

## PEYNİRDEKİ PROTEOLİTİK AJANLARIN PROTEOLİZE ETKİSİ

Ahmet Erdoğan<sup>1</sup>, Alper Baran<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Erzurum

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Hınıs Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, Hınıs, Erzurum

Geliş tarihi / *Received*: 23.11.2011

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 11.01.2012

Kabul tarihi / *Accepted*: 16.01.2012

### Özet

Peynirin olgunlaşma süreci çok komplekstir ve bazı mikrobiyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içerir. Bu biyokimyasal değişikliklerden biri olan proteoliz peynirde tekstür ve lezzet gibi özelliklerin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Tekstür ve lezzete proteolizin katkısı direkt olarak peptit ve aminoasitlerin salınımıyla ya da aminoasitlerin amin, asit, tiyol ve tiyoesterlere katabolize edilmesiyle olabilir. Bu reaksiyonlar koagülant enzimleri, doğal süt proteolitik enzimleri, laktik asit bakterileri, propiyonobakteri ve farklı küf çeşitlerinden gelen proteinaz veya peptidazlar vasıtasıyla katalize edilir. Proteolize katkıda bulunan bu proteolitik ajanların aktivitesi uzunca bir süredir peynirin olgunlaşma çalışmalarına konu olmaktadır. Bu derlemede proteolize etki eden proteolitik ajanların proteolitik sistemleri, bu sistemlerin protein ve aminoasitlerin parçalama reaksiyonlarını nasıl gerçekleştirdiği ve lezzet bileşiklerinin oluşumu ele alınacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Mikrobiyel ajanlar, peynir, proteinaz, proteoliz

## EFFECT OF PROTEOLYTIC AGENTS ON PROTEOLYSIS IN CHEESE

### Abstract

The ripening process of cheese is very complex and involves some microbiological and biochemical changes. One of these biochemical changes is proteolysis in cheese plays an important role in the development of characteristics such as texture and flavour. The contribution of proteolysis to texture and flavour may be direct, by releasing peptides and amino acids, or indirect, by catabolizing amino acids to amines, acids, thioles, thioesters. These reactions are catalyzed by enzymes from coagulant, indigenous milk proteolytic enzymes, proteinases or peptidases from lactic acid bacteria, propionibacterium and different fungi strains. The activity of these proteolytic agents which contribute proteolysis has been the subjected of many cheese ripening studies for a long time. In this review, it will be dealt with proteolytic systems of proteolytic agents that affect proteolysis, these systems perform how to protein and amino acids degradation reactions and formation of flavour compounds.

**Keywords:** Cheese, microbial agents, proteinase, proteolysis

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ alper.baran@atauni.edu.tr, © (+90) 442 231 2636 ☎ (+90) 442 511 2896

## GİRİŞ

Peynirin olgunlaşması birden fazla reaksiyonun eş zamanlı ve birbiriyle bağlantılı olarak gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Bu kompleks süreç birçok araştırmacının dikkatini çekmiş ve bugüne kadar peynirin olgunlaşma süreciyle ilgili birçok çalışma yapmalarına olanak tanımıştır. Olgunlaşmanın primer olaylarını laktoz, laktat ve sitratın metabolize olması, lipoliz ve proteoliz olmak üzere 3 temel biyokimyasal reaksiyon oluşturur. Gerçekleşen primer reaksiyonların sonucu oluşan serbest yağ asitleri (SYA-FFA), organik asitler ve aminoasitler bir sonraki katabolik reaksiyonlarla kendilerinden daha küçük yapıya sahip uçucu ve uçucu olmayan lezzet bileşenlerine dönüştürülür (1, 2). Bu katabolik reaksiyonlardan biri olan proteoliz, peynirin olgunlaşması esnasında meydana gelen en kompleks dönüşüm sürecidir ve aroma, lezzet ve tekstür gelişimindeki en önemli konulardan birisidir (3).

Proteolizin lezzet ve aromaya olan katkısı peptit ve aminoasit salınımlarıyla birlikte direkt olabileceği gibi aminoasitlerin amin, asit, tiyol, tiyoester gibi son ürünlere katabolize olmasıyla indirekt olarak da gerçekleşebilir. Proteoliz ile birlikte aynı zamanda kazein matriksinin hidrolizi ve bu hidrolizde oluşan yeni amino grupları ve karboksilik aside bağlı olarak çeşitli değişiklikler meydana gelir. Meydana gelen bu değişiklikler pıhtının su aktivitesinin azalmasını sağlayarak peynirin olgunlaşması esnasında tekstürün gevşemesine katkıda bulunur (4, 5).

Peynirde proteoliz; koagülant (kimozin, pepsin), süt (plazmin, katepsin D ve diğer somatik hücre proteinazları), starter veya starter olmayan mikroorganizma kaynaklı enzimler, sekonder kültürler (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*) ve olgunlaşmayı hızlandırmak için kullanılan eksojen proteinaz veya peptidazların etkisiyle gerçekleşir (6). Bu derlemede proteolize yol açan çeşitli kaynaklardan köken alan enzimler ele alınacaktır.

### Peynirde Bulunan Proteolitik Ajanlar

#### Koagülant

Peynir yapımı sırasında sütün pıhtılaşması olayı, olgunlaşma boyunca kazeinlerin proteolizine

katılan temel olarak kimozin biçimindeki rennetin ilavesini kapsayan bir süreçtir. Genel olarak peynirdeki koagülant aktivitesi % 0-% 15 arasında değişir ve pıhtı kesme sıcaklığı, pıhtı pişirme sıcaklığı ve pH gibi faktörlerden etkilenir (7). Süt koagülantlarının peynirde bulunan özellikle peptit bağlarına olan etkisine yönelik birçok çalışma (8, 9) yürütülmüş; uzayan etki süresi veya substrat limiti gibi nedenlere bağlı olarak proteolitik degradasyonun geliştiği ve kazein fraksiyonlarının tamamen parçalandığı ileri sürülmüştür. k-kazeindeki Phe105–Met106 bağının hızlı bir şekilde hidrolizi kazein misellerinin destabilizasyonunu hızlandırır ve sütün hızlı bir şekilde koagülasyonu sonuçlanır. Peynir olgunlaşma aşamasında peptit bağlarının koparıldığı bir süreç geçirir ve bu sürecin sonunda peyniraltı suyuna doğru peptit kaybı söz konusu olabilir. Böyle bir kayıp yaklaşık olarak % 0.3-% 0.7'lik bir peynir veriminin azalmasıyla paralel olarak gerçekleşir ve peyniraltı suyunda protein içeriğinin artmasına neden olur (9).

Koagülantların pıhtıda peynirin olgunlaşmasını nasıl etkilediği noktasındaki hakim görüş olgunlaşmanın ilk aşamalarında etkisinin olduğudur. Artan koagülant miktarı peynir pıhtısında  $\alpha_{s1}$ -kazeini parçalayan enzimlerin miktarının artmasıyla ilişkilendirilir. Bu indirgeme, olgunlaşmanın ilk basamaklarında peynir tekstürünü etkilerken daha sonra etkisi ortadan kalkar (10, 11). Pepsin ve diğer koagülantların her bir zincir bağına özel spesifitesi vardır. Örneğin sığır pepsini  $\alpha_{s1}$ -kazein'in Leu109–Glu110 bağını hızlı bir şekilde koparıırken aynı bağ kimozin tarafından nispeten daha yavaş bir şekilde kopartılır. Fakat bu koagülant ajanların birçoğunun bağ noktasında sahip oldukları özel noktalarına dair bazı çalışmalar (12, 13) mevcutken bir kısım koagülantların henüz daha peynir türlerinde bu özellikleri detaylandırılmamıştır.

#### Doğal Süt Proteinazları

Peynirin pıhtılaşmasında rol oynayan enzimlerden biri de sütün sahip olduğu doğal proteinazlardır. Özellikle başta plazmin olmak üzere lizozomal aspartil proteinaz, katepsin D, B gibi enzimler 20 yıldan uzun bir süredir araştırmacıların dikkatini çekmiş ve bu konuda çalışmalara (14, 15) konu olmuştur. Sütte bulunan temel proteinaz, kazeinler

üzerine geniş bir spesifitesi bulunan ısıya dirençli serin alkali plazmindir. Bu enzim, sütte plazmin zimojeni (plazminojen), plazminojen aktivatörleri (PA), plazmin inhibitörleri ve plazminojen aktivatör inhibitörlerinden oluşan karmaşık bir sistemin parçasıdır. Sütte bulunan tüm proteinazlar kandan kaynaklanır ve süte ya çözünebilir formda (plazmin) ya somatik hücre lizozomlarıyla ya da memeli epitelyal hücreleriyle geçerler (16). Plazminin kazeinleri parçalama sırası şu şekildedir:  $\beta$ -kazein= $\alpha_{s2}$ -kazein >  $\alpha_{s1}$ -kazein. k-kazein fraksiyonunun ise bu proteinaza karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (14).

Plazminin  $\beta$ -,  $\alpha_{s2}$ - ve  $\alpha_{s1}$ -kazeinlere karşı spesifikliğı bilinmektedir. Ancak bu enzimin peynirdeki en önemli substratı  $\beta$ -kazeindir. Plazminin en önemli etkilerinden birisi,  $\beta$ -kazeini  $\gamma$ -kazein ve proteoz peptonlara parçalamasıdır. Enzim,  $\beta$ -kazeini üç noktadan hidrolize eder: Lys28-Lys29, Lys105-His106 ve Lys107-Glu108 (17).  $\alpha_{s2}$ -kazein de plazminin etkisine karşı duyarlıdır ve peynirde olgunlaşma esnasında gözlemlenen bu enzimin etkisiyle bu protein ortadan kaybolur. Fakat bu hipotezin kesin verilerle kanıtlanması gerekmektedir (18). Süt aynı zamanda somatik hücrelerden köken alan doğal proteinaz içerir. Katepsin B, D, G, H, L ve elastaz bu somatik hücrelerin içerdiği proteinazlardır. Bunlardan katepsin B'nin proteolitik aktivitesi yapılan çalışmalarla (19, 20) gösterilmiş fakat bu enzimin peynirin olgunlaşma esnasında sütteki proteolize olan etkisi tam olarak bilinmemektedir, buna karşın kazeinlerin üzerine oldukça geniş bir spesifitesi olduğu bildirilmektedir (4, 21).

Katepsin D'nin kazeinlerin üzerine özellikle  $\alpha_{s1}$ -kazeinlere olan özgüllüğü kimozone benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikten ötürü rennetle pıhtılaştırılmış peynirin olgunlaşmasında katepsin D'nin rolünü değerlendirmek güçtür. Katepsin D sütte serum fazında bulunur ve böylece büyük bir kısmı peyniraltı suyuna geçerken bir kısmı da pastörizasyon işlemiyle aktivitesini yitirir (22).

### Mikroorganizma Proteolitik Enzimleri

Peynirde gerçekleşen proteoliz olayının en önemli kaynağını Laktik asit bakterileri (LAB) oluşturur (23). LAB diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında zayıf bir proteolitik aktiviteye sahip olmasına karşın peynirin olgunlaşmasında

önemli rol oynayan birçok sayıda proteolitik sistemi yapılarında barındırmalarından ötürü olgunlaşmada önemli mikroorganizmalardır (24). Özellikle *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adı geçen özelliklerinden ötürü süt ürünü starteri olarak kullanılır ve büyük bir ekonomik öneme sahiptirler (25). LAB, sütte büyük miktarda bulunan kazeinin proteolizi ile sağlanan eksojen bir aminoasit veya peptit kaynağına ihtiyaç duyan ve güç üreyen bakterilerdir (26). Genel olarak kazeinlerin parçalanması laktik asit bakterilerince üretilen proteinleri oligopeptitlere parçalayan hücre zarfı preteinazı (CEP, PrtP) tarafından başlatılır. Oluşan bu oligopeptitler hücreye özel peptit transport sistemleri (DtpT, Dpp ve Opp) yoluyla taşınır ve çeşitli intrasellüler peptidazların ortaklaşa hareketiyle daha kısa peptit ve aminoasitlere parçalanır (27, 28).

LAB'ın proteolitik sistemi hücre dışı proteinazları (PrtP), spesifik peptit ve aminoasit transport ve bazı sitoplazmik peptidazlardan meydana gelmiştir. Bu bakterilerin sahip oldukları proteolitik sistemler biyokimyasal ve genetik özelliklerine bakılmak suretiyle tanımlanmıştır. Özellikle son 10 yıla bakıldığında çeşitli LAB'ın sahip olduğu bu sistemlerin genomları ortaya konmuştur (29). Liu ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada (30) 22 adet LAB'da peptidaz ve hücre duvarına bağlı proteinaz çeşitliliğini araştırmış PepP/PepQ/PepM, PepD ve PepI/PepR/PepL sınıfı gibi peptidaz sınıflarında bulunan bakteri gruplarındaki genomik farklılıklar alınan örneklerde genetik olarak tanımlanmıştır. Bir başka çalışmada (31) *Lactobacillus helveticus* CNRZ32'nin genom sekansından 3 adet endopeptidaz izole edilmiş ve bunlar pepO3, pepF ve pepE2 ismiyle belirlenmiştir. Bu üç endopeptidazı kodlayan genler Escherichia coli DH5 $\alpha$ 'a klonlanmış ve bu peptidazların hidroliz özgüllüğü gözlemlenmiştir. *Lactobacillus helveticus* CNRZ32'nin endopeptidazları olan PepE, PepE2, PepF, PepO, PepO2 ve PepO3'ün spesifiteleri peynirin olgunlaşma koşullarında (pH 5.1, % 4 NaCl ve 10 °C) peptid,  $\beta$ -kazein,  $\alpha_{s1}$ -kazein üzerinde gözlemlenmiş ve bu substratlar üzerine olan yüksek aktivitelerinden ötürü PepO2 ve PepO3 endopeptidazının peynirde acılığı önlemede kilit rol oynayabileceği bildirilmiştir.

LAB'dan *Lactococcus lactis*'in PrtP, *Streptococcus thermophilus*'un PrtS ve *Lactococcus rhamnosus*'un PrtR adıyla herbirine özgü hücre duvarı proteinazı (CEP) bulunur. *L. helveticus* CNRZ32 hem PrtH hem de PrtH2 aktivitesini göstermektedir. Aynı zamanda *L. helveticus* CNRZ32 kendine özgü olan PrtH3 ve PrtH4 enzimlerini üreten CEP-kodlayıcı genlere sahiptir (32, 34).

LAB'ın bir alt sınıfı olan ve geçmişte hijyenik olmayan koşullarda sütün elde edilmesi sonucu peynirde oluştuğu günümüzde ise peynirde lezzet ve tekstürün oluşmasına yardımcı olduğu bildirilen Enterokok mikroorganizmaları da proteolize katkıda bulunur (35, 36). Topisirovic ve ark. fermente ürünlerden elde ettikleri 26 enterokok türünün proteolitik ve antimikrobiyel özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada (37)  $\beta$ -kazein'e karşı 25 enterokok türünün güçlü veya orta derecede proteolitik aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Bu izolatlardan olan BGPT1-10P ve BGPT1-78 türlerinin jelatinin yanı sıra  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ -, k- kazein fraksiyonları ve total kazeinde en yoğun hidrolizi gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Bu türlerde bulunan ekstrasellüler proteinaz yaklaşık 29 kDa'lık bir moleküler kitleye sahipti.

Propiyonik asit bakterileri (PAB) İsviçre-tip peynirlerde dominant flora olarak bulunur ve olgunlaşma periyodu esnasında peynirin gramında  $\approx 10^9$  koloni sayısına ulaşır. Bu bakterilerin proteoliz üzerine olan katkısı hakkındaki bilinenler LAB'ın ki kadar açık değildir. Buna rağmen yapılmış az sayıda çalışmayla (38, 39) proteolize olan etkileri gösterilmeye çalışılmıştır. Sahlström ve ark. (40) biri *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *sbermanii* ATCC 9614 diğeri de *P. freudenreichii* subsp. *sbermanii* INF- $\alpha$  olmak üzere 2 türden iki hücre duvarı peptidazı izole etmişlerdir. Bu enzimlerin hücre dışından köken alan kazein peptidlerinin ilk parçalanma basamağında görev yaptıkları saptanmıştır. Aynı şekilde El soda ve ark. (41), *Propionobakteri* 'lerin intrasellüler peptidaz sistemlerine dair çalışma yapmış ve çalıştıkları 7 alt türün aminopeptidaz, dipeptidaz ve kazeinolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Özellikle mavi damarlı peynirlerde diğer olgunlaştırılmış peynirlere göre kazeinlerin parçalanması reaksiyonları daha yoğundur. Bu peynirlerde olgunlaşmanın sonunda  $\alpha_{s1}$ -kazein

bağları hemen hemen parçalanır ve yine bu süreç içerisinde  $\beta$ -kazeinlerde yoğun bir şekilde parçalanarak proteoliz süreci devam ettirilir. Gerçekleşen kazeinlerin bu yoğun parçalanma reaksiyonu *Penicillium roquefortii*'nin sahip olduğu proteinazların aktivitesiyle şekillenir (42, 44). *Penicillium roquefortii* türleri proteolitik aktivitesi ile bazı mavi peynirlerin organoleptik özellikleri ve tekstürün gelişimine katkıda bulunur. *Penicillium* türlerinin genomu bazı proteazları yapılarında kodlamışlardır. Özellikle ekstrasellüler proteaz olan aspartilproteaz (AspA), *P. roquefortii* türleriyle yakından ilgilidir. Fernández-Bodega ve ark. (45) *P. roquefortii* türlerinin proteolitik etkilerini inceledikleri çalışmada yöresel peynirlerden elde ettikleri *P. roquefortii*'ye ait 3 türde yüksek proteolitik aktivite gözlemlerken *P. roquefortii* CECT 2905 adlı ticari olarak satılan türde ekstrasellüler proteolitik aktivite çok zayıf bir şekilde belirlenebilmiştir.

*Geotrichum candidum* Camambert ve yarı-sert peynirlerin yüzey florasında bulunan önemli bir küf gurubudur. Bu küf gurubunun peynirlerdeki proteoliz üzerine olan etkisi *G. candidum*'un yüzey florası olarak kullanıldığı ve kullanılmadığı peynirlerde yapılan bir çalışmayla (46) tespit edilmiştir. Sonuçlar *G. candidum*'un peynir yüzeyinde olduğu peynirlerde yoğun proteolitik aktivite gösterdiğini ve *G. candidum*'un hem primer hem de sekonder proteolize katkıda bulunabileceğini ortaya koymuştur. Olgunlaşmanın 2. haftasından başlamak üzere sonuna doğru artan serbest aminoasit miktarı bu küf gurubunun proteolize olan katkısını ortaya koymaktadır.

*Penicillium camembertii* biri asit diğeri nötr proteinaz olmak üzere 2 adet ekstrasellüler proteinaz sentezlemektedir. Nötr proteinaz pH'nın 4.6 olduğu durumda eriyebilir azotta büyük bir artışa sebep olurken serbest aminoasit üretimi üzerine olan etkisi oldukça azdır. *P. camembertii* aynı zamanda ekzopeptidaz üretmektedir: bunlar ekzosellüler asit karboksipeptidaz, misele bağlı nötr karboksipeptidaz ve ekzosellüler aminopeptidazdır (47).

### **Proteoliz Sonucu Oluşan Bileşenler ve Lezzet Oluşumuna Katkıları**

Peynirde bulunan proteolitik ajanların etkisiyle meydana gelen proteolizle birlikte serbest amino

asitler oluşturulur. Oluşturulan bu aminoasitler, yine proteolitik ajanların etkisiyle amino asit katabolizması sırasında çeşitli lezzet bileşenlerine dönüştürülür. Gerçekleştirilen bu biyokimyasal reaksiyonlar daha çok peynirde bulunan mikroorganizmaların sahip olduğu ekzo ve endo özellikteki enzimler yolu ile meydana gelmektedir. Olgunlaşma esnasında görülen proteoliz olayının sonucu olarak kazein molekülleri kendilerinden daha küçük yapıya sahip aminoasitlere katabolize edilirler. Oluşan dallı zincirli aminoasitler (valin, lösin ve izolösin), aromatik aminoasitler (tirozin, triptofan, fenilalanin) ve sülfürlü amino asitler (metionin ve sistein) lezzet bileşiklerinin oluşumunda rol oynayan temel amino asit kaynaklarıdır. Bu aminoasitlerin lezzet bileşenlerine dönüşümü transaminasyon ve eliminasyon olmak üzere iki yol izlenerek gerçekleştirilir (48).

Transaminasyon yolu bakterilerin sahip oldukları aminoasitleri  $\alpha$ -keto asitlere dönüştüren aminotransferaz ile başlatılır. Daha sonraki aşamada ise  $\alpha$ -keto asitler önemli aroma bileşeni olan hidroksiasitlere, aldehitlere ve CoA-esterlere dönüştürülür. Meydana getirilen aldehitler, esteraz ve açıl-transferazların substrat dönüşümlerinde rol oynayan alkollere ve organik asitlere dehidrojenize veya hidrojenize edilir (49). Bu işlemlerde proteoliz olayında meydana gelen bu prekürsör maddelerin yalnızca aminoasitlerden lezzet bileşenlerinin oluşturulmasını sağlamadığı aynı zamanda lipoliz olayının gerçekleşmesinde de rol oynadığı fikrine varılabilir. Yapılan çalışmalar (50,51) dallı zincirli aminoasitlerin, aromatik amino asitlerin ve metioninin transaminasyon yolu ile katabolize edildiğini ortaya koymuştur. Eliminasyon yolu ise daha çok karbon-sülfür liyazın aktivite gösterdiği metanetiol oluşumuyla sonuçlanan metionin katabolizması için bildirilmiştir (52).

Dallı zincirli aminoasitler maltımsı lezzet özelliğindeki spesifik aldehitlere, meyvemsi ve alkoloik lezzet özelliğine sahip alkollere ve tatlı, ekşi, ransit, çürük, meyvemsi ve yağimsı lezzet özelliğindeki asitlere katabolize edilirler. Aromatik aminoasitler gül, çiçek ve çikolata gibi lezzetlerin yanı sıra kimyasal, putrit ve fekal lezzet oluşumuna katkıda bulunan bileşenlere katabolize edilir. Bu lezzet özelliklerinden bazıları peynirdeki lezzet bozukluklarının sebebi olarak düşünülmektedir ve bu nedenden ötürü starter türleri bu bileşenlerin üretimini sınırlandırmak üzere seçilir (53).

## SONUÇ

Proteoliz olayı peynirde bulunan birçok proteolitik ajanın ortaklaşa aktivitesiyle meydana gelmektedir. Peynirde gerçekleşen bu proteoliz olayı farklı peynir çeşitlerinin olgunlaşma derecesinin tespiti amacıyla birçok araştırmaya konu olmuştur. Gerçekleşen bu biyokimyasal olayın provoke edici ajanlarının etkisi ayrıca kendisine bir araştırma alanı oluşturmuş, yapılan çalışmalarda başta laktik asit bakterileri olmak üzere sütün orijinal enzimleri, Propiyonobakteri türleri, Geotrichium ve Penicillium gibi küf türlerinin proteolitik özelliğe sahip bazı enzimleri yapılarında barındırdığı belirlenmiştir. Bu enzimler sütte bulunan proteinler için özgüllük göstermekte olup parçalanmalarına yol açarak hem lezzet oluşumunda rol oynayan aminoasitlerin ortaya çıkmasına hem de bu aminoasitlerin katabolik reaksiyonlarla yine daha etkili lezzet bileşenlerine dönüştürülmesinde rol oynamaktadırlar.

Süregelen bu çalışmalara rağmen halen daha birçok mikroorganizmanın bu reaksiyonları gerçekleştirmesinde rol oynayan enzim profili ve aktiviteleri tam olarak anlaşılamamıştır. Peynirde proteolize sebep olan majör etkenlerden olan mikroorganizmaların gelecekte genetik ve biyokimyasal tekniklerle proteolitik özelliklerinin ortaya tam olarak konulmasıyla birlikte gıda sektöründe olgunlaşmayı daha kısa sürede ve daha etkili hale getirecek proteolitik ajan kombinasyonunun ortaya konulmasına olanak sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

1. Marilley L, Casey MG. 2004. Flavors of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol*, 90 (2), 139-159.
2. Rodriguez-Saona LE, Subramanian A, Alvarez VB, Harper WJ. 2011. Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy. *Int Dairy J*, 21 (6), 434-440.

3. Delgado FJ, Rodriguez-Pinilla J, Gonzalez-Crespo J, Ramirez R, Roa I. 2010. Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *Int J Food Sci Technol*, 45 (3), 512-519.
4. McSweeney PLH, 2004. Biochemistry of cheese ripening. *Int J Dairy Technol*, 57 (2-3), 127-144.
5. Teiada L, Abellan A, Cayuela JM, Martinez-Cacha A, Fernandez-Salguero J. 2008. Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *Int Dairy J*, 18 (2), 139-146.
6. Pereira CI, Gomes EO, Gomes AMP, Malcata FX. 2008. Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chem*, 108 (3), 862-868.
7. Wilkinson MG, Kilcawley KN. 2005. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int Dairy J*, 15 (6-9), 817-830.
8. Pino A, Prados F, Galan E, McSweeney PLH, Fernandez-Salguero J. 2009. Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Res Int*, 42 (3), 324-330.
9. Jaros D, Jacob M, Rohm H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int J Dairy Technol*, 64 (1), 14-33.
10. Candiotti MC, Alonso MJ, Hynes E. 2007. Influence of residual milk-clotting enzyme and proteolysis on melting properties of soft cheese. *Int J Dairy Technol*, 60 (3), 175-181.
11. Bansal N, Fox PF, McSweeney PLH. 2009. Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties. *J Dairy Res*, 76 (3), 290-293.
12. Esteves CLC, Lucey JA, Pires EMV. 2002. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *Int Dairy J*, 12 (5), 427-434.
13. Cabezas L, Vioque M. 2011. Sensory and chemical evaluation of two ewe's milk cheeses made with different coagulants. *Milchwissenschaft*, 66 (1), 55-57.
14. Huppertz T, Uniacke T, Kelly AL, Fox PF. 2006. Inhibition of the proteolytic activity of indigenous plasmin or exogenous chymosin and pepsin in bovine milk by blood serum. *Int Dairy J*, 16 (6), 691-696.
15. Moatsou G, Bakopanos C, Katharios D, Katsaros G, Kandarakis I, Taoukis P, Politis I. 2008. Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *J Dairy Res*, 75 (3), 262-269.
16. Kelly AL, O'Flaherty F, Fox PF. 2006. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge *Int Dairy J*, 16 (6), 563-572.
17. Aydemir O, Dervişoğlu M, Temiz H, Yazıcı F. 2008. Süt alkali proteinazı, *Gıda*, 33 (5), 235-240.
18. Fox PF, McSweeney PLH. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev Int*, 12 (4), 457-509.
19. Larsen LB, McSweeney PLH, Hayes MG, Andersen JB, Ingvartsen KL, Kelly AL. 2006. Variation in activity and heterogeneity of bovine milk proteases with stage of lactation and somatic cell count. *Int Dairy J*, 16 (1), 1-8.
20. Wedholm A, Moller HS, Lindmark-Mansson H, Rasmussen MD, Andren A, Larsen LB. 2008. Identification of peptides in milk as a result of proteolysis at different levels of somatic cell counts using LC MALDI MS/MS detection. *J Dairy Res*, 75 (1), 76-83.
21. Considine T, Healy A, Kelly AL, McSweeney PLH. 2004. Hydrolysis of bovine caseins by cathepsin B, an indigenous cysteine protease in milk. *Int Dairy J*, 14 (6), 117-124.
22. Hayes MG, Hurley MJ, Larsen LB, Heegaard CW, Magboul A, Oliveira JC, McSweeney PLH, Kelly AL. 2001. Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *J Dairy Res*, 68 (2), 267-276.
23. Irigoyen A, Ortigosa M, Juansaras I, Oneca M, Torre P. 2007. Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese. *Food Chem*, 100 (1), 71-80.

24. Oneca M, Ortigosa M, Irigoyen A, Torre P. 2007. Proteolytic activity of some *Lactobacillus paracasei* strains in a model ovine-milk curd system: Determination of free amino acids by RP-HPLC. *Food Chem*, 100 (4), 1602-1610.
25. Milesi MM, Bergamini CV, Hynes E. 2011. Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. *Food Res Int*, 44 (3), 765-773.
26. Hannon JA, Kilcawley KN, Wilkinson MG, Delahunty CM, Beresford TP. 2007. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *Int Dairy J*, 17 (4), 316-327.
27. Christensson C, Bratt H, Collins LJ, Coolbear T, Holland R, Lubbers MW, O'Toole PW, Reid JR. 2002. Cloning and expression of an oligopeptidase, PepO, with novel specificity from *Lactobacillus rhammosus* HN001 (DR20). *Appl Environ Microbiol*, 68 (1), 254-262.
28. Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71 (4), 394-406.
29. Yvon M, Gitton C, Chambellon E, Bergot G, Monnet V. 2011. The initial efficiency of the proteolytic system of *Lactococcus lactis* strains determines their responses to a cheese environment. *Int Dairy J*, 21 (5), 335-345.
30. Liu MJ, Bayjanov JR, Renckens B, Nauta A, Siezen RJ. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*, 11 (1), 36.
31. Sridhar VR, Hughes JE, Welker DL, Broadbent JR, Steele JL. 2005. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl Environ Microbiol*, 71 (7), 4161-4161.
32. Jensen MP, Vogensen FK, Ardo Y. 2009. Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *Int Dairy J*, 19 (11), 661-668.
33. Picon A, Garcia-Casado MA, Nunez M. 2010. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int Dairy J*, 20 (3), 156-162.
34. Gagnaire V, Sadat-Mekmene L, Genay M, Atlan D, Lortal S. 2011. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*: A review. *Int J Food Microbiol*, 146 (1), 1-13.
35. Stropfova V, Laukova A, Ouwehand AC. 2004. Selection of Enterococci for potential canine probiotic additives. *Vet Microbiol*, 100 (1-2), 107-114.
36. Bhardwaj A, Malik RK, Chauhan P. 2008. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian J Microbiol*, 48 (3), 317-325.
37. Topisirovic L, Veljovic K, Fira D, Terzic-Vidojevic A, Abriouel H, Galvez, A. 2009. Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products. *Eur Food Res Technol*, 230 (1), 63-70.
38. Thierry A, Maillard MB, Richoux R, Kerjean JR, Lortal S. 2005. *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Lait*, 85 (1-2), 57-74.
39. Treimo J, Vegarud G, Langsrud T, Rudi K. 2006. Use of DNA quantification to measure growth and autolysis of *Lactococcus* and *Propionibacterium* spp. in mixed populations. *Appl Environ Microbiol*, 72 (9), 6174-6182.
40. Sahlström S, Langsrud T, Serhaug T. 1995. Characterization of peptidase activities associated with cell-walls of *Propionibacterium freudenreichii*, First International Symposium on Dairy Propionibacteria, 17-19 May, Rennes, France, 65 p.
41. El Soda M, Ziada N, Ezzat N. 1992. The intracellular peptide-hydrolase system of *Propionibacterium*. *Microbios*, 72, 65-74.
42. Lo'pez-D'iaz TM, Santos J, Otero A, Garcia ML, Moreno B. 1996. Some technological properties of *Penicillium roquefortii* strains isolated from a home-made blue cheese. *Lett Appl Microbiol*, 23 (1), 5-8.

43. Bracq E, Levieux A, Levieux D. 1997. Purification and immunochemical quantitation of *Penicillium roquefortii* acid aspartyl proteinase. *J Dairy Res*, 64 (1), 105-113.
44. Larsena MD, Kristiansen KR, Hanse TK. 1998. Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roquefortii* for production of blue veined cheeses. *Int J Food Microbiol*, 43 (3), 215-221.
45. Fernández-Bodega MA, Mauriz E, Gómez A, Martín JF. 2009. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roquefortii* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol*, 136 (1), 18-25.
46. Boutrou R, Kerriou L, Gassi JY. 2006. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. *Int Dairy J*, 16 (7), 775-783.
47. Boutrou R, Aziza M, Amrane A. 2006. Enhanced proteolytic activities of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in mixed culture. *Enzyme Microb Technol*, 39 (2), 325-331.
48. Liu M, Nauta A, Francke C, Siezen RJ. 2008. Comparative Genomics of Enzymes in Flavor-Forming Pathways from Amino Acids in Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 74 (15), 4590-4600.
49. Smit G, Smit BA, Engels WJ. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev*, 29 (3), 591-610.
50. Thierry A, Maillard MB. 2002. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait*, 82 (1), 17-32.
51. Mansour S, Beckerich JM, Bonnarme P. 2008. Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, 74 (21), 6505-6512.
52. Ardö Y. 2006. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol Adv*, 24 (2), 238-242.
53. Yvon M, Rijnen L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J*, 11 (4-7), 185-201.