

# LAKTOBASİLLER VE PROBİYOTİK PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANIM POTANSİYELLERİ

Oğuz GÜRSOY, Özer KINIK

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, 35100/Bornova/İzmir

Geliş Tarihi : 13.08.2004

## ÖZET

Laktik asit bakterileri (LAB) süt ürünleri üretiminde kültür olarak kullanılan türler de dahil olmak üzere çok sayıda bakteri cinsini kapsamaktadır. LAB'nin en önemli cinslerinden birisi *Lactobacillus*'dur. Bu cins içindeki mikroorganizmalar gastrointestinal sistemden başka fermente gıdalarda da bulunabilmektedirler. Laktobasiller, starter ve/veya destek kültür ya da starter olmayan mikroflora olarak peynir olgunlaşması ve lezzetinin oluşumu ile de ilişkilidirler. Bazı ülkelerde probiyotik olarak da kullanılan laktobasillerin bu amaçla en sık kullanılan türleri; *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* ve *L. johnsonii* olarak sayılabilir. Bu makalede öncelikle laktobasillerin (özellikle *L. casei* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei*'nin) biyokimyasal ve antimikrobiyal özellikleri ile peynir teknolojisindeki önemleri özetlenmiş, ardından bunların peynir üretiminde probiyotik olarak kullanımları yeni bulgular ışığında değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler** : Laktobasil, *L. casei*, *L. paracasei*, Peynir, Probiyotik

## LACTOBACILLI AND THEIR USAGE POTENTIAL IN PROBIOTIC CHEESE PRODUCTION

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) comprise a wide range of genera including species from production of dairy products. One of the most important genera of LAB is *Lactobacillus*. Species of this genus can be found in gastrointestinal tract and also fermented foods. They are also associated with cheese ripening and flavour as starter and/or adjunct culture or non-strater microflora. Latobacilli are used as probiotics in some countries; most of them are *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* and *L. johnsonii*. This paper will first outline biochemical and antimicrobial properties of lactobacilli especially *L. casei* and *L. paracasei* subsp. *paracasei* and their importance for cheese technology. Finally we will discusse use of Lactobacilli as probiotic microorganisms in cheese production by using new literature data.

**Key Words** : Lactobacilli, *L. casei*, *L. paracasei*, Cheese, Probiotic

### 1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri Gram (+), spor oluşturmayan, katalaz negatif, aerotolerant (mikroaerofilik koşullardan anaerobik koşullara kadar değişen geniş bir spektrumda gelişebilen), karbonhidrat metabolizmaları sonucunda başlıca son ürün olarak

laktik asit oluşturan mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedirler (Klein et al., 1998; Christensen et al., 1999). Laktik asit bakterilerinin en önemli cinsleri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* ve *Bifidobacterium*'dur (Klein et al., 1998). Bazı laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistemde

canlılıklarını sürdürebilme gibi ilginç fizyolojik karakterleri onların probiyotik olarak kullanımlarına potansiyel olanak sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme kabiliyetleri bu mikroorganizmaların düşük pH ve/veya safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme yetileriyle ilgilidir. Laktik asit bakterilerinin taksonomik değerlendirilmelerinde önemli olan fizyolojik özellikler; karbonhidratları fermantasyon biçimleri, farklı tuz konsantrasyonlarına direnç, farklı besin ortamlarında ve sıcaklıklarda gelişebilme derecesi ve antibiyotiklere karşı direnç olarak sıralanabilmektedir. Laktik asit bakterilerinin taksonomisi uzun yıllardan beri bakterilerin fenotipik özelliklerini baz almaktadır. Bu tip bir değerlendirmeye göre laktik asit bakterileri; “*Thermobacterium*”, “*Streptobacterium*” ve “*Betabacterium*” olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir (Klein et al., 1998). Gelişmiş moleküler tiplendirme teknikleri laktik asit bakterilerinin fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan bu alt gruplandırmanın uygun olmadığını göstermiştir. Örneğin; Hammes and Vogel (1995) laktobasilleri hücre duvarı peptidoglikan tipi ile pentoz ve hekzozları fermantasyon şekillerine göre gruplandırmıştır.

Laktobasiller Gram (+), spor oluşturmayan, DNA’larında genellikle % 50 den daha az guanin+sitozin (G+C) içeren çubuklar ya da kokobasillerdir. Bunlar kesin olarak fermentatif, oksijene toleranslı ya da anaerobik, asidürik ya da asidofilik ve kompleks besin gereksinimleri olan (karbonhidratlar, aminoasitler, peptitler, yağ asidi esterleri, tuzlar, nükleik asit türevleri ve vitaminler gibi) mikroorganizmalardır. Bazı laktobasil türlerine ait suşlar çevreden aldıkları porforinoidleri kullanabilir, katalaz aktivitesi ve nitrit redüksiyonu gösterebilirler. Glukozu karbon kaynağı olarak kullanan laktobasiller ya homofermentatif (% 85 den fazla laktik asit üretirler) ya da heterofermentatifler [eşit oranlarda laktik asit, karbondioksit ve etanol (ve/veya asetik asit) üretirler]. Laktobasiller tarafından çok sayıda bileşik (sitrat, malat, tartarat, nitrat, nitrit vb.) metabolize edilebilir ve enerji kaynağı ya da elektron akseptörü olarak kullanılabilir (Hammes and Vogel, 1995).

Laktobasiller doğada karbonhidrat içeren substratların zengin bir şekilde elde edilebileceği ortamlarda bulunurlar. Bundan dolayı da insan ya da hayvanların mukozal membranları (ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, bağırsak sistemi ve vajina), bitkilerin ya da bitkisel materyallerin üzeri, gübreler, lağım pisliği, fermente olan ya da bozulan gıdalar gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler (Hammes and Vogel, 1995).

Günümüzde laktobasillerin 60’ın üzerinde türü bilinmektedir (Hammes and Vogel, 1995; Banks and Williams, 2004). Klein et al. (1998) probiyotik laktobasilleri; *Lactobacillus acidophilus* grubu, *Lactobacillus casei* grubu ve *Lactobacillus reuteri-fermentum* grubu olmak üzere 3 alt grupta incelemiştir. Geçmişte *L. casei* grubu, *L. casei* olarak yalnızca bir türü içermekte ve türde 5 alt grupta incelenmekteydi: *L. casei* subsp. *casei*, *alactosus*, *pseudoplantarum*, *tolerans* ve *rhamnosus*. 1989 yılında Collins ve arkadaşları *L. casei* grubunun *L. paracasei* ve *L. rhamnosus*’u da içerecek şekilde başlıca 3 türden oluşmasını önermiştir (Klein et al., 1998). Bu üç alt gruptan biri olan *Lactobacillus paracasei*’nin taksonomik pozisyonu hala tam olarak açık değildir ve ileriki yılların araştırma konularından biri olarak görülmektedir (Kristo et al., 2003). Dicks et al. (1996) *L. paracasei* isminin kaldırılmasını önermiş olmasına rağmen bu öneri halen tartışılmaktadır. Klein et al. (1998) probiyotik laktik asit bakterilerinin taksonomik ve fizyolojik sınıflandırmasını yaptıkları çalışmalarındaki protein analiz sonuçlarının Dicks ve arkadaşlarının konuya ilişkin önerisini desteklediği bildirilmektedir. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* fakültatif heterofermentatif bir laktobasildir. Genel olarak söz konusu bakteri suşları 10-40 °C’lerde iyi gelişim gösteren mikroorganizmalardır. Bazı suşlar 5-45 °C’lerde de gelişebilmektedir. Söz konusu mikroorganizma hekzozları ve pentozları (özellikle glukonat) fermente edebilmektedir. Yine *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* laktozdan L veya DL formunda laktik asit üretebilmektedir (Wood and Holzappel, 1995).

Bu makalede öncelikle laktobasillerin (özellikle de *L. casei* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei*’nin) biyokimyasal özellikleri özetlenmiş, ardından bu bakterilerin peynir teknolojisindeki önemleri anlatılmıştır. Son bölümde laktobasillerin peynir üretiminde probiyotik olarak kullanımları yeni bulguların ışığında değerlendirilmiştir.

## 2. LAKTOBASİLLERİN ÖNEMLİ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Genel olarak laktobasillerin sütü asitleştirebilme kabiliyeti türler ve suşlar arasında farklılık arz etmektedirler. Xanthopoulos et al. (2000) yeni doğan bebeklerin feçesinden izole ettikleri *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* ve *L. reuteri*’nin farklı suşlarından oluşan 18 farklı laktobasilin bazı biyokimyasal özelliklerini incelemiştir. Genel olarak laktobasillerin sütü asitleştirme

kabiliyetlerinin 37 °C ve 40 °C'de 30 °C'dekine göre daha iyi olduğu belirlenmiş ve asitleştirme kabiliyeti açısından en güçlü suşların *L. rhamnosus*'a ait suşlar olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, incelenen laktobasiller içerisinde *L. reuteri* suşlarının asitleştirme açısından en zayıf suşlar olduğu görülmüştür. Mama et al. (2002) Yunanistan'da tüketilen salamura beyaz peynir, Feta, Ladotyri ve Orinotyri peynirlerinden izole ettikleri toplam 27 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* suşunu asitleştirme kabiliyeti açısından düşük ve orta düzey aktivite gösterenler olarak iki grupta incelemiştir. Burada 24 saatte pH'yı 1 birimden daha az düşüren suşlar asitleştirme açısından zayıf, 1.17-2.56 birim düşürülenler ise orta düzey asitleştirme kabiliyetine sahip suşlar olarak değerlendirilmiştir. Kendi arasında 2 alt gruba ayrılan (A ve B) orta düzey asitleştirme kabiliyeti gösteren 22 laktobasil içerisinde 7 suşun pH'yı 24 saate 1.55-1.93 birim düşürerek en yüksek asitleştirme kabiliyetine sahip suşlar olduğu görülmüştür. Konu ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada *L. paracasei* ssp. *paracasei* B117'nin süt pH'sını 6 saat içerisinde 5.96'ya düşürdüğü bildirilmiştir (Kristo et al., 2003). Yine Durlu-Ozkaya et al. (2001) Türkiye'de üretilen salamura koyun peynirlerinden izole ettiği laktobasillerin sütü asitleştirme kabiliyetinin farklılıklar arz ettiğini ve laktobasiller içerisinde *L. paracasei* subsp. *paracasei* LC1'nin 24 saatte sütün pH'sını 1.60 birim düşürerek asitleştirme kabiliyeti açısından aktivite gösteren en iyi suş olduğunu bildirmişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemleri ile ilgili olarak yaklaşık son 10 yıla kadar yapılan çalışmalar daha çok laktokoklara odaklanmış iken son yıllarda endüstriyel olarak önemli laktobasiller gibi diğer laktik mikroorganizmaların proteolitik sistemleri konusundaki çalışmalar da artmıştır (Law and Haandrikman, 1997). Genel olarak laktobasillerin proteoliz kabiliyeti çoğunlukla suştan suşa farklılık göstermektedir (Macedo et al., 2000; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Mama et al., 2002). Genel olarak laktobasillerin proteolitik aktiviteleri ile asitleştirme yetenekleri arasında da net bir ilişki yoktur (Durlu-Ozkaya et al., 2001). Durlu-Ozkaya et al. (2001) tarafından bildirilen bu olgu Mama et al. (2002) tarafından da doğrulanmaktadır. Bilindiği gibi sütte bulunan serbest aminoasit konsantrasyonu laktik asit bakterilerinin gelişimini optimum şekilde desteklemek için yeterli değildir. Belki de bununla tutarlı olarak laktik asit bakterileri gelişmiş kompleks bir enzim sistemine sahiptirler. Enzim sistemi içerisindeki proteolitik enzimler büyük molekül ağırlıklı peptitlerden küçük peptitlerin ve amino asitlerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu bağlamda laktobasillerin peptit hidrolaz sistemi bir çok araştırmanın konusunu oluşturmuştur. Laktik

asit bakterilerinin peptidaz sistemi büyüme ve gelişme için gerekli esansiyel aminoasitlerin oluşmasında hücre dışı peptitlerin hidrolizini gerçekleştirmekte ve söz konusu hidrolizde hücre içi proteinazlar görev almaktadır (Christensen et al., 1999). Yapılan çeşitli çalışmalarda *L. casei* grubundaki mikroorganizmaların; aminopeptidaz PepN, XPDAP PepX, dipeptidaz PepV, prolidaz PepQ, prolinaz (sınıflandırılmamış) ve endopeptidaz (sınıflandırılmamış) gibi proteolitik enzim sistemlerine sahip olduğu belirlenmiştir (Christensen et al., 1999; Macedo et al., 2000). Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada Serra da Estrela peynirinden izole edilen *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESB 230, *Leuconostoc mesenteroides* ESB 136, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ESB 117 ve *Enterococcus faecium* ESB 50'nin peptit hidrolaz sistemi üzerine çalışılmıştır. Çalışmada *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESB 230'un en yüksek aminopeptidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada hidrofobik aminoasit rezidülerini içeren dipeptitlerin (lösin, izolösin ve fenilalanin) enzimler tarafından hidrofilik aminoasit rezidülerini içerenlere göre hızlı bir şekilde tutulduğu tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen bütün bakteriyel enzimlerin dipeptidaz aktivitesinin aminopeptidaz aktivitelerinden daha yüksek olduğu görülmüştür (prolin içerener hariç). *L. paracasei* subsp. *paracasei* ESB 230'un çalışmada incelenen diğer laktik asit bakterilerine göre daha yüksek aminopeptidaz, prolinaz (prolin-lösin, prolin-metionin) ve prolidaz (fenilalanin-prolin) aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Macedo et al., 2000).

Protein ve peptitlerin serbest aminoasitlere parçalanması ve meydana gelen serbest aminoasitlerin katabolize edilmesi laktik asit bakterilerinin temel metabolik aktivitelerinden biridir (Hansen et al., 2001). Amino asit katabolizmasında; deaminasyon, dekarboksilasyon, transaminasyon ve dış zincir modifikasyonu gibi katabolik reaksiyonlarla keto asitler, amonyak, aminler, aldehitler, asitler ve alkoller gibi peynirlerde tat ve aroma için gerekli bileşikler oluşabilmektedir (Kieronczyk et al., 2001). Aminoasit katabolizması  $\alpha$ -ketoglutarat'a bağlı bir transaminasyon ile başlamaktadır. Burada meydana gelen  $\alpha$ -keto asitlerden enzimatik ya da kimyasal reaksiyonlar ile hidroksi asitler, aldehitler, alkoller ve karboksilik asitler gibi ileri parçalanma ürünleri ortaya çıkmaktadır (Yvon and Rijnen, 2001; Banks and Williams, 2004). Lösin ve izolösinin katabolize edilmesiyle meydana gelen 3-metil-bütanol, 3-metil-bütanoik asit ve 2-metil-bütanoik asidin peynirde lezzet gelişiminde önemli oldukları bildirilmektedir. Aminotransferazlar (AT) söz konusu lezzet bileşiklerinin oluşumunu sağlayan aminoasit katabolizmasının ilk aşamasında rol oynamaktadır.

AT enzimleri piridokzal fosfatı (PLP) kofaktör olarak kullanarak bir aminoasidi ilgili  $\alpha$ -keto aside dönüştürmektedir. Söz konusu enzimler mikroorganizmalardaki hücre içi enzimlerdir. Bu enzimler laktokoklardan ve starter olmayan bazı laktobasillerden izole edilmişlerdir. Peynir bakterilerinden izole edilen AT enzimlerinin aspartat, dallanmış zincirli amino asitler (lösin, izolösin ve valin) ve aromatik aminoasitlere ( tirozin, fenilalanin ve triptofan) karşı spesifik olduğu belirlenmiştir. Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, peynirden izole edilen *L. paracasei* subsp. *paracasei* LC01 suşunun dallanmış zincirli aminoasitlerin transaminasyonundaki rolü üzerine çalışılmıştır (Hansen et al., 2001). İlgili bakteriden izole edilen AT enziminin her üç dallanmış zincirli aminoasidi hidrolize ettiği fakat aynı ortamda hepsinin bulunması durumunda lösin ve izolösin'i valine göre daha çok tercih ettiği belirlenmiştir. Yine ortamda yüksek konsantrasyonda  $\alpha$ -ketoglutarik asit bulunması lezzet üzerinde etkili olan glutamik asit üretimi üzerine azaltıcı etki göstermiştir (Hansen et al., 2001). Bunun aksine Banks et al. (2000) Cheddar peyniri pıhtısındaki  $\alpha$ -ketoglutarat konsantrasyonu artışının glutamik asit üretimini yaklaşık %30 oranında arttırdığını bulmuştur. Kieronczyk et al. (2001) tarafından *L. casei* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei*'nin aminoasit metabolizması pH, tuz konsantrasyonu, sıcaklık ve karbonhidrat yetersizliği (L-aminoasitlerin karışımı bir substrat kullanılarak) açısından benzer şartlar oluşturulan bir model sistemde çalışılmıştır. Çalışmada her iki bakterinin de aminoasit süspansiyonundaki asparagin, serin ve glutamin aminoasitlerini kullanabildiği belirlenmiştir. Aminoasit solüsyonuna  $\alpha$ -ketoglutarat ilave edilmesi durumunda bakterilerin lösin ve lisin'i katabolize edebildikleri görülmüştür. Yine aminoasit solüsyonlarında geliştirilen bakterilerin yüksek seviyede asetoin ve amonyak ürettikleri ve  $\alpha$ -ketoglutarat ilaveli solüsyonda bu iki bileşiğin konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada tespit edilen en önemli noktalardan birisi her iki aminoasit solüsyonunda bakteri gelişiminden kaynaklanan yüksek konsantrasyonda karbondioksit üretimi olmasıdır. Yine *L. casei* 2756'nın  $\alpha$ -ketoglutarat varlığında metionin'i katabolize edebilmesi peynirde sülfür lezzetinin oluşumunda bir potansiyel teşkil etmesi açısından önemli görülmektedir (Kieronczyk et al., 2001). Bu çalışmada elde edilen bulgularla paralel olarak Banks et al. (2000) Cheddar peyniri pıhtısına bir transaminaz akseptörü olan  $\alpha$ -ketoglutarat (5 g/kg) ilave edilmesinin lösin ve izolösin katabolizmasını %20 arttırdığını bulmuştur. Yine peynir pıhtısına  $\alpha$ -ketoglutarat (20 g/kg) ile beraber destek kültür olarak *L. paracasei* ilave edilmesi durumunda lösin, izolösin, fenilalanin, valin ve alanin

katabolizmalarında % 20 ila % 50 arasında değişen oranlarda artışlar olmuştur (Banks et al., 2000).

Genel olarak starter laktik asit bakterilerinin lipolitik-esterolitik aktiviteleri ya da bir başka ifade ile lipaz-esteraz sistemleri proteolitik sistemlerinden daha az dikkate alınmıştır. *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* gibi starter olarak kullanılan obligat homofermentatif laktobasiller de laktokoklar gibi esterazlar üretebilmektedirler. Fakültatif heterofermentatif olan ve bir çok peynir çeşidinin starter olmayan mikrofloralarındaki dominant laktobasiller olarak tespit edilen *L. casei*, *L. paracasei* ve *L. plantarum* gibi laktobasillerin lipolitik aktiviteleri zayıftır (McSweeney and Sousa, 2000). Suşa bağlı olmakla birlikte (Madkor et al., 2000) genel bir kabul olarak lipolitik aktiviteleri her ne kadar zayıf olsa da, laktobasiller, bazı peynir çeşitlerinin lipolitik olgunlaşmasında son derece önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin dondurarak şoklanmış *L. casei* T'nin lipolitik aktivitesinin yüksek olduğu ve Cheddar peynirinin olgunlaşmasında önemli olabileceği bildirilmektedir (Madkor et al., 2000). Yine Fenster et al. (2003) *L. casei*'den izole ettikleri esterazların model sistemde ve Parmesan peynirinin olgunlaşma şartlarında etil bütanat, etil pentanat ve etil hekzanat üretme kabiliyetinde olduğunu tespit etmişlerdir. Bundan dolayı araştırmacılar söz konusu bakterinin starter olarak kullanılabilmesi ya da starter olmayan mikroflorada bulunması nedeniyle Parmesan ve Grana Padano peynirlerinin olgunlaşmasına söz konusu lezzet bileşiklerinin oluşumunu sağlayarak katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Çok sayıda laktobasil galaktoz ve riboz kalıntıları, N-asetil-galaktozamin ve sialik asit'in yanı sıra bazı aminoasitleri enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir (Williams et al., 2000; Kieronczyk et al., 2001). Peynirde bulunan laktobasillerin peynir içerisinde kullandıkları enerji kaynağı tam olarak bilinmemekle beraber çoğunlukla olgunlaşmanın ilk aşamalarında tamamına yakını laktik aside dönüşen laktozu kullandıkları düşünülmektedir (Palles et al., 1998). Mezofilik starter kültürler ve starter olmayan laktik asit bakterileri tarafından metabolize edilebilen sitrat lezzet bileşiklerinin önemli bir ön bileşigidir (McSweeney, 2004). Bilindiği gibi sitratın laktik asit bakterileri tarafından enerji kaynağı olarak kullanılması durumunda asetat, etanol, asetaldehit ve diasetil gibi peynir lezzetine katkıda bulunan bileşikler oluşmaktadır (Rea and Cogan, 2003). Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus casei* ATTC 393 ve *Lactobacillus plantarum* 1919'un peynirde sitratı enerji kaynağı olarak kullanmadıkları belirlenmiştir (Palles et al., 1998). Model sistemde yapılan denemede ortamda herhangi bir şeker

bulunmaması durumunda ve pH 5.3'de yeterli sayıda bulunan laktobasiller sitratı metabolize edebilmektedirler. Yine laktobasillerin sitrat ilave edilmiş galaktoz ortamında ön geliştirilmeye tabi tutulduktan sonra, sitrat ortamına konulduklarında sitratı metabolize etme kabiliyetlerinin 22 kat arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından bu durumun önceden gelişme sırasında sitrat liyazın aktive olmasından kaynaklandığını tahmin etmektedirler (Palles et al., 1998). Benzer şekilde Williams et al. (2000) Cheddar peynirinden izole edilen 11 farklı laktobasilin sitratı kullanmadıklarını belirlemiştir. Weinrichter et al. (2004) fakültatif heterofermentatif laktobasiller olan *L. casei* subsp. *casei* 4000, *L. casei* subsp. *casei* 4120 ve *L. rhamnosus* 58/2'nin Emmental peynirinde destek kültür olarak kullanıldıklarında sitratı kullanarak peynirde istenilen seviyede küçük gözler oluşturduğunu ve bu sayede peynirin görünüşünü iyileştirdiğini tespit etmişlerdir. Görüldüğü gibi laktobasillerin de sitrat metabolizması suştan suşa farklılık göstermektedir.

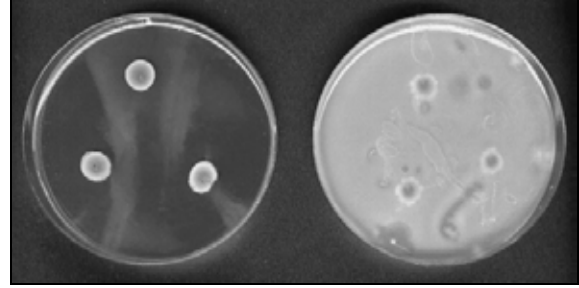
Bu bağlamda, peynir mikroflorasında bulunabilen bir çok laktobasil peynirin aroma ve lezzetine katkıda bulunan çeşitli bileşiklerin üreticileri olarak görülmektedirler (Mama et al., 2002). Bu bulgular laktobasillerin fermente süt ürünlerindeki lezzet gelişimine katkıda bulunabilecek bir metabolik potansiyele sahip mikroorganizmalar olduğunu göstermektedir.

### 3. LAKTOBASİLLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Laktik asit bakterilerinin süt ürünlerindeki önemli rollerinden birisi potansiyel patojenlerin inhibe edilmesidir. Bu inhibitör etki genel olarak laktik asit üretimi ve pH'nın düşüşü ile ilişkilidir. Bunun yanında laktik asit bakterileri organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit, bakteriosinler ve bakteriosin benzeri çeşitli antimikrobiyal maddeler üretirek de bu inhibitör etkiyi gösterebilmektedirler. Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada Caridi (2003) Pecorino del Poro peynirinden toplam 225 laktik asit bakterisi izole etmiş, bunlardan 18 tanesinin *E. coli*'ye karşı antagonistik aktivitesini incelemiş ve 9 laktobasilin antagonistik aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmada *L. paracasei* ssp. *paracasei* ve *L. curvatus*'un *E. coli*'ye karşı yoğun bir antagonistik aktivite gösterdiğini belirlenmiştir (Şekil 1).

Atanassova et al. (2003) sarı renkli Bulgar tipi peynirin (Bulgarian yellow cheese) üretiminde starter olarak kullanılan *L. paracasei* subsp. *paracasei* M3 suşunun antimikrobiyal aktivitesini

60'ın üzerinde bakteri ve maya türü üzerinde çalışmıştır. Araştırma sonucunda ilgili *L. paracasei* suşunun *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Helicobacter pylori*, *L. delbrueckii* suşları ve bazı maya türleri ve suşları üzerine antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Yine Valerio et al. (2004) bazı laktobasil türlerine ait suşların antifungal etkileri olan fenillaktik asit ve bunun 4-hidroksi türevini üretme kabiliyetinde olduğunu göstermiştir. Söz konusu antimikrobiyal etkiler ürünlerin raf ömrünün arttırılmasında da son derece önemli role sahiptir.



Şekil 1. *L. paracasei* ssp. *paracasei* L356 (soldaki) ve *Enterococcus durans* C310'un *E. coli* PP2'ye karşı antagonistik aktivitesinin karşılaştırılması. Resimde *E. coli*'nin gelişiminin bakteriosin benzeri bir aktivite ile inhibe edildiği görülmektedir (Caridi, 2003)

### 4. PEYİR TEKNOLOJİSİNDE LAKTOBASİLLER

Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan ya da bir çok peynir çeşidinin starter olmayan mikroflorasında dominant mikroorganizmalar olarak bulunabilen homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri bir çok peynir çeşidinin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Hansen et al., 2001; Gerasi et al., 2003; Hynes et al., 2003; Giraffa et al., 2004; Weinrichter et al., 2004). Aralarında *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'inde bulunduğu bir çok laktobasil peynir üretiminde kültür ya da destek kültür olarak kullanılabilir (Lynch et al., 1996; Palles et al., 1998; Hansen et al., 2001; Deutsch et al., 2003; Hynes et al., 2003; Banks and Williams, 2004; Giraffa et al., 2004). Aynı zamanda laktobasiller özellikle çeşitli peynir tiplerinde starter olmayan mikrofloranın önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar (Jensen et al., 2000; Rea et al., 2000; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Gerasi et al., 2003; Banks and Williams, 2004). Örneğin Macedo et al. (1995) tarafından Portekiz'de tüketilen en popüler geleneksel peynir olan Sera da Estrela'nın starter olmayan mikroflorasındaki en önemli iki laktik asit

bakterisinden birinin *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* olduğu tespit edilmiştir. Bouton et al. (1998) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*'nin İsviçre tipi sert bir peynir olan Comté'nin starter olmayan mikroflorasındaki laktobasillerden biri olduğunu bildirmektedir. Aynı şekilde Yunanistan'da üretilen Manura peynirinin olgunlaşmasında önemli role sahip mikroorganizmalardan biri *L. paracasei* subsp. *paracasei*'dir (Gerasi et al., 2003). Genel bir kanı olarak *L. paracasei*'nin süt ürünlerinde ve özellikle de yoğurt benzeri fermente ürünlerde kullanımı ile ilgili çok az sayıda çalışma olduğu düşünülmektedir (Kristo et al., 2003).

Destek kültürler; çoğunlukla laktobasillerden oluşan, peynirde lezzet oluşumunu hızlandırmak ve peynir lezzetini arttırmak amacıyla standart mezofilik starterlere ilave olarak kullanılan ve genellikle ilgili peynirin starter olmayan mikroflorasında da bulunabilen mikroorganizmalardır (Madkor et al., 2000). Peynirde bulunan mikroorganizmaların ve bu mikroorganizmaların peynir olgunlaşmasına katkılarının bilinmesi uygun olgunlaşma teknolojilerinin geliştirilmesi için gereklidir. Bu temel yaklaşımdan hareketle peynirlerin kalitesinde önemli olan mikrofloralarının belirlenmesi ve üretimde buna uygun kaliteyi artırıcı modifikasyonlar yapılmasına yönelik çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Örneğin Cheddar peynirinde starter olmayan mikrofloranın belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada farklı zamanlarda 6 süt işletmesinde üretilen ve 1 yıl ve daha uzun süre olgunlaştırılmış peynirlerde 140 laktik asit bakteri izole edilmiş ve bunlar içerisinde *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ve *Lactobacillus rhamnosus*'un dominant iki tür olduğu belirlenmiştir (Crow et al., 2001). Cheddar peynirinde laktobasiller başlangıçta düşük sayılarda ( $10^{-10}$  cfu/g) iken olgunlaşmanın 8-12 haftasında oldukça önemli sayılara ( $1 \times 10^8$  cfu/g) ulaşmaktadırlar (Palles et al., 1998). Benzer şekilde Giraffa et al. (2004) İtalyan sert ve yarı sert peynirlerinden *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*'in 89 suşunu izole etmiştir. Yine starter kültür katılmadan üretilen Tenerife keçi peynirinin mikrobiyal florasındaki değişimlerin incelendiği bir çalışmada 2 ay olgunlaşmadan sonra dominant iki mikroorganizmadan birinin *L. paracasei* subsp. *paracasei* olduğu belirlenmiştir (Zárate et al., 1997). Bu bulgulardan hareketle bir çok peynir çeşidinin starter olmayan florasından izole edilen proteolitik aktiviteleri yüksek laktobasillerin çoğaltılarak peynirlerde kültür ya da destek kültür olarak kullanımlarının daha kaliteli peynirlerin üretimi açısından etkin bir yaklaşım olacağı açıkça görülmektedir. Konu ile ilgili olarak Türkiye'de yapılan çalışmaların birinde starter kültür

kullanılmadan üretilen salamura koyun peynirlerinin mikroflorası araştırılmıştır (Durlu-Ozkaya et al., 2001). Çalışmada 17 farklı peynir örneğinden izole edilen toplam 77 laktik asit bakterisinden 17 tanesinin laktobasil olduğu ve bu laktobasillerden 3 tanesinin *L. paracasei* subsp. *paracasei*, 14 tanesinin de *L. plantarum* olduğu belirlenmiştir.

Peynir lezzeti üzerine etkili bileşiklerin önemli bir bölümü starter bakterilerin etkileriyle oluşmaktadır. Starter bakterilerin erken lizisi, hücre içi enzimlerin substratlara daha kolay ulaşmasını sağlamakta ve bu durum peynir lezzetinin gelişimini hızlandırabilmektedir (Valence et al., 2000; McSweeney, 2004). Bu güne kadar starter bakterilerin lizis'ini arttırmak için kullanılan yaklaşımlardan birisi otolitik starter bakterilerin seçimidir (Oumer et al., 2001). Laktobasillerin bazı otolitik suşları peynir teknolojisinde olgunlaşmayı hızlandırmak ve lezzet gelişimini arttırmak amacıyla kullanılabilir (Valence et al., 2000). İsviçre tipi peynir yapımında starter olarak kullanılan ve erken lizise uğrayan *L. helveticus*'un lizisi daha çok litik bakteriyofajlarla ilgili bulunmuştur. Ancak bazı suşlar otolitik aktivite gösterebilmekte ve erken lize olarak olgunlaşmayı hızlandırmaktadırlar. Konu ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmaların birinde Deutsch et al. (2003), üretimde starter olarak kullanılan *L. helveticus* CNRZ 303'in otolisin aktivitesiyle lize olduğunu ve olgunlaşmaya önemli katkıları olduğu bildirmişlerdir.

## 5. PROBIYOTİK OLARAK LAKTOBASİLLER

İlk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından antibiyotik ve flora üzerindeki diğer antimikrobiyal maddelerin patojen olmayan bakterilerin yararlı ("Probiotika") etkileriyle ilişkisinin anlatıldığı "Anti- und Probiotika" isimli makalede kullanılan "Probiyotik" terimi (Corthier, 2004), 1989 yılında Roy Fuller tarafından "tüketici sağlığına bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkıları" olarak tanımlanmıştır (Fuller, 1989). Probiyotiklerle ilgili olarak günümüze kadar en çok kabul görmüş olan bu tanım, 1998 yılında Salminen ve arkadaşları tarafından "insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yemler ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar" olarak değiştirilmiştir (Salminen et al., 1998). Probiyotik terimi genellikle fermente süt ürünleri ya da diyet katkısı olarak alınabilen biyolojik aktiviteleri ve intestinal sistemde canlılıklarını sürdürme ve yaşama kabiliyetleriyle tanımlanan *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.

ve *Enterococcus* spp. gibi seçilmiş laktik asit bakterilerini ifade etmek için kullanılmaktadır (Rafter, 2002).

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan probiyotikler laktobasiller'dir (Ouwehand et al., 2002). Buna gerekçe olarak probiyotiklerin olumlu etkilerine ait ilk bilimsel teorilerin laktobasil'ler ile ilgili olması gösterilmektedir (Ouwehand et al., 2002; Ross et al., 2002). 1903 yılında "fagosit" teorisi ile Nobel Ödülü alan Rus biyolog Elie Metchnikoff, yaşlanmanın bağırsaklardaki bakterilerin neden olduğu kronik-pütrefaktif bir zehirlenme olduğunu ileri sürmüştür. Metchnikoff, günlük diyetlerinin düzenli bir parçası olarak laktobasil içeren yoğurt yiyen Bulgar'ların fark edilir derecede uzun ömürlü oldukları bulgusuna dayanarak laktik asit bakterilerinin ömrü uzattıkları yolundaki teorisini ileri sürmüştür. O günlerde bağırsak sistemindeki zararlı bakterilerin sayısının, laktik asit bakterilerinin enjeksiyonu yolu ile azaltılabileceği teorisi insanlarda bir duyarlılık yaratmış ve bunun bir sonucu olarak yoğurt tüm dünya da popüler bir gıda maddesi durumuna gelmiştir (Kaptan, 2000; Ross et al., 2002).

Laktik asit bakterileri ve özellikle laktobasiller 1915 yılından beri bağırsak florasını düzenlemek ve enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadırlar (Kılıç, 2001). Klein et al. (1998) probiyotik uygulamalarda kullanılan laktobasilleri; *L. acidophilus* grubu, *L. casei* grubu ve *L. reuteri-fermentum* grubu olmak üzere 3 alt grupta incelemiştir. Bunlardan *L. casei* grubu; *L. casei*, *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* olmak üzere başlıca üç bakteriyi kapsamakta ve bu üç tür de insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanılabilir.

Probiyotik olarak kullanımda *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*, *L. casei* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* dikkati çeken laktobasil türleri arasındadır. *L. paracasei* subsp. *paracasei* suşları genel olarak probiyotik mikroorganizmalardır (Sanders and Klaenhammer, 2001). Yapılan çalışmalarda *L. paracasei* F19 suşunun yetişkin ve çocukların bağırsak mukozasına iyi yapışma özelliğinde olduğu tespit edilmiştir (Kirjavainen et al., 1998). Yine Holzapfel and Schillinger (2002) *L. paracasei*'nin immun sistemin modülasyonu ve gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde (özellikle diyareler) probiyotik olarak olumlu sonuçlar verdiğini belirtmektedirler.

Probiyotik bakteri kültürlerinin kullanımına başlanmasından bu yana bunların taşıyıcısı olarak kullanılan en popüler gıda sistemleri yoğurt ve fermente süt gibi taze fermente olmuş ürünler ya da yeterli sayıda canlı probiyotik kültür ilave edilmiş fermente olmamış ürünlerdir. Genişleyen probiyotik ürün sınıfı içindeki yoğunlaşan çalışmalarda, çok az sayıda araştırmacı ve süt işletmesi yüksek sayıda probiyotik kültür içeren peynir çeşitlerinin üretimi konusunda çalışmışlardır (Stanton et al., 1998). Konu ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin bir çok peynir çeşidinin üretiminde başarıyla kullanılabilirliği gösterilmiştir. Probiyotik bakterilerin ürünlere ilavesindeki başarı; kullanılan tür ve suş, üretimde kullanılan laktik asit bakterilerinin aktivitesi, peynir kompozisyonu, üretim ve olgunlaşma koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Peynirlere probiyotik laktobasillerin ilavesi ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalar Tablo 1'de verilmiş ve bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Tablo 1. Laktobasillerin Kullanıldığı Bazı Probiyotik Peynir Geliştirme Çalışmaları

Peynir çeşidi	Kullanılan probiyotik bakteri suşu	Kaynak
Sarı renkli Bulgar peyniri	<i>L. paracasei</i> M3	Atanassova et al., 2001
Cheddar	<i>L. paracasei</i> NFBC 338 <i>L. paracasei</i> NFBC 364	Gardiner et al., 1998 Stanton and Ross, 2000
Gouda	<i>L. acidophilus</i> Ki	Gomes et al., 1995; Gomes et al., 1998
Salamura beyaz peynir	<i>L. acidophilus</i> LA-5	Yılmaztekin et al., 2004
Yarı sert keçi peyniri	<i>L. acidophilus</i>	Gomes and Malcata, 1998
Fresco	<i>L. acidophilus</i> A-1, A-2	Vinderola et al., 2000
Fresco	<i>L. casei</i> C-1, C-2 <i>L. casei</i> LC301	Vinderola et al., 2000 Gummalla and Broadbent, 1999

Probiyotik peynir üretiminde laktobasillerin kullanımı ile ilgili olarak Vinderola et al. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, ünlü bir Arjantin peyniri olan Fresco'nun üretiminde probiyotik bakterilerin kullanım olanakları araştırılmıştır. Çalışmada 60 günlük peynir olgunlaşması boyunca *L. casei* ve *L. acidophilus*'a ait suşların da aralarında bulunduğu probiyotik bakterilerin peynirlerdeki sayıları takip edilmiş ve probiyotik

bakteri sayılarının  $10^6$  kob/g değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Yine Madkor et al. (2000) Cheddar peyniri üretiminde *L. helveticus* ve *L. casei* kültürlerini destek starter olarak kullanmış ve 6 aylık depolama süresince peynirlerdeki probiyotik bakteri sayılarının  $10^6$  kob/g değerinin altına düşmediğini tespit etmiştir. Konu ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada *L. acidophilus* kullanarak keçi sütünden yarı sert keçi peyniri üretilmiş ve üretilen peynirin

70 gün olgunlaşma süresindeki mikrobiyolojik, kimyasal ve tekstürel özellikleri değerlendirilmiştir (Gomes and Malcata, 1998). Çalışmada *Lactobacillus acidophilus*'un peynirdeki konsantrasyonunun  $6 \times 10^7$  kob/g seviyesini aşmadığı ve probiyotik etki seviyesi olarak değerlendirilen  $10^6$  kob/g eşik değerinin altına düşmediği görülmüştür. Aynı zamanda çalışmada kullanılan probiyotik kültürlerin olgunlaşma üzerinde de pozitif etkileri olduğu belirtilmiştir. Yine Gomes et al. (1998) keçi sütünden *Lactobacillus acidophilus* Ki ( $1.0 \times 10^7$  kob/g) bakterisi kullanılarak yapılan probiyotik peynirin, kimyasal ve tekstürel özellikleri üzerine olgunlaşma sıcaklığı (5 °C ve 10 °C), relatif nem (% 85 ve % 95) ve olgunlaşma süresinin (1 gün ve 70 gün) etkilerini incelemiştir. Peynirde izlenen bütün proteolitik aktivite göstergelerinin olgunlaşma sıcaklığındaki artışa bağlı olarak arttığı ve bu muamelenin proteolizi relatif nem artışından daha fazla etkilediği belirlenmiştir. Peynirin serbest yağ asitleri konsantrasyonu relatif nem miktarındaki artışlardan etkilenmemiş, ancak olgunlaşma sıcaklığı ve süresi söz konusu konsantrasyon değerlerini arttırmıştır. Yine yüksek olgunlaşma sıcaklığı ve düşük relatif nemin peynir sertliğini arttırdığı görülmüştür (Gomes et al., 1998). Peynirlerin geleneksel mikroflorasında bulunan enterokokların da çeşitli probiyotik etkileri görülebilmektedir. Örneğin Caridi (2003) ve Atanassova et al. (2003) tarafından yapılan çalışmalarda Pecorino del Poro ve sarı renkli Bulgar tipi peynirlerden izole edilen laktobasillerin antimikrobiyal aktiviteleri olduğu belirlenmiştir. Söz konusu bakterilerin peynirlerden izole edilerek bağırsak sistemindeki davranışlarının ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi bu mikroorganizmaların probiyotik peynirlerin üretimlerinde kullanım potansiyellerinin tespiti açısından oldukça önemlidir.

## 6. SONUÇ

Laktobasiller çiğ ve pastörize süten yapılan geleneksel peynirlerin olgunlaşma ve aroma gelişiminde önemli rol oynayan ve peynire ilave edildiğinde duyu özellikleri üzerine pozitif etkileri olabilen mikroorganizmalardır. Starter ya da destek kültür olarak kullanılabilirler gibi starter olmayan mikroflorada da bulunan bu mikroorganizmaların asidifikasyon, proteolitik aktivite ve lipolitik özellikleri suşlara göre farklılıklar göstermektedir. Özellikle son 10 yıldır yapılan çalışmalar laktobasillerin proteolitik sistemlerinin tanımlanmasına yönelmiştir. Laktobasiller tarafından (özellikle starter olmayan mikrofloradaki) sitratın metabolize edilmesi asetaldehit, etanol, diasetil, aseton ve aseton gibi

lezzete katkıda bulunan bir seri uçucu bileşimin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Laktobasillerin hem bakteriosin, bakteriosin benzeri maddeler ve diğer antimikrobiyal bileşikler üreterek patojenleri inhibe etmesi hem de bazı suşların otolizi nedeniyle olgunlaştırmayı hızlandırmaları peynir teknolojisinde kullanımlarını destekleyici niteliktedir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan probiyotikler olan laktobasiller, 1915 yılından beri bağırsak florasını düzenlemek ve enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadırlar. Probiyotik uygulamalarda kullanılan laktobasiller; *Lactobacillus acidophilus* grubu, *Lactobacillus casei* grubu ve *Lactobacillus reuteri-fermentum* grubu olmak üzere 3 alt grupta incelenebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile probiyotik laktobasillerin bazı peynir çeşitlerinin üretiminde başarıyla kullanılabilirliği belirlenmiştir. Ülkemizde konu ile ilgili çalışmalar oldukça yetersizdir. Peynir endüstrisinde dünya üzerindeki yeni eğilimler göz önüne alınarak, ülkemizde en çok üretilen peynir türlerinin probiyotik kültürlerden yararlanılarak üretimi, ülkemiz insanının sağlıklı bir şekilde beslenmesini teşvik edeceği açıktır. Bunun yanında böyle bir girişim sadece sağlık ve beslenme açısından değil, ülkemiz peynir endüstrisinin ürün yelpazesini genişletecek ve değeri artırılmış peynir türlerinin imalatı ve satışı peynir üreticilerinin piyasadaki pazar payını da arttıracaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Atanassova, M. R., Chipeva, V., Ivanova, I., Haertle, T. 2001. Determination of the Growth Stages of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 from Bulgarian Yellow Cheese by Electroconductivity. J. Microbiol. Methods 46: 227-233.
- Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle, T. 2003. Isolation and Partial Biochemical Characterization of A Proteinaceous Anti-Bacteria and Anti-Yeast Compound Produced By *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei* Starin M3. Int. J. Food Microbiol. 87: 63-73.
- Banks, J. M., Yvon, M., Gripon, J. C., De la Fuente, M.A., Brechany, E.Y., Williams, A.G., Muir, D. D. 2000. Enhancement of Amino Acid Catabolism in Cheddar Cheese Using  $\alpha$ -Ketoglutarate: Amino Acid Degradation in Relation to Volatile Compounds and aroma character. Abstracts of IDF Symposium: Cheese Ripening and Technology, March 2000, Banff, Canada, 25p.
- Banks, J. M., Williams, A.G. 2004. The Role of the Nonstarter Lactic Acid Bacteria in Cheddar Cheese Ripening. Int. J. Dairy Technol. 57 (2/3): 145-152.



- Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, R. 1998. Preliminary Characterization of Microflora of Comte cheese. *J. Applied Microbiol.* 85: 123-131.
- Caridi, A. 2003. Identification and First Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Artisanal Ovine Cheese Pecorino del Poro. *Int. J. Dairy Technol.* 56 (2): 105-110.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. 1999. Peptidases and Amino Acid Catabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76 : 217-246.
- Corthier, G. 2004. The Health Benefits of Probiotics. Danone Nutritopics No : 29, March 2004, Route Departementale 128, 91767 Palaiseau Cedex, France, 17 p.
- Crow, V., Curry, B., Hayes, M. 2001. The Ecology of Non-Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) and Their Use As Adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* 11: 275-283.
- Deutsch, S. M., Neveu, A., Guezenec, 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.
- Dicks, L. M. T., Du Plessis, E.M., Dellaglio, F., Lauer, E. 1996. Reclassification of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. Rev., Designation of ATCC 334 as Neotype of *L. casei* Subsp. *casei*, and Rejection of the Name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 337-340.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Technologically Important Properties of Lactic Acid Bacteria Isolates From Beyaz Cheese Made From Raw Ewes' Milk. *Journal of Applied Microbiology* 91: 861-870.
- Fenster, K. M., Rankin, S. A., Steele, J. L. 2003. Accumulation of short n-chain Ethyl Esters by Esterases of Lactic Acid Bacteria Under Conditions Simulating Ripening Parmesan cheese. *J. Dairy Sci.* 86: 2818-2825.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 1998. Development of a probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2192-2199.
- Gerasi, E., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. 2003. Microbiological study of Manura, a Hard Cheese Made From Raw Ovine Milk in the Grek Island Sifnos. *Int. J. Dairy Technol.* 56 (2): 117-122.
- Giraffa, G., Andrighetto, C., Antonella, C., Gatti, M., Lazzi, C., Marcazzan, G., Lombardi, A., Neviani, E. 2004. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Strains of Dairy origin. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 129-139.
- Gomes, A. M. P., Malcate, F. X., Klaver, F. A. M., Grande, H. G. 1995. Incorporation and Survival of Bifidobacterium sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a Cheese Product. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49: 71-95.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F. X. 1998. Development of Probiotic Cheese Manufactured From Goat Milk: Response Surface Analysis Via Technological Manipulation. *J. Dairy Sci.* 81: 1492-1507.
- Gomes, A. M. P., Silva, M. L. P. C., Malcata, F. X. 1998. Caprine Cheese With Probiotic Starins: The Effect of Ripening Temperature and Relative Humidity on Proteolysis and Lypolysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207: 386-394.
- Gummalla, S., Broadbent, J. R. 1999. Tryptophan Catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* Cheese Flavor Adjuncts. *J. Dairy Sci.* 82: 2070-2077.
- Hammes, W. P., Vogel, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In "The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria Volume: 2", Editors: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, SE1 8HN, UK, 19-55p.
- Hansen, B.V., Houlberg, U., Ardö, Y. 2001. Transamination of Branched-chain Amino Acids by a Cheese Related *Lactobacillus paracasei* strain. *Int. Dairy J.* 11: 225-233.
- Holzapfel, W. H., Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and Probiotics. *Food Research International* 35(2/3): 109-116.
- Hynes, E. R., Bergamini, C.V., Suarez, V. B., Zalazar, C. A. 2003. Proteolysis on Reggianito Argentino Cheeses Manufactured With Natural Whey Cultures and Selected Strains of *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 86: 3831-3840.
- Jensen, D. F., Nemcova, L., Antonsson, M., Moller, P. L., Vogensen, F. K., Nielsen, E. W., Ardö, Y.

2000. Proteolytic Activity in Milk of Facultative Heterofermentative Lactobacilli Isolated From Cheese. Abstracts of IDF Symposium: Cheese Ripening and Technology, March 2000, Banff, Canada, 111 p.
- Kaptan, H. 2000. Bifidobakteriler: Karakteristik Özellikleri, İnsan Sağlığındaki Roller ve Süt Ürünlerindeki Potansiyel Kullanımları. Gıda 25 (6): 459-465.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. Int. J. Food Microbiol. 41: 103-125.
- Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K., Langsrud, T. 2001. Metabolism of Amino Acids by Resting Cells of Non-starter Lactobacilli in Relation to Flavour Development in Cheese. Int. Dairy J. 11: 217-224.
- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Salminen, S. J. 1998. The Ability of Probiotic Bacteria to Bind To Human Intestinal Mucus. FEMS Microbiology Letters, 167 (2): 185-189.
- Kristo, E., Biliaderis, C.G., Tzanetakis, N. 2003. Modelling of Rheological, Microbiological and Acidification Properties of A Fermented Milk Product Containing A Probiotic Strain of *Lactobacillus paracasei*. Int. Dairy J. 13: 517-528.
- Law, J., Haandrikman, A. 1997. Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria. Int. Dairy J. 7: 1-11.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinana, F. D. 1996. Manufacture of Cheddar Cheese With and Without Adjunct Lactobacilli Under Controlled Microbiological Conditions. Int. Dairy J. 6: 851-867.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., Hogg, T.A. 1995. Microbiological Profile in Sera ewes' Cheese During Ripening. J. Appl. Bacteriol. 79(1): 1-11.
- Macedo, A. C., Vieira, M., Poças, R., Malcata, F. X. 2000. Peptide Hydrolase System of Lactic Acid Bacteria Isolated From Sera da Estrela cheese. Int. Dairy J. 10: 769-774.
- Madkor, S. A., Tong, P. S., El Soda, M. 2000. Ripening of Cheddar Cheese With Added Attenuated Adjunct Cultures of Lactobacilli. J. Dairy Sci. 83: 1684-1691.
- Mama, V., Hatzikamari, M., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulus-Tzanetaki, E. 2002. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* heterogeneity: the diversity among strains isolated from traditional greek cheeses. Ital. J. Food Sci. 4 (14): 351-362.
- McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J. 2000. Biochemical Pathways for the Production of Flavour Compounds in Cheeses During Ripening: A review. Lait 80: 293-324.
- McSweeney, P. L. H. 2004. Biochemistry of Cheese Ripening. Int. J. Dairy Technol. 57(2-3): 127-144.
- 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 Research 68: 117-1219.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an Overview of Beneficial Effects. Antonie Van Leeuwenhoek 82: 279-289.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S., Cogan, T.M. 1998. Citrate Metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. J. Applied Microbiol. 85: 147-154.
- Rafter, J. 2002. Lactic Acid Bacteria and Cancer: Mechanistic Perspective. British Journal of Nutrition 88 (Suppl. 1): 89-94.
- Rea, M.C., Cogan, T. M., Beresford, T. P. 2000. Amino Acid Catabolism by Non Starter Lactic Acid Bacteria Isolated From Cheddar Cheese. Abstracts of IDF Symposium: Cheese Ripening and Technology, March 2000, Banff, Canada, 81 p.
- Rea, M.C., Cogan, T.M. 2003. Glucose Prevents Citrate Metabolism by Enterococci. Int. J. Food Microbiol. 88: 201-206.
- Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K., Stanton, C. 2002. Cheese Delivering Biocultures-probiotic Cheese. Aust. J. Dairy Technol. 57: 71-78.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I. 1998. Functional food Science and Gastrointestinal Physiology and Function. British Journal of Nutrition 80 (Suppl. 1): 147-171.
- Sanders, M. E., Klaenhammer, T. R. 2001. Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a probiotic. J. Dairy Sci., 84: 319-331.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. 1998. Probiotic Cheese. *Int. Dairy Journal*, 8: 491-496.

Stanton, C., Ross, R. P. 2000. New Probiotic Cheddar Cheese. End of Project Report. ISBN: 1 84170 122 X, ARMIS No. 4266, DPRC No. 29. Irish Agriculture and Food Development Authority, Dairy Products Research Centre Teagasc, Moorepark, Fermoy, Co., Cork, Ireland.

Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. 2000. Characterization of *Lactobacillus* Isolates From Infant Faeces as Dietary Adjuncts. *Food Microbiol.* 17: 205-215.

Valence, F., Deutsch, S-M., Richoux, R., Gagnaire, V., Lortal, S. 2000. Autolysis and Related Proteolysis in Swiss Cheese for two *Lactobacillus helveticus* Strains. *J. Dairy Research* 67: 261-271.

Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., Visconti, A. 2004. Production of Phenyllactic acid by Lactic Acid Bacteria: an Approach to the Selection of Strains Contribution to food Quality and Preservation. *FEMS Microbiol. Letters* 233: 289-295.

Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J. A. 2000. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in

Argentinian Fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 1905-1911.

Yılmaztekin, M., Ozer, B, Atasoy, F. 2004. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in White-brined Cheese. *Int. J. Food Sci. & Technol.* 55 (1): 53-60.

Yvon, M., Rijnen, L. 2001. Cheese Flavour Formation by Amino Acid Catabolism. *Int. Dairy J.* 11: 185-201.

Weinrichter, B., Sollberger, H., Ginzinger, W., Jaros, D., Rohm, H. 2004. Adjunct Starter Properties Affect Characteristic Features of Swiss-type Cheese. *Nahrung* 48 (1): 73-79.

Williams, A.G., Withers, S.E., Banks, J. M. 2000. Energy Sources of Non-starter Lactic Acid Bacteria Isolated From Cheddar Cheese. *Int. Dairy J.* 10 (1-2): 17-23.

Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria Volume: 2, First Edition, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, SE1 8HN, UK, 398 p.

Zárate, V., Belda, F., Pérez, C., Cardell, E. 1997. Changes in the Microbial Flora of Tenerife Goats' Milk Cheese During Ripening. *Int. Dairy J.*, 7 (10): 635-641.