun bakteriyolitik aktiviteleri belirlenmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* spp. ve *Streptococcus thermophilus* yoğurt üretimi, İtalyan ve İsviçre tipi peynirlerin üretiminde kullanılan starter kültürlerdir. Yoğurtta düşük ve orta seviyede bakteriyolitik aktivite, istenen kıvam, yapının oluşmasına ve pıhtılaşma zamanının kısılmasına neden olurken, yüksek bakteriyolitik aktivite geciken asidifikasyon dolayısıyla olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Bunun aksine peynir üretiminde yüksek aktivite olgunlaşmanın hızlanmasına ve aromatik bileşiklerin oluşmasında rol almaktadır. Çalışmada, *L. delbrueckii* spp. suşlarının 18'inde (% 40) yüksek bakteriyolitik aktivite, 27'sinde (% 60) düşük ve orta seviyede bakteriyolitik aktivite ölçülmüştür. *S. thermophilus* suşlarında ise 27'sinde (% 41) yüksek bakteriyolitik aktivite, 39'unda (% 59) düşük ve orta seviyede bakteriyolitik aktivite belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yoğurt, bakteriyolitik aktivite, bitki, yağmur suyu, çiy damlası

## BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF YOGHURT BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONALLY PRODUCED YOGHURTS, PLANTS, RAINWATER AND DEW DROP SAMPLES

### ABSTRACT

In this study the bacteriolytic activities of 45 *Lactobacillus delbrueckii* spp. and 66 *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditionally produced yogurts, plants, rainwater and dewdrop samples were determined turbidimetrically. *L. delbrueckii* spp. and *S. thermophilus* are used as starter cultures in yoghurt manufacturing. These cultures were also employed as starter in some cheese varieties such as Italian and Swiss - type cheeses. The low and moderate bacteriolytic activity exhibiting strains are desired in yoghurt manufacturing because of the proper acidification rate and clotting time. In cheese manufacturing, in contrast, strains with higher bacteriolytic activity are preferred, because liberation of bacterial enzymatic content into the cheese matrix as a consequence of bacteriolysis shorten the ripening time and enhance the quality parameters. Among the *L. delbrueckii* species, 18 (strains 40 %) exhibited higher bacteriolytic rate whilst the others were low or moderate rate (27 strains). For the *S. thermophilus* strains, high bacteriolytic rate were determined in 27 (41 %) and low or moderate rate were determined in 39 (59 %) at the end of 24 h incubation period.

**Key Words:** Yoghurt, bacteriolytic activity, plants, rainwater, dewdrops

\* Dr. Balıkesir Üniversitesi, Susurluk Meslek Yüksekokulu - BALIKESİR

\*\* Dr. Uludağ Üniversitesi, Keles Meslek Yüksekokulu- BURSA

\*\*\*Prof. Dr. Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi A.B.D.- BURSA

\*\*\*\* Bu çalışma (Tavşanlı 2015), Prof. Dr. Recep ÇİBIK danışmanlığında hazırlanan 'Geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan ve doğadaki bitkisel örneklerden yoğurt bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve karakterizasyonu' adlı Doktora tezinden üretilmiştir.

## 1. GİRİŞ

Türkiye’de 2000’li yıllarda kişi başına yoğurt tüketimi 20 kg/yıl iken bu değer Finlandiya’da 40, Bulgaristan’da 35, Yunanistan’da 89 ve ABD’de 113 kg’dır (Hardem A. 2006). Ulusal süt konseyi verilerine göre, fermente ürünlerin üretimi de içme sütüne benzer şekilde dünyanın çoğu bölgesinde artmıştır. Bu artış özellikle Meksika’da (% 18), Japonya’da (% 10,2) ve İran’da (% 12,5) daha etkili olurken, ABD’deki (% 3,4) büyüme genel itibariyle yoğurt tüketimindeki artıştan kaynaklanmaktadır. Ülkemizde laktasyon verimlerindeki artışa paralel olarak, süt verimi 2013 yılında bir önceki yıla göre % 4,7 oranında artarak 18.223.712 ton olmuştur. Meydana gelen artış yoğurt üretimine de yansımış ve bir önceki yıla göre 2013 yılında yoğurt üretimi % 2,7 artarak 1.081.390 ton, ayran % 10,2 artarak 560.101 ton, peynir üretim miktarı % 9,8 artarak 600.266 ton olarak tespit edilmiştir (Ulusal Süt Konseyi 2013). Süt ürünleri üretiminde ingrediyan olarak kullanılan starter kültür üretimi de süt üretimine bağlı olarak artışlar gözlenmiş ve starter kültür çeşitliliği de artmıştır.

Fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan başlıca starter kültürler *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus*’tur. Bazı ülkelerde probiyotik amaçlı en sık kullanılan türler ise; *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. delbrueckii* ve *L. johnsonii*’dir (Zamfir ve ark. 2006). Bu fermente ürünlerden yoğurtta, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* starter kültür olarak kullanılmaktadır (Wouters ve ark. 2002). Bu iki starter kültürden ayrıca İsveç ve İtalyan peynirlerin üretiminde de yararlanılmaktadır (Leroy ve ark 2004.). Fermente ürünlerin üretiminde problemlerle karşılaşmamak için ülkemiz süt sanayinde genetik olarak tanımlanmış ve teknolojik özellikleri belirlenmiş starter kültürler kullanılmaktadır. Ülkemiz ekonomisi için son derece önemli konu ise, yerel kültürlerin teknolojik özellikleri bilinmediği ve tanımlanması yapılamadığı için, tüm fermente ürünlerde kullanılan starter kültürlerin yurt dışından alınmasıdır (Yılmaz ve ark. 2003).

Starter kültürler, ürünün kıvam, yapı, görünüş, aroma ve muhafazasını etkileyen reolojik özelliklerin belirlenmesinde önemli rol oynarlar. Reolojik özelliklerin oluşması starter kültürün asidifikasyon yetenekleri, organik asit, asetik asit, etanol, aroma bileşikleri, bakteriosin, eksopolisakkarit üretim yetenekleri ve bakteriyofaj dirençliliklerine bağlıdır (Leroy ve ark. 2004, Zou 2014).

Ürünün reolojik özelliklerini etkileyen bakteriyel otoliz, bakterinin çevresel iskeletini oluşturan ve bakteriye şeklini veren hücre duvarının ana bileşeni olan peptidoglikan tabakasının yine bakteri tarafından üretilen hücre içi endojen hidrolitik enzimler vasıtası ile yıkılmasındadır. Bu enzimler peptidoglikan üzerinde bölgesel olarak gerçekleştirdikleri ve hidroliz neticesinde açığa çıkardıkları serbest parçacıklara göre;  $\beta$ -N-asetilmuramidaz,  $\beta$ -N-asetilglukozaminidaz, N-asetilmuramil-L-alanin amidaz ve peptidazlar şeklinde sınıflandırılırlar (Linko ve ark. 1992). Bakteriyolitik aktivitenin hızı bakteri türleri ve alttürlerinde değişiklik göstermektedir (Deutsch ve ark, 2002, Çıbık ve ark. 2001).

Bu çalışmanın amacı geleneksel yöntemlerle üretilmiş yoğurtlardan ve doğadaki bitkisel örneklerden izole edilmiş yoğurt bakterilerinin teknolojik özelliklerini etkileyen bakteriyoliz hızlarını tespit etmek ve yoğurt starterlerinin, düşük ve orta düzeyde bakteriyoliz hızına sahip olan suşlarını belirleyerek yerli yoğurt endüstrisinde kullanım olanaklarını araştırmaktır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan yoğurt bakterileri, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı UAP(V)-2012/11 numaralı proje ile MALDI-TOF/MS yöntemiyle tanımlanan 45 *Lactobacillus delbrueckii spp.* ve 66 *Streptococcus thermophilus* suşundan oluşmaktadır. Çalışmada identifikasyonu yapılan suşların izolasyon kaynakları Çizelge-1’de gösterilmiştir.

Çizelge-1: MALDI-TOF/MS tekniğine göre identifikasyonu yapılan suşların izolasyon kaynakları

|                            | Geleneksel Tekniklerle Üretilmiş Yoğurtlar | Bitkiler | Yağmur Suyu | Çiy Damlası |
|----------------------------|--|----------|-------------|-------------|
| <i>L. delbrueckii spp.</i> | 27   | 3        | 8           | 7           |
| <i>S. thermophilus</i>     | 40   | 4        | 10          | 12          |

## 2.2. Metot

Mikroorganizmaların bakteriyolitik aktiviteleri Çıbık ve ark. (2000) tarafından belirtildiği şekilde ölçülmüştür. *L. delbrueckii spp.* MRS sıvı besiyerinde ve *S. thermophilus* M17 sıvı besiyerinde 42°C de aktifleştirilmiştir. Logaritmik üreme fazının sonunda üreyen mikroorganizmalar 1,5 ml steril ependorf tüplere aktarılmış ve 8000 rpm 5 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstte kalan besiyeri dikkatli bir şekilde dökülmüş dipte kalan bakteri peleti, steril 4°C de ki saf su ile iki kez yıkanmıştır. Bu sayede bakterilerin bulunduğu ortam, besin maddeleri kalıntıları ve metabolitlerden arındırılmıştır. Dipteki bakteri peleti üzerine pH 7'ye ayarlanmış 100 mM konsantrasyondaki steril potasyum fosfat tamponu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eklenmiş ve optik dansitesi OD<sub>650nm</sub>=0.4-0.7 aralığına ayarlanmıştır. Bakteriyoliz 45°C de 0. ve 2. saatlerde bakteriyoliz hızı ve 24. saatte bakteriyolizin ulaştığı son nokta değeri optik dansitedeki azalma olarak değerlendirilmiştir (Masuda ve ark. 2005, Çıbık ve ark. 2004). Hücre bakteriyolizi aşağıda verilen formüle göre değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ Bakteriyoliz} = \frac{A_o - A_t \times 100}{A_o}$$

A<sub>o</sub>: Başlangıç değeri

A<sub>t</sub>: Belirlenen süre sonunda ulaşılan değer

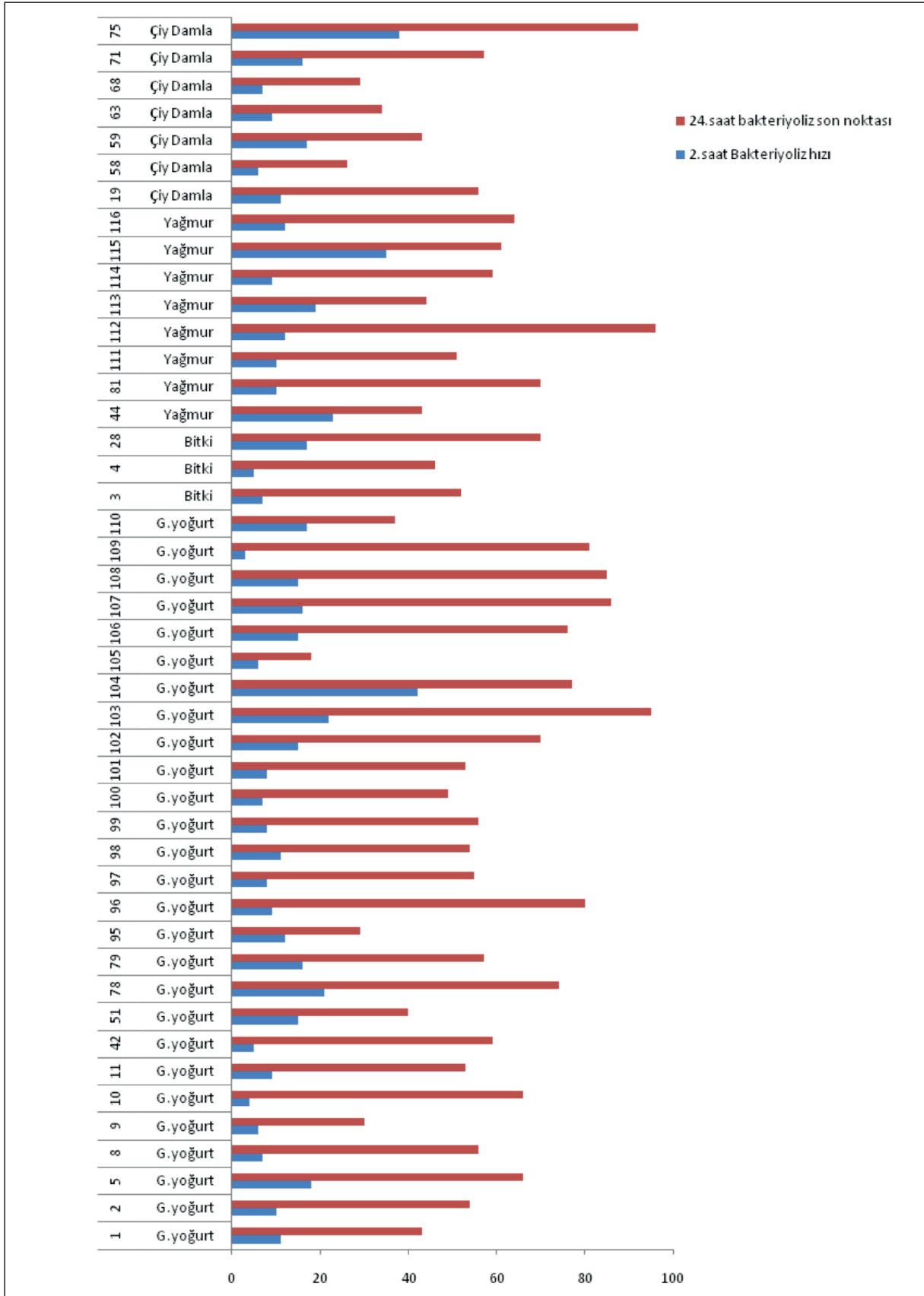
## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

*L. delbrueckii* suşlarına ait 2. saatteki bakteriyoliz hızı ve 24. saatteki bakteriyolizin son nokta ölçüm sonuçları Şekil- 1'de verilmiştir. *L. delbrueckii* suşları için bakteriyolizin 2. saatinde yapılan ölçümlerde; suşların çoğunluğunda bakteriyoliz hızları % 7-17 arasında değişirken, suşlardaki ortalama değer % 13,3 olarak ölçülmüştür. En düşük 2. saatteki bakteriyoliz hızı % 3 ile geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan izole edilen 109 numaralı suşta belirlenmiştir. En yüksek 2. saatteki bakteriyoliz hızı ise % 42 ile geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan izole edilen 104 numaralı suşta tespit edilmiştir. Bakteriyolizin 24. saatte ulaştığı son nokta değeri suşların çoğunda % 40 ile 65 arasında değişirken, ortalama değer % 56,7 olarak ölçülmüştür. En düşük bakteriyoliz hızı % 18 ile geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan izole edilen 105 numaralı suşta, en yüksek bakteriyoliz ise % 96 ile yağmur suyundan izole edilen 112 numaralı suş için saptanmıştır. Ortalamanın üstünde bakteriyoliz hızı 5, 10, 28, 51, 59, 71, 75, 78, 79, 96, 106, 107, 108, 109, 110, 113, 115 ve 116 numaralı suşlarda tespit edilmiştir.

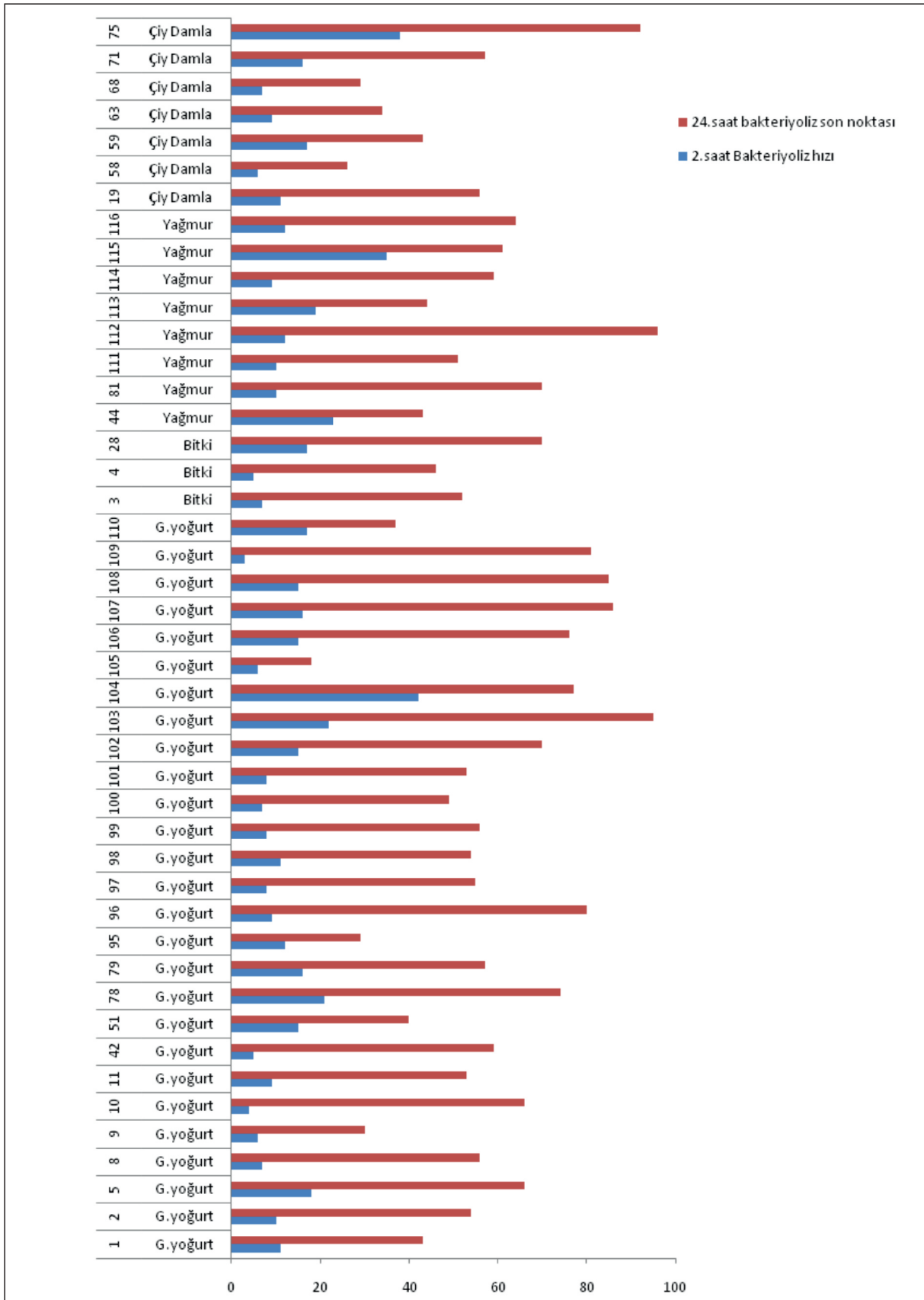
*S. thermophilus* suşlarına ait 2. saatteki bakteriyoliz hızı ve 24. saatteki bakteriyoliz son noktası ölçüm sonuçları Şekil- 2'de verilmiştir. *S. thermophilus* suşlarında bakteriyolizin 2. saatinde yapılan ölçümlerde suşların çoğunda bakteriyoliz hızları % 7-19 arasında değişirken, suşlardaki ortalama değer % 13,6 olarak ölçülmüştür. 2. saatteki en düşük bakteriyoliz hızı % 3 ile geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan izole edilen 90 numaralı suşta tespit edilirken, en yüksek bakteriyoliz hızı ise % 43 ile bitkilerden izole edilen 36 numaralı suşta belirlenmiştir. Bakteriyolizin 24. saatte ulaştığı son nokta değerine bakıldığında, bu değer suşların çoğunda % 40 ile 60 arasında değişirken, suşlardaki ortalama değer % 42,1 olarak ölçülmüştür. En düşük bakteriyoliz hızı % 16 ile bitkilerden izole edilen 24 ve geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan izole edilen 73 numaralı suşlarda tespit edilirken, en yüksek bakteriyoliz hızı ise % 77 ile geleneksel tekniklerle üretilen yoğurtlardan izole edilen 105 numaralı suş için tanımlanmıştır. Ortalamanın üstünde bakteriyoliz 75, 77, 78, 79, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 92, 101, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 121 ve 122 numaralı suşlarda tespit edilmiştir.

İncelenen toplam 45 *L. delbrueckii* suşundan 18'inin ortalamanın üstünde, 7'sinin orta seviyede, 20'sinin düşük bakteriyolitik hızı sahip olduğu belirlenmiştir. Yine analiz edilen 66 *S. thermophilus* suşundan 27'sinin ortalanmanın üstünde, 20'sinin orta ve 19'unun düşük düzeyde bakteriyolitik hız gösterdiği ortaya konmuştur. Bakteriyolizinin yüksek olduğu suşlarda bu karakter litik özelliğe sahip bir bakteriyofaj varlığına bağlı olabilmektedir. Ancak bu durumu açıklığa kavuşturacak detaylı çalışmaların yapılması gereklidir.

Peynirlerin olgunlaşma sürecinde bakteriyoliz neticesinde açığa çıkan hücre içi enzimler, olgunlaşma süresinin kısalmasını sağlamakta ve istenen aromatik niteliklerin gelişimini arttırmaktadır (Çıbık 2006, Ouzari ve ark. 2002, Hannon ve ark. 2006). Yoğurtta ise yoğurt bakterilerinin aşırı derecede çoğalmasını engellemektedir. Yoğurt bakterilerinin bakteriyoliz oranı üzerine yapılan çalışmada, yoğurt kalitesi üzerine etkili olduğu görülmüştür. Yüksek otoliz oranına sahip suşlardan elde edilen yoğurtlarda bakteriyolizin laktik asit üretimi, pıhtılaşma zamanı, viskozite, su tutma kapasitesi, aroma bileşiklerinin oluşumu ve raf ömrü gibi kalite niteliklerini az ya da çok etkilediği görülmüştür (Linko ve ark. 1992).

Şekil- 1: *Lactobacillus delbrueckii* spp. suşlarının 2. ve 24. saatlerdeki bakteriyolizi

Özellikle yüksek bakteriyoliz hızına sahip suşlarda laktik asit üretimi negatif yönde etkilenmekte ve bu durum yoğurtta pıhtılaşma zamanının uzamasına neden olmaktadır. Yoğurt bakterilerinin bakteriyolitik aktivitesinin su tutma kapasitesinde, viskozitede ve aroma bileşiklerinin oluşumu üzerine çok etkili olmadığı görülmüştür.



Şekil- 2: *Streptococcus thermophilus* suşlarının 2. ve 24. saatlerdeki bakteriyolizi

Yoğurtların 10-15°C’de muhafazası sırasında bakteriyoliz oranında azalma görülmüştür (Xiao ve ark. 2014). Düşük bakteriyoliz yoğurtta inkübasyon süresinin kılmasına ve pıhtılaşmanın istenilen düzeyde oluşmasına yardım etmektedir (Sun ve ark. 2012).

#### 4. SONUÇ

Geleneksel tekniklerle üretilmiş yoğurtlardan, bitki, yağmur suyu ve çiy damlasından izole edilen suşların bakteriyolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Bu suşların doğadan toplanmış olması ve herhangi bir teknolojik özelliklerinin bilinmemesi özel önem taşımaktadır. Yüksek bakteriyoliz yeteneğine sahip suşlar açığa çıkardıkları otolitik enzimleri ile peynirin olgunlaşma süresini kısaltmaktadır. Bu da ürünün daha hızlı bir şekilde pazara sunulmasına olanak sağlamaktadır. Peynir yapımında yüksek bakteriyolitik aktiviteye sahip suşlar tercih edilirken, yoğurtta düşük ve orta seviyede bakteriyolitik kapasiteye sahip suşlar tercih edilmektedir. Yüksek bakteriyolitik kapasite yoğurtta pıhtılaşma zamanının uzamasına, kıvam- yapı bozukluklarına ve serum salma gibi kusurların oluşmasına neden olurken, düşük hızdaki bakteriyolitik aktivite ise yoğurtta muhafaza şartlarında asitliğin devamlı gelişmesine buna bağlı olarak yoğurtta ekşi tada neden olmaktadır.

Mevcut araştırmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde bazı suşların bakteriyolitik özellik yönünden süt ürünleri üretim teknolojisinde kullanılabileceği belirlenmiştir. Düşük bakteriyolitik hıza sahip 20 adet *L. delbrueckii spp.* ve 19 adet *S. thermophilus* suşlarının yoğurt endüstrisinde kullanımı mümkün olabileceği, yine açığa çıkardıkları otolitik enzimleri ile peynirin olgunlaşma süresini kısaltıcı etki oluşturan yüksek ve orta seviyede bakteriyolitik özellikteki 47 adet *S. thermophilus* suşlarının ise çeşitli peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılma olanağı vardır. Gelecek çalışmalarda *L. delbrueckii* suşlarına ait alt tür identifikasyonunun yapılmasının ardından, klasik süt ve süt ürünleri dışındaki kaynaklardan izole ve identifiye edilen bu suşların proteoliz, lipoliz, bakteriosin üretimi gibi birçok özelliğinin karakterizasyonunun yapılarak starter kültür olarak birçok gıda ürününde değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

**Not:** Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin UAP(V)-2012/11 nolu proje desteğinden faydalanılmıştır. İlgili birime teşekkürü borç biliriz.

#### 5. KAYNAKLAR

- Çıbık, R., Chapot Chatier, M.P. 2000. Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. 2. Journal of Applied Microbiology, 89:5 862- 869.
- Çıbık R., Tailliez P., Langella P., Chapot-Chartier M-P., 2001. Identification of mur, an atypical peptidoglycan hydrolase derived from *Leuconostoc citreum*. Applied and Environmental Microbiology 67 (2): 858-864.
- Çıbık R., Chapot-Chartier M-P., 2004. Characterisation of Autolytic Enzymes in *Lactobacillus pentosus*. Letters in Applied Microbiology 38: 459-463.
- Çıbık R. 2006. *Lactobacillus pentosus* 'un otolitik aktivitesinin ve peptidoglikan hidrolaz enzimlerinin karakterize edilmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 469- 472.
- Deutsch, S.P., Ferain T., Delcorb J., Lortal S. 2002. Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. International Dairy Journal 12: 591–600.
- Leroy F., Vuys LD. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Food Science Technology, 15:2, 67- 78.
- Linko S., Enwald S., Vahvaselka M. Annika M. 1992. Optimization of the production of B-galactosidase by an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subs. thermophilus*. Annals New York Academy of Sciences, 3: 583-594.
- Hannon, J.A., Deustch, S. M., Madec, M.N., Gassi, J.Y., Chapot-Chartier, M.P., Lortal, S. 2006. Lysis of starters in UF cheeses: behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. International Dairy Journal 16(4): 324-334.
- Hardem A. 2006. Farklı yörelerden toplanan geleneksel yöntemle üretilen yoğurt örneklerinin bazı niteliklerinin belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Konya, 2006
- Masuda T., Hidaka A., Kondon N., Ura T, Itoh T. 2005. Intracellular enzyme activities and autolytic properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. Food Science Technology Resiews, 3: 328-331.

Ulusal Süt Konseyi. Dünya'da ve Türkiye'de Süt Sektör İstatistikleri 2013.

[www.ulusalsutkonseyi.org.tr/kaynaklar/arastirma\\_dosyalar/2014\\_05\\_22\\_905419.pdf](http://www.ulusalsutkonseyi.org.tr/kaynaklar/arastirma_dosyalar/2014_05_22_905419.pdf)

Ouzari, H., Cherif A., Mora D. 2002. Autolytic phenotype of *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional Tunisian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 812–820.

Sun, J., Shen, J., Wang, X., Tian, Y., Jiaping, L., Liu, L. 2012. Effects of yogurt starters autolysis on quality of yogurt. *Chinese Society of Agricultural Engineering*, 6: 287-292.

Yılmaz, R., Temiz, A. 2003. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3: 19-42.

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. V. L. 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* 29(6): 487-495.

Zuo, L., Feng, J., Chen, L.L. 2014. Identification and partial characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products produced by herders in the western Tianshan Mountains . *Letters in Applied Microbiology*, 59, 549 -556.

Wouters, J.T.M., Eman, H.E., Ayad J.H., Gerrit, S. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12: 91- 95.

Xlao-Yang, P., Wen-Ming, C., Liu, L., Shu- Wen, Z. 2014. Gene knockout and overexpression analysis revealed the role of N-acetylmuramidase in autolysis of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* Lj6. *Plos One*, 9(8), e104829.