

**MİHALIÇ PEYNİRİNDEN İZOLE EDİLEN
PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİ İLE
KONJUGE LİNOLEİK ASİDİ ARTTIRILMIŞ
PEYNİR ÜRETİMİ**

Göksel TIRPANCI SİVRİ

Doktora Tezi

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ
2020**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MİHALIÇ PEYNİRİNDEN İZOLE EDİLEN PROPİYONİK ASİT
BAKTERİLERİ İLE KONJUGE LİNOLEİK ASİDİ ARTTIRILMIŞ
PEYNİR ÜRETİMİ**

Göksel TIRPANCI SİVRİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

TEKİRDAĞ-2020

Her hakkı saklıdır.

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Göksel TIRPANCI SİVRİ

Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ danışmanlığında, Göksel TIRPANCI SİVRİ tarafından hazırlanan “Mihaliç Peynirinden İzole Edilen Propiyonik Asit Bakterileri ile Konjuge Linoleik Asidi Arttırılmış Peynir Üretimi” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 07/09/2020 tarihinde Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Muhammet ARICI

İmza:

Üye : Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

İmza:

Üye : Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

İmza:

Üye : Prof. Dr. Mustafa MİRİK

İmza:

Üye : Doç. Dr. Salih KARASU

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

MİHALIÇ PEYNİRİNDEN İZOLE EDİLEN PROPİYONİK ASİT BAKTERİLERİ İLE KONJUGE LİNOLEİK ASİDİ ARTTIRILMIŞ PEYNİR ÜRETİMİ

Göksel TIRPANCI SİVRİ

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Bilimi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

Mihaliç peyniri karakteristik özellikleri propiyonik asit bakterileri tarafından sağlanan, Türkiye'nin önemli geleneksel peynirlerden biridir. Bu çalışmanın amacı; Mihaliç peynirlerinden propiyonik asit bakterilerinin izole edilip MALDI-TOF-MS ile tanımlanması ve bu bakterilerin konjuge linoleik asit (KLA) üretme potansiyelleri yüksek olanları ile fonksiyonelliği arttırılmış Mihaliç peyniri üretilmesidir. Bu araştırma kapsamında yerel üreticilerden toplanan Mihaliç peynirlerinden 21 adet propiyonik asit bakterisi izole edilmiş bunların %57'si *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, %33'ü *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ve %10'u *Propionibacterium thoenii* olarak tanımlanmıştır. İzolatların linoleik asit, pH ve tuz duyarlılıkları belirlenmiş ve KLA üretim kapasitesi en yüksek olan *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *Propionibacterium thoenii*, Mihaliç peyniri üretimi için kullanılmıştır. Peynirlerin KLA içeriğini arttırabilmek için süte saf linoleik asit ve linoleik asit içeriği yüksek olan çörek otu yağı ilave edilmiştir. Peynir üretiminde kültürler ayrı ayrı ve beraber kullanılmış ayrıca kontrol olarak kültürsüz peynir de üretilmiştir. Üretilen peynirlerin fizikokimyasal, mikrobiyal ve tekstürel özellikleri incelenmiştir. En yüksek KLA miktarı saf linoleik asit ilave edilmiş peynirlerde belirlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına ya da *P. thoenii* ile beraber kullanıldığında yüksek KLA üretimine neden olmuştur. Peynirlerin KLA oranları olgunlaşma sonunda 3,93-6,28 mg/g yağ arasında değişmiştir. En yüksek KLA miktarı linoleik asit ilave edilmiş süttten her iki kültürün beraber kullanımıyla üretilen peynir örneğine aittir. Kültürsüz üretilen kontrol peynirine göre %17,8 daha fazla KLA içermektedirler. Linoleik asit ilavesinin KLA üzerindeki olumlu etkisi ise %26,8'dir. Herhangi bir linoleik asit ve kültür kullanılmadan üretilen peynirle karşılaştırıldığında ise KLA miktarı %59,8 oranında artmıştır. Olgunlaşmanın peynirlerin KLA miktarı üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır ($p>0,05$). Fakat kullanılan linoleik asit kaynağı ve kültür türü KLA oranını anlamlı seviyede etkilemiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak tek başına kültür ilavesi ya da tek başına linoleik asit ilavesi KLA üretimini artırırken, her iki uygulamanın beraber yapılması KLA üretiminde sinerjistik etki yaratmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mihaliç Peyniri, Propiyonik asit bakterileri, MALDI-TOF-MS, konjuge linoleik asit

2020, 209 sayfa (Özet kısmından Özgçemiş sayfası dahil toplam sayfa sayısıdır)

ABSTRACT

PhD Thesis

PRODUCTION OF CHEESE WITH HIGH CLA CONTENT BY PROPIONIBACTERIUM
ISOLATED FROM MİHALIÇ CHEESE

Göksel TIRPANCI SİVRİ

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ

Mihaliç cheese which is given characteristic properties by *Propionibacterium* species (PAB), is one of the most important traditional cheeses in Turkey. The objectives of this research are the isolation of PAB from Mihaliç cheeses, the identification of them by MALDI-TOF-MS, and the production of functional Mihaliç cheese with PAB having a high potential of conjugated linoleic acid (CLA) production. To isolate PAB, 25 different Mihaliç kinds of cheese were purchased from the local producers and sellers. A total of 21 PAB were identified by MALDI-TOF-MD and 57% of them *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, 33% *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* and 10% of *Propionibacterium thoenii*. The sensitivity of PAB against linoleic acid, pH, and salt was evaluated and then *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* and *Propionibacterium thoenii* were chosen as a starter culture for cheese production because of their high CLA potential and resistance to pH and salt. Milk was fortified with pure linoleic acid or black seed oil with high linoleic acid content in order to produce CLA enriched cheese. Chosen PAB isolates were added to milk separately and together and uncultured cheese was also produced as a control. The highest level of CLA was determined in the cheese produced with pure linoleic acid. When *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* alone or combined with *P. thoenii* resulted in the highest CLA production. CLA ratios of cheeses varied between 3,93-6,28 mg/g fat at the end of the ripening period. The cheese produced by using both cultures together, from milk supplemented with linoleic acid contains 17,8% more CLA than the uncultured control cheese. There was also a positive effect of linoleic acid addition (%26,8) on CLA content. When compared with cheese produced without any linoleic acid and culture, the amount of CLA increased by 59,8%. Ripening did not have a significant effect on the CLA content of cheeses. It is obvious that the addition of linoleic acid or CLA producing cultures to the cheese production process altered the CLA level certainly. Taken together, these results suggest that there is a relation between linoleic acid fortification and CLA producing cultures causing the synergistic effect on CLA elevation in cheese

Keywords: Mihaliç cheese, *Propionibacterium* species, MALDI-TOF-MS, Conjugated linoleic acid

2020, 209 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
TEŞEKKÜR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Mihaliç Peyniri	5
2.1.1. Mihaliç Peyniri Üretimi	6
2.1.2. Mihaliç Peynirinin Kimyasal Özellikleri	10
2.1.3. Mihaliç Peynirinin Mikrobiyolojik Özellikleri	11
2.2. Propiyonik Asit Bakterileri	14
2.2.1. Genel Özellikleri	14
2.2.2. Metabolik Özellikleri	18
2.2.3. Propiyonik Asit Bakterilerinin Tanımlanması	19
2.3. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS)	20
2.4. Propiyonik Asit Bakterilerinin Probiyotik Önemi	27
2.5. Konjuge Linoleik Asit	29
2.5.1. KLA Kimyasal Yapısı	29
2.5.2. Ticari KLA Üretimi	30
2.5.3. KLA Biyosentezi	31
2.5.4. KLA Kaynakları	33
2.5.5. KLA'nın Sağlığa Etkileri	37
2.6. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Bakterilerin Gıdalarda Kullanılması	41
3. MATERYAL ve METHOD	44

3.1. Materyaller.....	44
3.1.1.Mihaliç Peynir Örnekleri	44
3.1.2.Besiyerleri	45
3.1.3.Kimyasallar	46
3.2. Metotlar.....	46
3.2.1.Propiyonibakterilerin İzolasyonu	46
3.2.2.Propiyonibakterilerin MALDI-TOF-MS ile Tanımlanması	47
3.2.3.Propiyonibakteri Sayımı	48
3.2.4.Propiyonibakterilerin Farklı Linoleik Asit Konsantrasyonlarına Duyarlılığının Belirlenmesi	48
3.2.5.Propiyonibakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransının Belirlenmesi	49
3.2.6.Propiyonibakterilerin Farklı Tuz Konsantrasyonlarına Toleransının Belirlenmesi	49
3.2.7.Propiyonibakterilerin KLA Üretim Kapasitelerinin Taranması.....	49
3.2.8.Çörek Otu Yağı İlave Edilmiş Ortamda PAB'lerin Gelişimi ve KLA Üretimi	51
3.3. Mihaliç Peynir Analizleri	52
3.3.1.Mihaliç Peynir Üretimi	52
3.3.2.Peynir Örneklerinin Analizler için Hazırlanması.....	56
3.4. Mikrobiyolojik Analizler	56
3.4.1.Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı	56
3.4.2.Toplam Propiyonik Asit Bakteri Sayımı.....	56
3.4.3.Toplam Laktik Asit Bakteri Sayımı	56
3.5. Fizikokimyasal Analizler.....	57
3.5.1.Titrasyon Asitliği	57
3.5.2.pH Değeri.....	57
3.5.3.Kuru Madde Oranı	57
3.5.4.Yağ Oranı.....	57
3.5.5.Protein Oranı	58
3.5.6.Kül Miktarı.....	58
3.5.7.Tuz Oranı	59
3.5.8.Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini	59
3.5.8.1.Peynirden Yağ Ekstraksiyonu.....	59
3.5.8.2. Yağ Asitlerinin Metil Ester Formlarına Esterleştirilmesi	60
3.5.8.3. GC-FID Kromatografik Analiz.....	60
3.5.9.KLA Kompozisyonu Analizi	60

3.5.10. Renk Tayini	61
3.6. Tekstür Analizi	61
3.7. İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	63
4.1. Propiyonik Asit Bakterilerinin Mihaliç Peynirlerinden İzolasyonu	63
4.2. MALDI-TOF-MS ile İzolatların Tanımlanması	67
4.3. Propiyonibakterilerin Farklı Linoleik Asit Konsantrasyonlarına Karşı Duyarlılığının Değerlendirilmesi	74
4.4. Linoleik Asit Duyarlılığı Belirlenen İzolatların KLA Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi	78
4.5. Propiyonibakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransının Değerlendirilmesi.....	82
4.6. Propiyonibakterilerin Farklı Tuz Konsantrasyonlarına Toleransının Değerlendirilmesi	84
4.7. Çörek Otu Yağı İlave Edilmiş Ortamda PAB'ların Gelişimi ve KLA Üretiminin Değerlendirilmesi	86
4.8. Mihaliç Peynir Üretimi	88
4.9. Mihaliç Peyniri Mikrobiyolojik Analizleri	88
4.9.1. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma Periyodunda Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) Sayısı.....	88
4.9.2. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma Periyodunda Toplam Propiyonik Asit Bakteri Sayısı.....	93
4.9.3. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma Periyodunda Toplam Laktik Asit Bakteri Sayımı	99
4.10. Mihaliç Peyniri Fizikokimyasal Analizleri.....	103
4.10.1. Titrasyon Asitliği ve pH değerleri	103
4.10.2. Kurumadde İçerikleri.....	106
4.10.3. Yağ Oranları	109
4.10.4. Protein Oranları	112
4.10.5. Kül Miktarı	116
4.10.6. Tuz Oranı	119
4.10.7. Yağ Asitleri Kompozisyonu	121
4.10.8. Konjuge Linoleik Asit Kompozisyonu	145
4.10.9. Renk Tayini	163
4.11. Mihaliç Peynirlerinin Tekstür Profil Analizleri.....	167
5. SONUÇ	171

KAYNAKLAR	177
EKLER	195
ÖZGEÇMİŞ	197

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Klasik <i>Propionibacteria</i> grubuna ait bakterilerin genel özellikleri ve doğal olarak buldukları habitatlar.....	16
Çizelge 2.2. Doğada en sık bulunan KLA izomerleri.....	29
Çizelge 2.3. Bazı gıda maddelerinin KLA ve <i>c9-t11</i> içerikleri.....	34
Çizelge 3.1. İzolasyon çalışmaları için kullanılan Çanakkale, Bursa ve Balıkesir bölgelerinden toplanan Mihaliç peynirlerine ait üretici ve üretim tarihi bilgileri	44
Çizelge 3.2. YEL katı ve sıvı besi yeri içeriği.....	46
Çizelge 3.3. Soğuk pres Çörek otu yağının yağ sitleri % kompozisyonu	51
Çizelge 3.4. Mihaliç peyniri üretiminde kullanılan deneme planı	52
Çizelge 4.1. Mihaliç peynirinden izole edilen bakterilerin gram boyama, katalaz testi, morfolojik özellikleri ve pigmentasyon sonuçları.....	63
Çizelge 4.2. MALDI-TOF-MS Analiz Sonuçları.....	67
Çizelge 4.3. MALDI-TOF-MS ile tanımlanan izolatların tür bazında dağılım oranları	71
Çizelge 4.4. Propiyonik asit bakterilerinin serbest linoleik aside (25, 50 ve 100 µg/mL) karşı duyarlılıkları	75
Çizelge 4.5. 10, 25, 40 ve 50 µg/mL linoleik asit içeren YEL besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterilerinin toplam KLA üretim miktarları (µg/mL) ve LA'yı KLA'ya dönüştürme oranları (%).....	79
Çizelge 4.6. Çörek otu yağı içeren besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterilerinin gelişim durumları ve toplam KLA üretim miktarları (µg/mL)	86
Çizelge 4.7. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma boyunca Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayısı	89

Çizelge 4.8. Mihaliç Peynirlerinin olgunlaşma boyunca Toplam Propiyonik Asit Bakteri sayısı	94
Çizelge 4.9. Mihaliç Peynirlerinin olgunlaşma boyunca Toplam Laktik Asit Bakteri sayısı ..	99
Çizelge 4.10. Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma süresince titrasyon asitliği (%Laktik asit) ve pH değişimleri	104
Çizelge 4.11. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince Kurumadde değişimi	107
Çizelge 4.12. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültür türüne ve süte ilave edilen linoleik asit kaynağına göre olgunlaşma boyunca ortalama kuru madde oranları.	108
Çizelge 4.13. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince %Yağ Oranları.....	110
Çizelge 4.14. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince % Protein Oranları	113
Çizelge 4.15. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince % Kül Oranları.....	116
Çizelge 4.16. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültür türüne ve süte ilave edilen linoleik asit kaynağına göre ortalama kül oranları.	118
Çizelge 4.17. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince % Tuz Oranları	119
Çizelge 4.18. Linoleik asit ilave edilmiş süttten <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi.....	123
Çizelge 4.19. Linoleik asit ilave edilmiş süttten <i>P. thoenii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi	124
Çizelge 4.20. Linoleik asit ilave edilmiş süttten <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> ve <i>P. thoenii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi.....	126
Çizelge 4.21. Linoleik asit ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan Kontrol olarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi.....	127
Çizelge 4.22. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi.....	129
Çizelge 4.23. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten <i>P. thoenii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi	130

Çizelge 4.24. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> ve <i>P. thoenii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi	132
Çizelge 4.25. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan Kontrol olarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi.....	133
Çizelge 4.26. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi	135
Çizelge 4.27. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten <i>P. thoenii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi.....	136
Çizelge 4.28. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> ve <i>P. thoenii</i> kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi	138
Çizelge 4.29. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan Kontrol olarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu değişimi	140
Çizelge 4.30. Peynir örneklerine ait ortalama yağ asitleri kompozisyonu (%).....	141
Çizelge 4.31. Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma süresince toplam KLA miktarlarının (mg/g) değişimi	146
Çizelge 4.32. Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma boyunca % KLA izomerlerinin değişimleri.....	153
Çizelge 4.33. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince L^* , a^* , b^* değerleri.....	165
Çizelge 4. 34. Mihaliç peynirlerinin ortalama tekstür özellikleri.....	168

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Mihaliç peyniri iç kesit görünümü	7
Şekil 2.2. Mihaliç peyniri üretim akış diyagramı	9
Şekil 2.3. Propiyonik asit fermentasyonu sonucu asetat, propiyonat ve CO ₂ oluşum reaksiyonu	18
Şekil 2.4. MALDI-TOF-MS çalışma prensibi.....	22
Şekil 2.5. Bakterilerin kütle spektrometrik protein parmak izlerine göre tanımlanması. Saflaştırılmış koloniden örnek alınması (A), Örnek tablosuna yüklenen izolatin matriks solüsyonu ile muamelesi (B), Örneğin cihaza yüklenip okunması (C), İzolata ait spektrumun elde edilmesi (D), Örneğin spektrumunun referans spektrumlarla karşılaştırılarak tanımlanması (E)	25
Şekil 2.6. Konjuge linoleik asit izomerlerinin ve linoleik asidin kimyasal yapısının 3 boyutlu gösterimi (A) t10-c12 oktadekonoik asit, (B) c9-t11 oktadekonoik asit ve (C) c9-c12 oktadekonoik asit (linoleik asit)	30
Şekil 2.7. Ruminantlarda gerçekleşen KLA biyosentezi mekanizması.....	33
Şekil 3.1. KLA konsantrasyonunu belirlemek için 233 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümle hazırlanan standart eğrisi	50
Şekil 3.2. Haşlama sonrası ayrılan telemenin süzülme işlemi için tülbente alınması	54
Şekil 3.3. Süzülme için askıya alınan telemelerin şişlenme işlemi	55
Şekil 3.4. Kellelerin salamura tankında bekletilmesi	55
Şekil 4.1. Mihaliç Peynirlerinden İzole edilen <i>Propionibacterium</i> türlerinin oransal dağılımı ...	73
Şekil 4.2. 10, 25, 40 ve 50 µg/mL linoleik asit içeren YEL besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterisi sayılarındaki değişim	78
Şekil 4.3. pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 ve 5,0 olan besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterisi sayılarındaki değişim.....	82
Şekil 4.4. Tuz oranı %0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10 olan besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterisi sayılarındaki değişim.....	84

Şekil 4.5. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı.....	92
Şekil 4.6. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam propiyonik asit bakteri sayımı	98
Şekil 4.7. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam laktik asit bakteri sayımı.....	102
Şekil 4.8. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültürlere göre ortalama %yağ oranları.....	111
Şekil 4.9. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültürlere göre ortalama %protein oranları	115
Şekil 4.10. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültürlere göre ortalama % tuz oranları.....	121
Şekil 4.11. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam konjuge linoleik asit miktarı	150
Ek 1: Toplam yağ asitleri kromotogramı.....	195
Ek2. KLA izomerleri kromotogramı	196

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

L^*	Beyazlık
a^*	Kırmızılık
b^*	Sarılık
kg	Kilogram
g	Gram
mg	Miligram
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
sn	Saniye
dk	Dakika
s	Saat
log	Logaritma 10'luk taban
kob	Koloni oluşturma birimi
mm	Milimetre
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
$^{\circ}\text{C}$	Celsius derecesi
PAB	Propiyonik Asit Bakterisi
LAB	Laktik Asit Bakterisi
KLA	Konjuge Linoleik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RAPD	Rastgele Arttırılmış Amplifiye Edilen Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polimorphic. DNA)
MALDI-TOF MS	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry)
kob	Koloni oluşturan birim

FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
GRAS	Genel olarak güvenli olarak kabul edilen (Generally Recognized as Safe)
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
ATP	Adenosine Triphosphate
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
HDL	High Density Lipoprotein (yüksek yoğunluklu lipoprotein):
LDL	Low Density Lipoprotein (düşük yoğunluklu lipoprotein):
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinnamik asit
MRS	Man, Rogosa Sharpe agar
SA	3,5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit (Sinapinik Asit)
t-VA	<i>Trans</i> -Vaksenik Asit,
Σ SFA	Toplam Doymuş Yağ Asitleri
Σ UFA	Toplam Doymamış Yağ Asitleri
Σ MUFA	Toplam Tekli Doymamış Yağ Asitleri
Σ PUFA	Toplam Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen, deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer ÖKSÜZ'e, tez çalışmalarımın oluşturulmasında ve geliştirilmesinde büyük katkıları bulunan sayın hocam Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ'e ve Prof. Dr. Mustafa MİRİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma kapsamındaki laboratuvar analizlerinin gerek yapılmasında gerekse de değerlendirilmesinde çok kıymetli desteklerini gördüğüm değerli hocalarım ve çalışma arkadaşlarım; Prof. Dr. Ümit GEÇGEL, Doç. Dr. Serap DURAKLI VELİOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Kadir Gürbüz GÜNER, Araş. Gör. Dr. Deniz Damla ALTAN KAMER, Araş. Gör. Didem SÖZERİ ATİK, Doç. Dr. İbrahim Palabıyık ve değerli öğrenci arkadaşlarım, Emel YÜCEL, Gizem LİMON, Oylum Şimal YILMAZ, Esra ATAK ile Süleyman BAYTUR'a, tezimin analizlerine yardımları bulunan tüm NABİLTEM personeline teşekkür ederim.

Tez materyali olan peynirlerin üretilmesinde bütün imkânlarını seferber eden, üretim sırasında ve sonrasında her türlü desteği veren ALTINÖZ Süt Ürünleri A.Ş. ye ve özellikle değerli meslektaşım Onur ALTINÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yaptığım çalışmalar sırasında yardımlarını, desteğini ve sabrını asla esirgemeyen canım annem Necla TIRPANCI'ya ve babam Mithat TIRPANCI'ya, eşim Fatih SİVRİ'ye, hayatımın neşe kaynağı olan kızlarım Şevval ve İpek SİVRİ'ye en içten sevgilerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Tarih boyunca insanların günlük gıda tüketiminde peynir, önemli bir süt ürünü olarak yer almaktadır. Peynirin bütün fizikokimyasal özellikleri, peynire işlenen sütün özelliklerinden, işleme yöntemlerinden ve olgunlaştırma koşullarından doğrudan etkilenmektedir (Demirci vd., 1994).

Türkiye, Dünya peynirleri ile rekabet edecek peynir çeşitliliğine sahip bir ülkedir. Ülkemizde özellikle geleneksel olarak üretilen birçok yöresel peynir çeşidi bulunmaktadır. Bu peynirlerin bir kısmı ticari starter kültürler ile hazırlanırken, büyük çoğunluğu süttten ve çevreden kontaminasyonla gelen bakteriler yardımıyla üretilmektedir (Demirci vd., 1994).

Yöresel peynirlerimizden biri olan Mihaliç Peyniri uzun yıllardan beri özellikle Balıkesir-Bursa bölgesinde yaygın olarak üretilmektedir. Mihaliç peyniri geleneksel yöntemler ile genellikle koyun sütünden yapılmasına karşılık, günümüzde; koyun, inek-koyun veya inek-koyun-keçi sütü karışımlarından da yapılabilmektedir. Mihaliç peynirinin dış kısmı kalınlığı 3-4 cm'ye varan bir kabukla kaplıdır ve iç kısmı açık sarıdan krem beyazına kadar değişen renkte ve gözenekli yapıdadır (Hayaloğlu, Barbaros ve Patrick, 2008).

İsviçre Peynirlerinin karakteristik özelliklerinden sorumlu olan klasik Propiyonik asit bakterilerinin (PAB) Mihaliç peynirinde de bulunduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Önal-Darılmaz, 2010). PAB'lar propiyonik asit üretebilme potansiyelleriyle tanımlanmışlardır. Bu bakteriler B12 vitamini ve propiyonik asit üretiminde kullanıldıkları için biyoteknolojik açıdan büyük önem arz etmektedirler.

PAB'lar izole edildikleri yere göre klasik ve deri kökenli olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Klasik PAB ya da diğer adıyla "dairy-propionibacteria" süt ve süt ürünlerinde bulunmakta ve özellikle bazı peynirlerin olgunlaşma sürecinde önemli rol oynamaktadırlar. Süt endüstrisi için büyük önem arz eden bu bakteri grubunun izolasyonu ve tanımlanması için konvansiyonel tanımlama yöntemleri en çok kullanılan prosedürlerdir. Bu bakterilerin geleneksel yöntemler ile üretilen peynirlerden izole edilip tanımlanması önem arz etmektedir. Ancak, *Propionibacterium* türlerinin geleneksel yöntemlerle tanımlanması oldukça zaman almakta ve bazı türlerin kesin olarak ayırt edilmesinde zorluklar ile karşılaşabilmektedir. Mikroorganizmaların tanımlanması için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Zaman alıcı ve maliyetli konvansiyonel yöntemlerin yerine mikrobiyoloji alanında daha duyarlı, ekonomik,

güvenilir ve daha hızlı sonuç verebilen yeni yöntemlerin gelişmesini sağlamıştır (Stackebrandt, Cummins ve Johnson, 2006).

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) her canlı organizmanın kendine has olan proteinlerinden kütle spektrometresine dayalı geliştirilmiş bir yöntem olup, bakterilerin de tanımlanması hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir. Bu yöntem, mikroorganizmalarda bulunan proteinleri iyonlarına kadar parçaladıktan sonra elektriksel bir alandan geçirerek protein profillerinin çıkarılmasını sağlar. Elde edilen profiller, sistemin kütüphanesindeki veri tabanında karşılaştırılarak tanımlama gerçekleştirilir. Yapılan çalışmalar bu yöntemin doğruluğunu geleneksel yöntemlerle benzer ya da daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Ekonomik açıdan incelendiğinde, cihazın ilk yatırım maliyeti dışında örnek başına maliyetinin konvansiyonel ya da otomatik sistemlerden çok daha düşük olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle MALDI-TOF-MS; direkt kültürlerden hızlı tanımlama yapılmasına olanak sağlayan, günümüzde cihazın yaygınlaşması ve fiyatının ucuzlaması ile konvansiyonel ve otomatize bakteri tanımlama yöntemlerinin yerini almaktadır (Holland vd., 1996).

Günümüze kadar propiyonik asit bakterilerinin insan sağlığını olumlu yönde etkileyebilecek bazı özellikleri araştırılmış ve bu bakteriler probiyotik mikroorganizmalar olarak önerilmiştir. Ancak propiyonik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri ticari olarak laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler kadar yaygın bir şekilde kullanılmamıştır. Son yıllarda PAB'ların sağlığa yararları üzerinde önemle durulmaktadır. Beta galaktosidaz enziminin üretimi, laktozu hidrolize etme yeteneği sayesinde laktoz intoleransında tedavi edici etkisi PAB'ların insanlara sağladığı önemli faydalardan bazılarıdır. (Al-Lahham, Peppelenbosch, Roelofsen, Vonk ve Venema, 2010; Altieri, 2016; Hugenholtz, Hunik, Santos ve Smid, 2002; Zárate, Chaia, González ve Oliver, 2000). Aynı zamanda propiyonik asit bakterileri serbest linoleik asidi, sağlığa yararlı etkileri olduğu bilinen konjuge linoleik aside (KLA) dönüştürebilme yeteneğiyle de probiyotik özelliğini göstermektedir (Wang, Lv, Chu, Cui ve Ren, 2007). PAB'ların teknolojik streslere karşı dirençli olmaları, çeşitli probiyotik fermente gıdalarda kullanılma potansiyeli sağlamaktadır.

Konjuge yağ asitleri yaşam tarzı ile ilişkili hastalıkların azaltılmasında faydalı biyolojik etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. Konjuge linoleik asit (KLA), esansiyel bir omega-6 yağ asididir. İçerdiği 18 karbon atomu ile iki çift bağ, linoleik asidin konjuge olmuş çok sayıdaki pozisyonel ve geometrik izomerlerinin karışımını oluşturmaktadır (Nagao vd., 2002). KLA'nın

çeşitli izomerlerinden *cis*-9, *trans*-11 ve *trans*-10, *cis*-12 konfigürasyonlarının sağlık açısından en etkili olduğu düşünülmektedir. *Cis*-9, *trans*-11 izomerinin antikarsinojenik etki gösterdiği, *trans*-10, *cis*-12 izomerinin vücut yağının azaltılmasında daha etkili olduğu belirlenmiştir (Ha, Grimm ve Parka, 1989).

KLA üzerine yapılan çalışmalar 1979 yılında pişmiş dana etinde antikarsinojenik ve mutajenik etkilerinin fark edilmesiyle başlamıştır (Pariza, Ashoor, Chu ve Lund, 1979). KLA'nın temel kaynaklarının süt ve et ürünlerinin olduğunun ve bu ürünlerdeki KLA miktarlarının fermentasyon veya işlenerek arttırılabildiğinin belirtilmesi bu konu üzerine daha fazla araştırma yapılmasına olanak sağlamıştır.

KLA'nın avantajlı besleyici özellikleri ve sağlığa yararları, fonksiyonel ürün arayışında olan gıda sanayi için önem arz etmektedir. Birçok süt ürününde KLA oranı 2 ile 16 mg/g arasında değişmektedir. Bu oran et ürünlerinde daha da düşüktür (Fritsche vd., 1999). Bu nedenle gıda kaynaklarından günlük KLA alım miktarı cinsiyete, günlük bitkisel ve hayvansal ürün tüketim oranlarına göre değişmekle beraber 150-212 mg/gün olarak hesaplanmıştır (Mcguire ve Mcguire, 1999).

Ip, Singh, Thompson ve Scimeca (1994) 70 kg'lık bir insanın, KLA'dan maksimum sağlık yararı elde etmek için günde 3,0 g KLA tüketmesi gerektiğini tahmin etmiştir. Bu durum KLA ile zenginleştirilmiş gıdalara ihtiyacı doğurmuştur. KLA ile zenginleştirilmiş gıdaların üretimi ve depolama boyunca özelliklerini inceleyen çalışmalar tüketici tarafından kabul edilebilir gıdaların üretimine ve böylelikle süt ürünleri sanayinin gelişimine destek olacaktır.

Peynirlerle ilgili olarak yapılan çalışmalar, farklı KLA seviyelerinin farklı işlem koşullarına bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir (Gnädig, vd., 2004). Ancak süt işleme koşullarının, depolama süresinin ve olgunlaşma prosesinin, çeşitli süt ürünlerinin KLA içeriği üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır.

Bu çalışmanın amacı farklı üreticilerden temin edilecek karakteristik yapıya sahip Mihaliç peynirlerinde bulunan PAB'ların MALDI-TOF-MS yöntemiyle tanımlanması, tanımlanan suşların KLA üretim potansiyellerinin araştırılması ve KLA üretim potansiyeli yüksek olan suşlar ile fonksiyonelliği arttırılmış Mihaliç peyniri üretilmesidir. Böylece ülkemizde sevilerek tüketilen geleneksel peynirlerden biri olan Mihaliç peynirinin doğal mikrobiyotasının bir parçası olan propiyonik asit bakterilerinin optimum şartlarda üreteceği

maksimum konjuge linoleik asit miktarı ile Mihaliç peynirinin fonksiyonelliği arttırılmış olacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Mihaliç Peyniri

Sütün peynir mayası veya bazı organik asitlerin yardımıyla pıhtılaştırılması, farklı yöntemlerle işlenmesi ve olgunlaştırılması sonucunda besleyici özelliği yüksek bir süt ürünü olan peynir üretilir (Demirci vd., 1994; Eralp, 1974). Peynirin yüksek besin değeri bileşiminde bulunan proteinler, vitaminler, mineral maddeler ve özellikle kalsiyum ve fosfor gibi bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Bulut, 2006).

FAO verilerine göre 2018 yılında Dünyada toplam peynir üretimi yaklaşık 20 milyon tondur. Dünya üretiminin yarısını Avrupa Birliği ülkeleri gerçekleştirirken en büyük üretim miktarı yaklaşık 6 milyon tonla Amerika Birleşik Devletleri'ne aittir. Türkiye 2018 yılında 723 bin ton inek sütünden, 33 bin ton diğer hayvanların sütünden toplam 756 bin ton peynir üretimi gerçekleştirerek Dünya marketinde yer almaktadır (Food and Agriculture Organizatin, 2019).

Türkiye'de en çok beyaz peynir ve kaşar peyniri üretilmekle beraber 200'den fazla yöresel peynir de üretilmektedir. Bunların başında tulum, Mihaliç ve otlu peynirler gelmektedir (Demirci vd., 1994).

Yöresel peynirlerimizin en çok tüketilenlerinden olan Mihaliç peyniri, Bursa-Balıkesir bölgesinde üretilmektedir. Geleneksel olarak koyun sütü ile üretilmesine karşılık günümüzde inek sütü karışımları ile de üretilmektedir (Aday, 2010; Bulut, 2006).

Mihaliç peyniri Marmara bölgesinde üretilmesi nedeniyle Türkiye genelinde yeterince bilinmemekte, uzun yıllardan beri üretilmesine rağmen çoğu yerde geleneksel yöntemlerle üretilirken fabrikasyon seviyesinde üretilmemektedir. Geleneksel üretim yöntemlerinin dezavantajlarından olan standardizasyon ve kalite kontrol problemleri Mihaliç peynir üretiminin çözüm bekleyen sorunlarıdır. Standart Mihaliç peyniri üretimi bu alanda yapılacak çalışmalarla desteklenirse bu ürün toplumun büyük kesimi tarafından sevilen ve tüketilen bir ürün olacaktır (Kamber, 2008).

Peynir üretiminde söz sahibi olan Amerika ve Avrupa Birliği ülkeleri peynir yapılacak çiğ sütlerin standartlarını belirlemiş ve bu standartlara uyan sütlerden üretim gerçekleştirirken, ülkemizde geleneksel peynirlerin çoğu ya çiğ süttten ya da kısmi ısıtılmış işlem görmüş sütlerden

üretilmektedir. Bu durum sık sık peynirlerde tat bozulması, yumuşama, renk değişimi gibi kalite problemlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Peynir üretimi sonucunda kaliteli ve sağlıklı ürünler elde etmek için hammadde olarak kullanılan sütün mikrobiyal yükünün azaltılması amacıyla pastörizasyon işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Fakat uygulanan bu ısıl işlem sağladığı avantajların yanında peynir prosesinde önem arz eden laktik asit bakterilerinin azalmasına da neden olmasından dolayı, pastörize süttten yapılan peynirlerde tipik tat ve aroma eksikliği görülmektedir. Pastörizasyon işleminin neden olduğu bu olumsuzluklar, peynir yapılacak sütlere üretilecek peynirin türüne bağlı olarak özel starter kültürlerin ilave edilmesi ile giderilmeye çalışılmaktadır (Demirci, Yüksel ve Soysal, 1992).

Türkiye’de üretilen geleneksel peynirlerde, süte starter kültür olarak eklenebilecek mikroorganizmalar hakkındaki bilgi eksikliği nedeniyle, bu peynirlerin üretimi için gerekli ısıl işlem uygulamaları kısıtlanmaktadır. Pastörizasyon işlemi patojen mikroorganizmaları inhibe etmesinin yanında peynir yapımı için gerekli olan bazı mikroorganizmaların da inhibisyonuna neden olduğu için, peynir prosesinde starter kültür kullanımını elzem kılmaktadır (Bulut, 2006).

2.1.1. Mihaliç Peyniri Üretimi

Kelle adıyla da bilinen Mihaliç peyniri sert ve gözenekli peynir kategorisindedir. En az 200 yıllık bir tarihi olduğu bilinen Mihaliç peyniri, ilk olarak Bursa’nın Karacabey ilçesinde yapılmaya başlandığı için ilçenin eski adı olan Mihaliç ismini aldığı bilinmektedir (Eralp, 1974).

Mihaliç peyniri karakteristik özelliği kesit yüzeyinde sahip olduğu gözenekli yapıdır. Şekil 2.1.’de görüldüğü üzere dışta 3-4 mm kalınlığında sert kabuk ve bu kabuğun altında sarımsıtrak gözenekli yapı bulunmaktadır.

Geleneksel Mihaliç peyniri koyun sütü özellikle kıvırcık koyunun sütünden üretilmesine rağmen son dönemlere inek sütünden de üretilmektedir (Özer, 2015). Geleneksel olarak çoğunlukla çiğ süttten ya da 56 °C de 2 dk ısıl işlem görmüş sütlardan üretilmektedir. Peynirin üretim sürecinde başka herhangi bir ısıl işlem olmaması da hammadde olarak kullanılacak sütün belli bir kalitede olmasını gerektirmektedir (Aday, 2010).



Şekil 2.1. Mihaliç peyniri iç kesit görünümü

Mihaliç peyniri yapılacak sütler, Balıkesir bölgesinde “polim”, Bursa bölgesinde ise “taarı” denilen büyük kaplar içerisinde işlenmektedir. Polimler, kara meşeden yapılırken, süt taarları çelikten imal edilmektedirler. Kapasiteleri 200-300 litre arasında değişmektedir. Temizlik bakımından taarlar, işleme kolaylığı ve ısı muhafaza etme bakımından ise polimler tercih edilmektedir (Yöney, 1955).

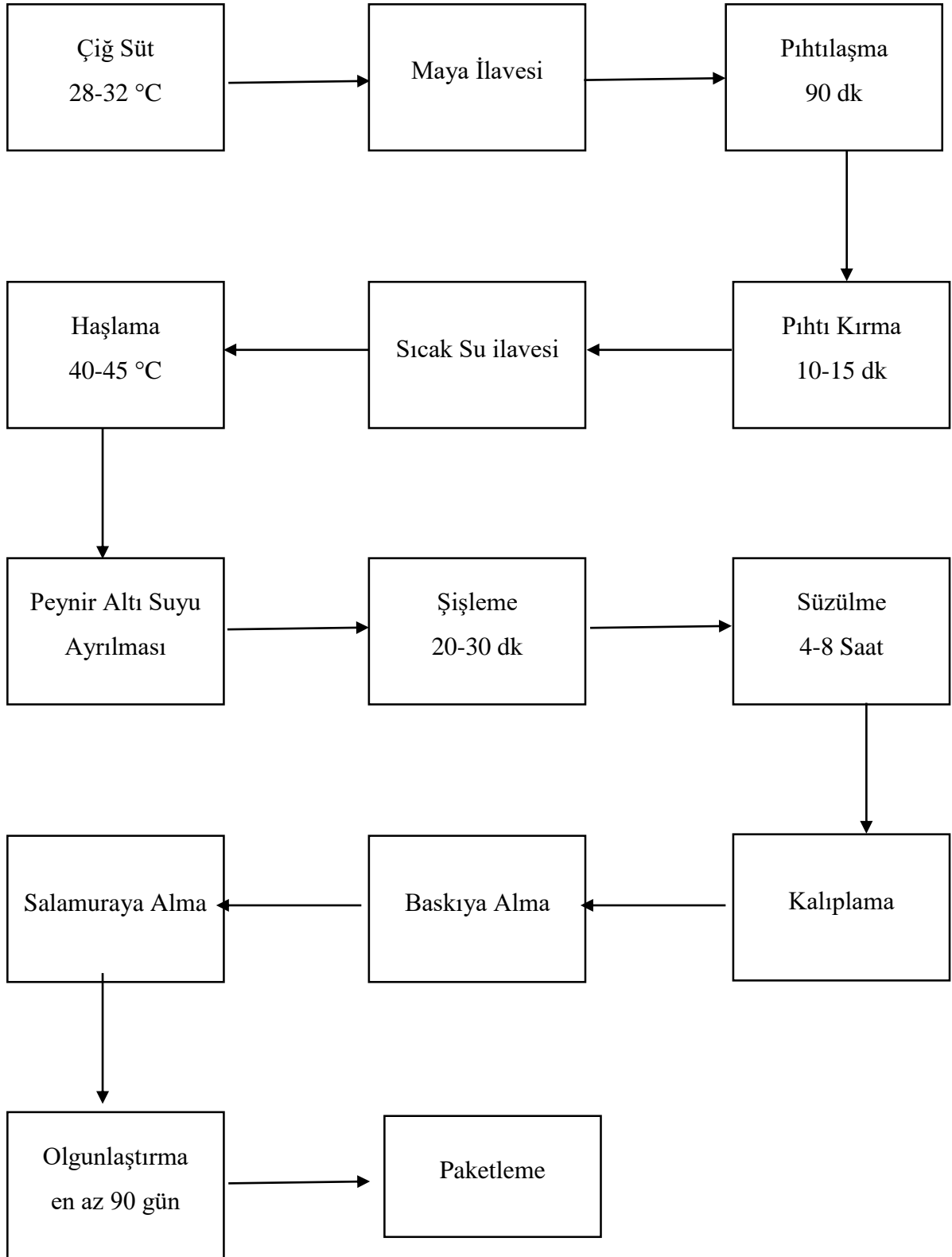
Mihaliç peynir üretimi çiğ sütün üretim tesisine kabulüyle başlar ve akabinde yaz döneminde 27-28 °C de kış döneminde ise 30-33 °C aralığında mayalama işlemi yapılır. Şekil 2. 2’de Mihaliç peynir üretim şeması gösterilmektedir. Peynir mayası miktarı ön deneme ile belirlenerek, genellikle 1:10000 oranında, ya sulandırılarak ya da doğrudan süte katılarak mayalama işlemi gerçekleştirilir (Üçüncü, 2004). Yaklaşık 90 dakika süren pıhtılaşma süresinden sonra oluşan pıhtı ucu haç şeklinde olan sopalarla pirinç tanesi büyüklüğüne gelene kadar kırılmaktadır. Yaklaşık 10-15 dakika süren pıhtı kesme işlemi sırasında sıcak su ilavesi ile pıhtı 40-45 °C aralığına kadar sürekli karıştırma suretiyle ısıtılmaktadır. Pıhtı bu şekilde homojen bir şekilde haşlanmaktadır. Ürün kalitesi açısından haşlama işlemi çok önemlidir. Eğer pıhtı istenen sıcaklığa ulaşmazsa pıhtılar birbirine kaynaşmayarak yumuşak kalmakta ve depolama süresince şişme problemi yaşanmaktadır. Haşlama istenenden fazla olursa peynirde istenen gözenek oluşumu gerçekleşmemektedir (Demirci vd., 1994). Haşlama işlemi bittikten sonra oluşan teleme 15-20 dakika dinlendirilerek dibe çökmesi sağlanır. Çöken teleme süzme bezine alınarak askıya alınır. Askıda süzülmekte olan teleme alttan üste doğru ince şişlerle 20-

30 dakika şişlenerek peynir suyunun akmasına yardımcı olunur. Şişleme işlemi aynı zamanda telemenin soğumasını da sağlar. Telemenin askıda kalma süresi hava sıcaklığına bağlı olarak 6-8 saat arasında değişmektedir (Yöney, 1955).

Süzülme işlemi tamamlandıktan sonra askıdan alınan teleme kalıplara konarak baskıya alınmaktadır. Üzerine ağırlık konularak bekletilen pıhtı kitlelerine “kelle” adı verilmektedir. Kellelerin içerisinde su kalmamalıdır aksi takdirde peynirde kabarıp çatlak oluşumu meydana gelmektedir (Bulut, 2006).

Baskı işleminden sonra kelleler salamura işlemine alınmaktadır. İki ya da üç aşamada gerçekleştirilen tuzlama işlemi peynirin tuzlanmasını sağlamaktadır. İlk salamura %15 tuz içermekte ve peynirler 1-1,5 gün burada bekletilmektedirler. Salamura süresince peynirlerin üst kısımları iri tuzla kaplanmaktadır (Hayaloglu, Ozer ve Fox, 2008).

Peynirler, ilk salamura işlemi bittikten sonra daha yüksek konsantrasyonda tuz içeren (%20-22) salamura suyuna aktarılmaktadırlar. Yaklaşık 2-10 gün süren sert salamura bekletmeden sonra peynirin dış kabuğunda sertleşme ve iç kısmında sararma oluşmaktadır. Mihaliç peynirinin olgunlaşması diğer peynir çeşitlerine göre daha dikkatli yapılması gerekmektedir. Olgunlaşma işlemi peynirlerin, 500 kg-1 ton kapasitedeki teknelerde kesit yüzeyleri birbirine bakacak şekilde, düzenli olarak altüst edilmesiyle gerçekleşmektedir. Salamura suyu böylece her yüzeye yayılabilmektedir. Olgunlaşma süreci 90 gün boyunca serin bir ortamda devam ettirilir (Özcan, 2000).



Şekil 2.2. Mihaliç peyniri üretim akış diyagramı

2.1.2. Mihaliç Peynirinin Kimyasal Özellikleri

Mihaliç peyniri ülkemizde üretilen en önemli geleneksel peynirlerden biri olduğu için bu ürünün özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır. Şen (1991) hazırlamış olduğu tezde çiğ süttten, 56 °C de 2 dk ısıtılan süttten ve 72 °C de 2 dk pastörize edilen süttten 3 farklı Mihaliç peyniri hazırlamış ve özelliklerini belirlemiştir. Bu peynirleri sırasıyla 90 günlük olgunlaştırma sonrası, kuru madde oranları %63,1, %68,3 ve %65,5, toplam yağ miktarları %26, %26 ve %25, tuz oranları %9,1, %9,5 ve 9,4 olarak belirlenmiştir. Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda ise çiğ süttten hazırlanan peynirde koliform bakteri sayısının diğer peynirlere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber çiğ süt ve 56 °C de 2 dk ısıtılan süttten yapılan peynirlerde propiyonik asit bakteri sayısı, 72 °Cde pastörize edilen süte göre anlamlı derecede yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın açığa çıkardığı en önemli sonuçlardan biri Mihaliç peynirinin karakteristik gözenek yapısında propiyonik asit bakterilerini rol aldığı gerçeğidir

Özer, Aloğlu ve Şanlıdere (2003) keçi sütü kullanarak ve 3 ay olgunlaştırma yaparak hazırladıkları Mihaliç peynirlerinde kuru madde oranını %53,7-64,59, yağ oranını %21,5-%24,0 ve tuz miktarını %3,51-10,06 olarak hesaplamışlardır.

Dönmez, Seçkin, Sağdıç ve Şimşek (2005) farklı peynir türlerinin karşılaştırmak için gerçekleştirdikleri çalışmada Mihaliç peynirinin kuru madde oranını %75,5, protein oranının %24,7, tuz miktarını %4,1 ve kolesterol miktarını 120,2 mg/100 g olarak raporlamışlardır. Ayrıca Mihaliç peyniri KLA içeriği (0,65 g/100 g yağ) en yüksek peynirlerden biri olarak belirlenmiştir.

Bulut (2006) çiğ ve pastörize süttten üreterek üç ay olgunlaştırdığı Mihaliç peynirlerinde ortalama kuru madde oranı %56,19, yağ oranını %30,50, tuz oranını %7,39, protein oranını %20,81, pH değerini 4,78 olarak bildirmiştir.

Gölge ve Şahan (2008) inek ve koyun sütü kullanarak hazırladıkları farklı Mihaliç peynirlerinde pH değerlerini 5,28-6,11 arasında, kuru madde oranlarını %56,75-64,13 arasında, tuz oranlarını %3,27-8,18 arasında, yağ oranlarını %25,25-33,0 arasında, suda çözünen azot miktarlarını %0,26-0,84 arasında, TCA'da çözünen azot miktarlarını ise %0,03-0,26 arasında belirtmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada duyu analizlerini de gerçekleştirmişler ve peynirin iç ve dış kısımlarında sertlik, yapışkanlık, esneme, çignenebilirlik ve sakızimsılık özellikleri arasında fark olduğunu kanıtlamışlardır.

Hayaloğlu, Bansal ve McSweeney (2012) vakum paketleme ya da salamura yöntemleriyle bir yıl olgunlaştırdıkları Mihaliç peynirlerinde yaptıkları analizler sonucu vakum paketli örneklerde pH 4,6 ve uçucu bileşiklerinin çoğunun salamurada olgunlaştırılan örneğe göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma ile vakum paketlemenin Mihaliç peynirinde ürün kalitesini arttırıcı bir yöntem olarak kullanılabilieceği sonucuna varılmıştır.

Aday ve Karagül Yüceer (2014), 15 farklı Mihaliç peyniri ile gerçekteşirdiği çalışmasında peynirlerin fiziksel, kimyasal ve duyuusal özelliklerini ayrıca aroma bileşenlerini incelemiştir. Bu çalışmada peynirlerin ortalama kuru madde oranı %60,4, yağ oranı %27,4, protein oranı %22, tuz oranı %5,92 ve pH değerisi 5,51 olarak açıklanmıştir. Yapılan duyuusal incelemede peynirlerin iç ve dış kısımları arasında renk farklılığı olduğu ayrıca sertlik ve çiğnenebilirlik açısından da farklı oldukları belirlenmiştir. Aroma bileşenleri analizi ile de bu peynir çeşidine ait 44 farklı aroma bileşeni saptanmıştir.

Özer (2015) hazırlamış olduğu tez çalışmasında farklı starter kültürleri ile hazırlanmış Mihaliç peynirlerini incelemiştir. *Propionibacterium* spp, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesentroides* subsp. *cremoris*'den oluşan starter kültürleri %1 oranında ekleyerek 90 günlük olgunlaşma sonrası peynirlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemiştir. Buna göre peynirlerin kuru maddeleri %56,40-%58,69, yağ oranları %21,50-%23, protein miktarları %26,57- %28,16 ve tuz oranları %5,09-%6,73 arasında olduğu saptanmıştir.

2.1.3. Mihaliç Peynirinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Peynirlerin en önemli kalite faktörlerinden birisi de mikrobiyotasıdır. Peynirlerin mikrobiyotasını, çiğ sütteki mikroorganizmalar ve üretim prosesinde ve sonrasında gerçekteşen kontaminasyonlardan gelen mikroorganizmalar oluşurmaktadır. Mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmaların sayısı ve türü, peynirin tüm kalite özelliklerinin yanı sıra olgunlaşma süresince gerçekteşen bakteriler arası etkileşimi de etkilemektedir.

Geleneksel yöntemler ile yapılan Mihaliç peyniri süttten gelen doğal biyotadaki mikroorganizmaları içermektedir. Peynir yapımı sırasında laktozun laktata çevriminden laktik asit bakterileri özellikle *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* türleri sorumludur. Mihaliç peynirinin yapısında bulunan propiyonik

asit bakterileri, olgunlaşma boyunca laktatı propiyonik asit, asetik asit ve CO₂'e dönüştürmektedirler. Mihaliç peynirinin yapısında bulunan gözenekler bu bakterilerin ürettiği CO₂ sayesinde (Öner ve Aloglu, 2004) . Son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı starter kültürler kullanılarak hazırlanan peynirlerle ilgili çalışmalar da literatürde yer almaktadır.

Üç aylık olgunlaşma süresince çiğ, 56 °C'de 2 dk ısıtılan ve pastörize süttten hazırlanan peynirlerin mikrobiyolojik incelemesi yapıldığında sırasıyla toplam aerobik bakteri sayısı, 4,20-6,75, 6,72-7,34 ve 4,20-5,01 log kob/g aralığında saptanmıştır. Ayrıca laktik ve propiyonik asit bakterileri de incelenmiş ve örnekler için sırasıyla 1,8-3,67, 2,62-2,86 ve 2,08-2,72 log kob/g laktik asit bakterisi, 4,98-5,87, 3,42-4,81 ve 1,57-1,81 log kob/g propiyonik asit bakterisi tespit edilmiştir (Şen, 1991). Uygulanan pastörizasyon işlemi özellikle propiyonik asit bakterilerinin sayısını azaltmakta bu da son üründe kalite problemlerine neden olmaktadır.

Özdemir, Özdemir, Demirci, Çelik ve Sönmez (2004) Marmara bölgesinden topladığı 20 adet Mihaliç peynirinin mikrobiyolojik özelliklerini incelediğinde, toplam mezofilik aerobik bakteri sayısını 7,26 log kob/g, laktik asit bakteri sayısını 5,41 log kob/g olarak belirlemişlerdir.

Pastörize ve çiğ süttten hazırlanan Mihaliç peynirlerini 90 günlük olgunlaşma boyunca inceleyen Bulut (2006), toplam mezofilik bakteri sayısını pastörize süttten hazırlanan peynirler için $3,8 \times 10^8$ - $9,6 \times 10^8$, çiğ süttten hazırlananlar içinse $3,7 \times 10^9$ - $1,7 \times 10^9$ kob/g aralığında belirlemiştir. Aynı örnekler için toplam laktik asit bakteri sayısı sırasıyla $9,3 \times 10^6$ - $4,6 \times 10^7$ ve $1,2 \times 10^8$ - $8,6 \times 10^7$ kob/g olarak saptanmıştır. Toplam propiyonik asit bakteri sayılarına da bakılan incelemede pastörize süttten hazırlanan peynirde $1,2 \times 10^8$ - $6,6 \times 10^8$ kob/g ve çiğ süttten hazırlanan peynirde $7,0 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^8$ kob/g olarak bildirilmiştir.

Ticari starter kültür olarak *S. thermophilus* + *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* + *Lb. helveticus*) karışımları kullanılarak hazırlanan mihaliç peynirlerinde 3 aylık olgunlaşma sonucu starter kültür kullanımının peynirlerde bulunana maya, koliform ve laktik asit bakteri sayısını önemli derecede etkilediğini ve duyuşsal olarak da *Lb. helveticus* ile üretilen peynirin öne çıktığını açıklanmıştır (Gölge, 2009).

Türkiye'de üretilen içinde Mihaliç peynirinin de bulunduğu 12 farklı peynir çeşidinin incelenmesi sonrası 29 adet propiyonik asit bakterisinin izole edildiği çalışmada baskın suşun *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olduğu tespit edilmiştir (Önal-Darılmaz, 2010).

Özer (2015) tez çalışmasında *Propionibacterium* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesentroides* subsp. *cremoris*'den oluşan starter kültür kombinasyonları ile hazırladığı farklı Mihaliç peynirlerini incelemiştir. Bu çalışma ile starter kültür kullanımı ile peynirin kalite parametrelerinde artış, olgunlaşma süresinde azalma gözlenmiş ve duyuşsal olarak daha iyi peynirler elde edilmiştir. Özellikle propiyonik asit bakterileri, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus* kullanılarak hazırlanan Mihaliç peyniri, tat-aroma, tekstürel ve duyuşsal açıdan en beğenilen peynir olmuştur. Ayrıca bu çalışmada serbest yağ asitleri incelendiğinde özellikle propiyonik asit bakterilerini içeren peynirlerin yoğun lipolitik aktiviteden dolayı peynirde tat ve aromadan sorumlu kısa zincirli yağ asitleri miktarının arttığı belirlenmiştir.

Mihaliç peynirine ait karakteristik özelliklerin oluşumunda en büyük paya sahip olan propiyonik asit, bu asiti üreten bakterilerin eklenerek hazırlandığı peynir örneklerinde önemli derecede artış göstermiş ve bu da peynirlerde kalite artışını beraberinde getirmiştir (Özer ve Kesenkaş, 2019).

Mihaliç peyniri ile ilgili yapılan mikrobiyolojik analizler göstermektedir ki bu peynirin mikrobiyotasında çok miktarda farklı tür ve sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Fakat peynire karakteristik özelliklerini sağlaması nedeniyle propiyonik asit bakterileri öne çıkmaktadır.

2.2. Propiyonik Asit Bakterileri

2.2.1. Genel Özellikleri

Propiyonik asit bakterileri ilk olarak 1906 yılında, Freudenreich ve Orla-Jensen tarafından, Emmental peynirinden *Bacterium acidipropionici* ve *Bacillus acidipropionici* adını verdikleri bakteriler olarak izole edilmişlerdir. Bu mikroorganizmalar propiyonik asit üretme kabiliyetleriyle tanımlanmıştır (Meile, Dasen, Miescher, Stierli ve Teuber, 1999). Bu bakteriler için *Propionibacterium* sınıfı ilk olarak 1909 yılında Orla-Jensen tarafından önerilmiştir.

Propiyonik asit bakterileri Gram pozitif, spor oluşturmeyan, %53-68 G+C içeriğine sahip mezofilik bakterilerdir. Çoğunlukla anaerop olmakla beraber aerotolerant olanları da vardır. Genellikle katalaz pozitif reaksiyon verirler. Morfolojik olarak farklı pleomorfik çubuk ya da Çin alfabesi karakterleri şeklinde tanımlanmaktadır (Altieri, 2016). Optimum gelişme sıcaklıkları 30°C fakat 15-40 °C ve pH 5,1-8,5 aralığında gelişebilmektedirler.

Propiyonik asit bakterileri buldukları habitatlara göre iki ana gruba ayrılmaktadırlar. “Deri” ve “Klasik” *Propionibacterium* olarak tanımlanan bu gruplardan “Deri *Propionibacterium*” insan cildinden izole edilen ve genellikle fırsatçı patojen olarak bilinmelerine karşılık son yıllarda birincil patojen olarak da değerlendirildikleri çalışmalara rastlanmıştır (Byrd, Belkaid ve Segre, 2018). Bu grupta bulunan propiyonik asit bakterileri *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*, *P. lymphophilum*, *P. propionicus* olarak tanımlanmıştır.

Klasik *Propionibacteria* ise daha çok süt ürünlerinden izole edilmekte ve bu nedenle “Dairy Propionibacteria” olarak bilinmektedirler. Süt ve süt ürünlerinin yanında sebzelerden ve silajlardan da klasik PAB izole edilebilmektedir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* türleri bu grupta listelenmektedirler. Bu bakterilerin genel özellikleri ve doğal habitatları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Klasik PAB’lar 2008 yılında FDA tarafından GRAS (generally recognized as safe) gıdalarda güvenli olarak kullanılabilir statüsüne alınmıştır (Meile, Le Blay ve Thierry, 2008). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) yaptığı güncellemede *P. freudenreichii* ve *P. acidipropionici* türlerini nitelikli olarak güvenli varsayılan (QPS-Qualified presumption of safety) statüsüne alınmasına karar vermiştir (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016). Bu sayede gıda sanayinde yaygın kullanım alanına sahip olmakla beraber en çok İsviçre tipi

peynirlerin yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. ‘Klasik’ PAB’ların peynir yapımındaki rollerine ilaveten, doğal olarak fermente edilmiş gıdalarda ve anaerobik sindirim yollarında da görev almaktadırlar.

Fermente süt ürünlerinde bulunan klasik propiyonik asit bakterileri, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici* gerek teknolojik özellikleri gerekse probiyotik özellikleri nedeniyle üzerine en çok araştırma yapılan ve endüstride starter kültür olarak kullanım alanı bulan türlerdir. *Propionibacterium* cinsine ait bu türlerin doğal kontaminasyon sonucu sütte bulunduğu belirlenmiştir (Baer ve Ryba, 1992).

PAB’lar İsviçre tipi peynirlerin özellikle Emmental çeşidinin olgunlaşma sürecinde aromanın ve lezzetin geliştirilmesi için büyük önem arz etmektedirler. Peynirlerin 22-25 °C’lik olgunlaşma odalarında ki proseslerinde laktatı propiyonik asit, asetik asit ve CO₂ e dönüştürmektedirler ve bunun sonucu olarak da karakteristik göz oluşumuna neden olmaktadır. Peynir üretiminde kullanılan PAB başlangıç kültürleri genellikle *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* veya subsp. *shermanii*’ dir (Malik, Reinbold ve Vedamuthu, 1968).

Finlandiya’da üretilen Emmental peynir çeşitlerinde yapılan bir çalışmada izole edilerek tanımlanan suşların %60’ından fazlası *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* veya subsp. *shermanii* olarak tanımlanmıştır (Langsrud ve Reinbold, 1973).

Çizelge 2.1. Klasik *Propionibacteria* grubuna ait bakterilerin genel özellikleri ve doğal olarak buldukları habitatlar

Tür	Genel Özellikleri	Doğal Habitatı	Referans
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	Anaerobik-Aerobik toleranslı, beyaz-bej koloni, katalaz +, hemolitik olmayan, laktoz fermentasyonu -, nitrat indirgeme +	Süt, peynir (çoğunlukla İsviçre tipi olanlar) ve silaj	(Britz ve Riedel, 1994; Cummins ve Johnson, 2003)
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Anaerobik-Aerobik toleranslı, beyaz-bej koloni, katalaz +, hemolitik olmayan, laktoz fermentasyonu +, nitrat indirgeme -	Süt, peynir (çoğunlukla İsviçre tipi olanlar) ve silaj	(Baer ve Ryba, 1992; Cummins ve Johnson, 2003)
<i>P. jensenii</i>	Katalaz – veya zayıf +, hem anaerobik hem aerobik, β -hemolitik, krem-sarı koloniler	Süt, peynir, rumen, silaj	(Britz ve Riedel, 1994; Cummins ve Johnson, 2003)
<i>P. acidipropionici</i>	Katalaz – veya zayıf +, hem anaerobik hem aerobik, bej-turuncu koloniler	Süt, peynir ve rumen	(Britz ve Riedel, 1994)
<i>P. thoenii</i>	Katalaz +, yavaş gelişen, anaerobik, β -hemolitik, sarı/turuncu/kırmızı/kahverengi koloniler	Süt, peynir ve diğer sütürünleri	(Cummins ve Johnson, 2003)
<i>P. cyclohexanicum</i>	Katalaz +, laktik asit üretebilen, aerobik toleranslı, asit toleranslı, beyaz ya da krem koloniler	Bozuk portakal suyu	(Kusano, Yamada, Niwa ve Yamasato, 1997)
<i>P. microaerophilum</i>	Katalaz - , mikroaerofilik- fakültatif aerobik, beyaz konkav koloniler	Zeytin atık suyu	(Koussémon vd., 2001)

Propionibacterium freudenreichii alt türlerinin İsviçre tipi peynirlerin olgunlaşmasında önemli bir rolü vardır. *P. freudenreichii* gerçekleştirdiği metabolik faaliyetler ile birçok aroma bileşeninin oluşumunu sağlamaktadır. Laktat ve aspartat fermentasyonu sonucu daha çok propiyonik ve asetik asit daha az da valerik ve isovalerik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerini oluşturmaktadırlar (Rosa do Carmo vd., 2017). Bu kısa zincirli yağ asitleri Emmental peynirinde asıl aromadan sorumlu tutulmaktadırlar. Bunun yanında *P. freudenreichii* suşa bağlı lipolitik aktiviteye de sahiptir. Bu sayede yine aromadan sorumlu farklı serbest yağ asitleri oluşturmaktadır. *P. freudenreichii* gerçekleştirdiği aminoasit katabolizması sayesinde 2-metilbütonaik asit ve isovalerik asit gibi 2 dallı zincir aroma bileşenleri üretebilmektedir. *P. freudenreichii* sahip olduğu genel özellikler sayesinde peynir üretim sürecinde oluşan yüksek ve düşük sıcaklık, asidifikasyon, tuz konsantrasyonuna bağlı ozmatik stres gibi farklı stres kaynaklarına karşı yüksek tolerans gösterebilmektedir (Thierry, Falentin, Deutsch ve Jan, 2011a).

P. jensenii klasik PAB'lar grubunda yer almakta ve *P. thoenii* ile peynirde kırmızı noktacıklar şeklinde kalite problemine neden olmaktadır. Kanlı besi yerinde beta hemolitik aktivite göstermektedir. Bulunduğu ortam pH'sını 4,4-4,9 arasına kadar düşürebilmekte ve pembe, kırmızı, beyaz veya kahverengi koloniler oluşturabilmektedir. Gelişmesi için pantotenik asit, biotin paraaminobenzoik asite ihtiyaç duymaktadır (Meile vd., 2008). Uygun besi yerinde 13-metil tetradekanoik asit ve 12-metil tetradekanoik asit üretebilmektedir (Önal-Darılmaz, 2010) Bir çalışmada hava püskürtmeli kurutucuda *P. jensenii*, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ve *Lb. acidophilus* LA-5 e göre daha az direnç gösterebilmiştir (Ranadheera, Evans, Adams ve Baines, 2015).

P. thoenii Emmental peynirlerde bulunan kırmızı noktalardan izole edilmiştir. Koyu kırmızı ya da kırmızı-kahverengi renk pigmentleri üretebilmektedir. Kan içeren katı besi yerinde beta hemolitik aktivite göstermekte ve sıvı besi yerindeyse kırmızı ya da turuncu renkte bulanıklık oluşturmaktadır. Glikoz içeren besi yerinde ortamın pH'sını 4,7-4,9 aralığına getirebilmektedir. Diğer PAB'lara göre daha az anaerobiktir. Gelişmesi için ise biotin ve pantotenik aside gereksinim duymaktadır (Önal-Darılmaz, 2010) .

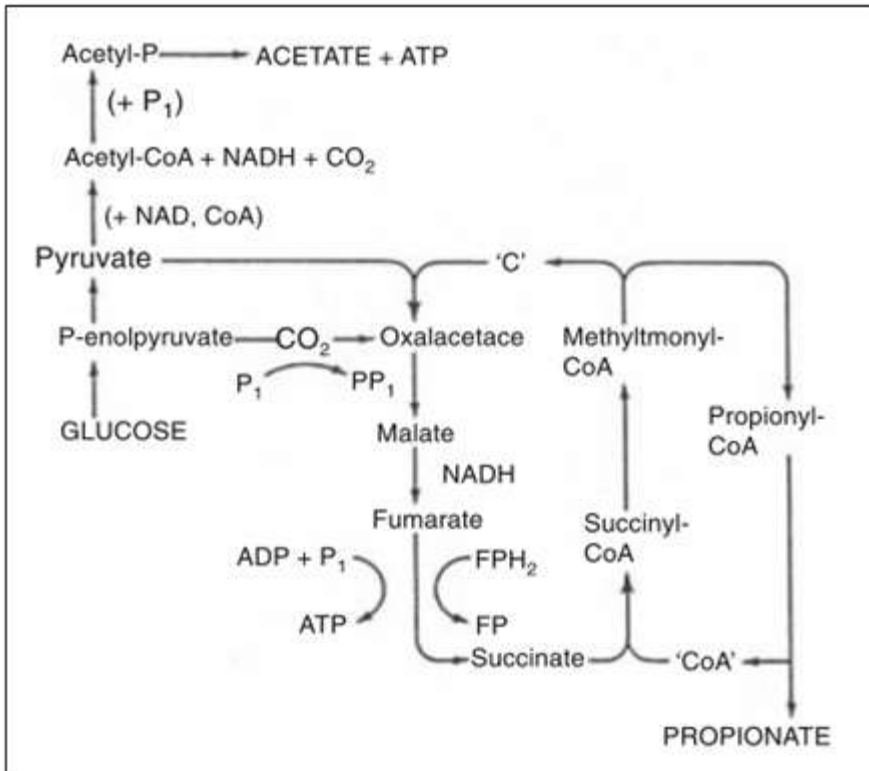
P. acidipropionici süt ürünlerinden izole edilen, griden beyaza opak renkte koloniler oluşturabilen bir türdür. Glikoz içeren besi yerinde beyaz renkli çökeltiler oluşturup ortamın pH'sını 4,1-4,9 arasına getirebilmektedir. Hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gelişebilen

suşları vardır. Gelişmesi için pantotenik asit ve biotine ihtiyaç duyarken tiamin gereksinimi duymamaktadırlar (Önal-Darılmaz, 2010). Bu mikroorganizma türleri gliserol fermentasyonu sonucu asetik asit üretmeden en iyi şekilde propiyonik asit üretebilmektedirler (Rosa do Carmo vd., 2017).

2.2.2. Metabolik Özellikleri

Propiyonik asit bakterileri bazı özel metabolik reaksiyonlara sahiptir. PAB'ların metabolizmaları birbirine bağlı ve eşzamanlı gerçekleşen bir sürü reaksiyondan oluştuğu için karmaşık yapıdadır. PAB'lar anaerobik olmalarına karşın aerotoleranslı yapıdadırlar. Besin ihtiyaçları çok az, aynı zamanda farklı çevresel koşullara adapte olabilme yetenekleri yüksektir (Stackebrandt vd., 2006).

PAB'lar en temel metabolik faaliyetleri; glikoz fermentasyonu sonucu CO₂, propiyonik asit ve asetik asit üretmeleridir. Propiyonik asit üretebilme yetenekleri bu grup mikroorganizmanın karakteristik özelliğidir (Thierry vd., 2011b).



Şekil 2.3. Propiyonik asit fermentasyonu sonucu asetat, propiyonat ve CO₂ oluşum reaksiyonu (Allen, Kellermeyer, Stjernholm ve Wood, 1964 adapte edilmiştir.)

Glikozun, Embden-Mayerhof yoluyla piruvata dönüştürülmesi ve asetat ile propiyonatin oluşum reaksiyonları Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Piruvatın propiyonata indirgenmesi transkarboksilaz döngüsü veya Wood-Werkman döngüsü ile gerçekleşmektedir (Houwen, Dijkema, Stams ve Zehnder, 1991). Bu döngüde glikoliz ve piruvat oksidasyonu sırasında oluşan NADH kullanılır ve ekstra ATP üretilir. Transkarboksilaz döngüsünün tüm reaksiyonları geri dönüşümlüdür. Anahtar reaksiyonlardan biri, ATP tüketimi olmadan meydana gelen bir karboksil grubunun, oksaloasetat ve propionil-CoA oluşturmak üzere metilmalonil-CoA'dan piruvata aktarılmasını sağlayan transkarboksilasyon reaksiyonudur. İlgili enzim, bilinen yapının üç alt biriminden oluşan karmaşık, biyotine bağımlı bir karboksitransferazdır (Thierry vd., 2011b).

PAB'ların temel enerji gereksinimleri bu reaksiyon sayesinde karşılanmaktadır. Her reaksiyona giren glikoz molekülü 4 ATP'lik enerjiye dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonda üretilen propiyonik asitin asetik asite oranı 2:1 şeklinde olup 5:1 oranına kadar artabilmektedir (Stackebrandt vd., 2006).

Klasik ve Deri propiyonik asit bakterilerinin temel besin ihtiyaçları benzerdir. Tüm türler metabolik faaliyetlerini gerçekleştirebilmek için pantotenik asit ve biotin ihtiyacı duyarken, bazı türler tiamin ve para-aminobenzoik asit gibi ihtiyaçları da olmaktadır. Maya ekstraktının birçok türün gelişimini desteklediği de birçok çalışmada görülmüştür. PAB'ların birçok türü gelişmek için aminoasit ihtiyacı duymazken, tüm aminoasitleri içeren sindirilmiş kazein ekli besiyerlerinin gelişmeyi olumlu etkilediği de bilinmektedir (Önal-Darılmaz, 2010).

2.2.3. Propiyonik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

PAB'ların tanımlanması için önerilen birçok farklı yöntem bulunmaktadır. PAB'lar genellikle biyokimyasal testler ile tanımlansa da son 20 yılda moleküler tanımlama yöntemlerinde hızlı bir gelişme yaşanmıştır. PAB'ların tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler farklı analiz süreleri gerektirdiği için sonuçları etkilemekte bu da sonuçların değerlendirilmesinde problem oluşturabilmektedir.

Restriksiyon enzim analizi, rastgele olarak amplifiye edilen polimorfik DNA (RAPD), vurgulu alan jel elektroforezi ve ribotipleme gibi farklı tanımlama yöntemleri de PAB'ların tanımlanması için kullanılmakla birlikte suş bazında bu yöntemlerin de doğru tanımlama yapmadığı bildirilmiştir (Önal-Darılmaz, 2010).

Tilsala-Timisjärvi ve Alatossava (2001) 16S-23S rRNA aralayıcı sekanslarından spesifik primer çiftlerini üreterek, türlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tanımlanması için kullanmıştır. *Propionibacterium acidipropionici*, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve subsp. *shermanii*, *P. jensenii* ve *P. thoenii* türleri arasında dizilerin büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.

PZR yaklaşımli tanımlama yöntemlerinden biri olan. multiplex PZR yöntemi PAB'lara özgü olan 16S rDNA dizisinde bulunana oliganükleotid gd1 (5'-TGCTTTTCGAT ACGGGT TGAC) bağlıdır. Bu oligonükleotid bak11w (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG) ve bak4 (5' - AGGAGGTGATCCARCCGCA) primerleri ile 900 ve 1500 baz çifti büyüklüğünde eş zamanlı 2 fragment oluşturmaktadır. Bu yöntem gıdalarda bulunan PAB'ları hızlı bir şekilde belirleyebilmek için kullanılabilir (Meile vd., 1999).

Moleküler tanımlama yöntemleri özellikle klinik ve çevresel uygulamalarda mikroorganizmaların tanımlanması için yaygın olarak kullanılsa da gıda kaynaklı mikroorganizmaların tanımlanmasında DNA şablonunun hazırlanması sırasında matriks kaynaklı problem oluşturmasından dolayı daha az tercih edilmektedir. Ayrıca moleküler tanımlama yöntemlerinin uzun hazırlık süreçleri ve uzman personel gerektirmesi alternatiflerin geliştirilmesine neden olmuştur.

Kısa analiz süreleri ve yüksek derecede doğru tanımlama oranları, kütle spektrometrik yöntemlerini bakteriyel kemotaksonomi için çekici hale getirmiştir. Bakterilerin karakterizasyonu için kütle spektrometresi kullanımı Anhalt ve Fenselau tarafından 1975 gibi erken bir zamanda araştırılmıştır. Son zamanlarda, kütle spektrometresi uzmanları farklı moleküllerin ağırlıklarını ölçebilmek için farklı iyon kaynakları ve detektörleri tasarlamışlardır. Cain vd. bozulan hücrelerden izole edilen proteinlerin analizine dayanarak bakterileri ayırt etmek için matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresinin (MALDI-TOF-MS) kullanımının uygun olduğunu bildirmişlerdir (Cain, Lubman, Weber ve Vertes, 1994).

2.3. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS)

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların rutin tanımlama işlemlerinde MALDI-TOF-MS teknolojisinin kullanımı giderek artmaktadır. Geleneksel

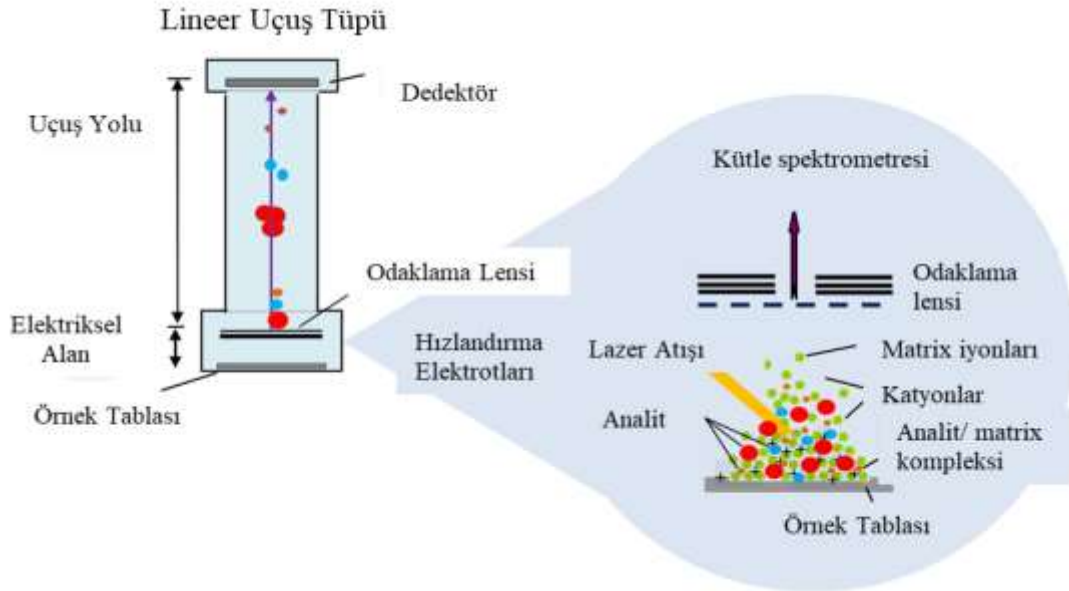
tanımlama yöntemleri ile birçok bakterinin doğru tanımlanması çok büyük bir oranda yapılabilmektedir. Ancak bu yöntemlerin ekonomik maliyetleri çok yüksektir ve sonuç alma süreleri çok uzundur. PZR tabanlı tanımlama yöntemleri kullanıldığında bile tanımlama sınırlı olmaktadır, mikroorganizmanın Gram pozitif/negatif özellikleri, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria*, *Haemophilus* grubu gibi ayrımların önceden belirlenmesi gerekmektedir. Genotipik tanımlama ise, özel bazı mikroorganizmalara özgü olduğu ve pahalı olduğu için rutin laboratuvar çalışmalarına uygun değildir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, MALDI-TOF-MS teknolojisinin mikroorganizmaların rutin tanımlanmasında kullanılmaya başlanması çığır açmıştır (Fox, 2006). Bu yöntemde, organizmaların protein yapılarının kütle spektrofotometresinde iyonizasyonu ve ölçülen m/z değerlerine göre elde edilen spektrumların sistemin veri tabanındaki referans bilgilere uyumuna göre mikroorganizmaların cins ve türleri tanımlanabilmektedir. Bu yöntem sayesinde besi ortamından direkt izole edilerek üretilmiş aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar çok kısa bir süre içinde ve çok geniş bir veri tabanında cins ve tür düzeyinde hatta suş bazında doğru olarak tanımlanabilmektedirler (Seng vd., 2009).

MALDI-TOF-MS, nükleik asitler, peptitler, proteinler gibi birçok farklı biyomolekülü tespit edebilir. Bu sistem, proteinlerin parmak izlerinin üretilmesi ve ardından bir veri tabanında referans spektrumlarla karşılaştırılması ile mikroorganizmaların tanımlanmasını sağlar. Tüm kütle spektrometrik yöntemlerin temel prensibi, nötr bir molekülün iyonlaştırılması ve daha sonra elde edilen primer iyonların ve bunların alt ürünlerinin yüksek vakumda doğru bir şekilde belirlenmesidir. Tipik bir kütle spektrometresi üç ana bileşenden oluşur: bir iyon kaynağı, bir kütle analizörü ve detektör (Pavlovic, Huber, Konrad ve Busch, 2013).

MALDI sistemleri organik bileşiklerin içinde gömülü olan biyomolekülleri parçalamadan iyonize eder. Tanımlanacak örnek ilk önce bir matriks bileşiği ile kristalleştirilir. Protein analizi için uygun matrisler: 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) veya 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit (sinapinik asit, SA)'tir. Küçük organik bileşik radyasyonu bir UV lazerden emer ve enerjiyi proteinlere aktarır. Proteinler bozulmadan iyonize olurlar. MALDI sistemindeki iyonizasyon iki aşamadan oluşur. Lazer atışının enerjisi ideal olarak sadece matriks tarafından emilmelidir. Lazer vuruşları uygun frekansta belirlendiğinde, bir kısmı buharlaşmış ve buharda bulunan intakt polimeri taşıyan polimer zincirlerinin elektrik yüklenmesine neden olan matrikse enerji aktarılır. Böylece matriks buharlaşarak iyonların örneğe taşınmasını sağlar. İyonizasyon ile her molekül tipinden bir çeşit iyon elde edilir. Gaz fazına girdikten sonra, yüklü moleküller daha sonra bir elektrik

alanında hızlandırılır, kütle/yük kütle değerlerine (m/z) göre bir kütle analiz cihazında ayrılır ve bir dedektör ile belirlenir (Holland vd., 1996). Şekil 2.4'te çalışma prensibi gösterilmiştir.

Farklı dedektör çeşitleri mevcuttur. MALDI-TOF-MS sisteminde TOF (time of flight) uçuş zamanı analizleri kullanılır. TOF analizler, aynı elektrik alanında hızlanan tüm iyonların aynı kinetik enerjiye sahip oldukları gerçeğinden yararlanırlar. Elektrik alanından ayrıldıktan sonra uçuş tüpüne girerler ve kütlelerine bağlı olarak farklı hızlara sahiptirler. Büyük iyonların uçuş tüpünden geçmesi küçük iyonlardan daha fazla zaman alır. TOF kütle spektrumu zamana bağlı bir fonksiyon olarak, belirleyici sinyalin kaydedilmesini sağlar. Kütle (m) bir molekülünün uçuş zamanı ve bu mesafeyi geçerken yüklediği yük (z) (m/z)^{1/2}'ye orantılıdır. Zaman ve (m/z)^{1/2} arasındaki ilişki iyonların kütlelerini hesaplamada kullanılır (Yalınay Çırak, 2010).



Şekil 2.4. MALDI-TOF-MS çalışma prensibi

MALDI-TOF-MS yönteminin en önemli limiti kullanılan veri tabanının çeşitliliğidir. Tanımlanmak istenen mikroorganizmaların profilleri referans olarak kullanılan kütle spektrometrik profillerinin kalitesine ve miktarına bağlı olarak tanımlanabilmektedir (Höll, Behr ve Vogel, 2016).

Tanımlanma prosedürü izolatin matriks solüsyonu ile karıştırılıp örnek tablosuna yüklenmesiyle başlar. Örnek tablosunun büyüklüğüne bağlı olarak 16 ile 384 örnek aynı anda yükleme yapılabilmektedir. Cihaza yükleme yapıldıktan sonra yüksek vakum uygulaması başlar. Vakum tamamlandıktan sonra lazer atışları başlar. Lazer enerjisi ile mikroorganizma ve matriks çözeltisi buharlaşır. Bu da ribozomal proteinlerin iyonlaşmasına neden olur. Elektromanyetik alanda iyonla hızlanarak uçuş tüpüne girer ve uçuş süresi iyonların dedektöre ulaşmasına bağlı olarak ölçülür. Proteinlerin iyonlaşma derecesi ve kütlesi uçuş zamanlarını belirlemektedirler. Uçuş zamanlarına bağlı olarak da her örnek için spesifik spektrum elde edilir (Angeletti ve Ciccozzi, 2019).

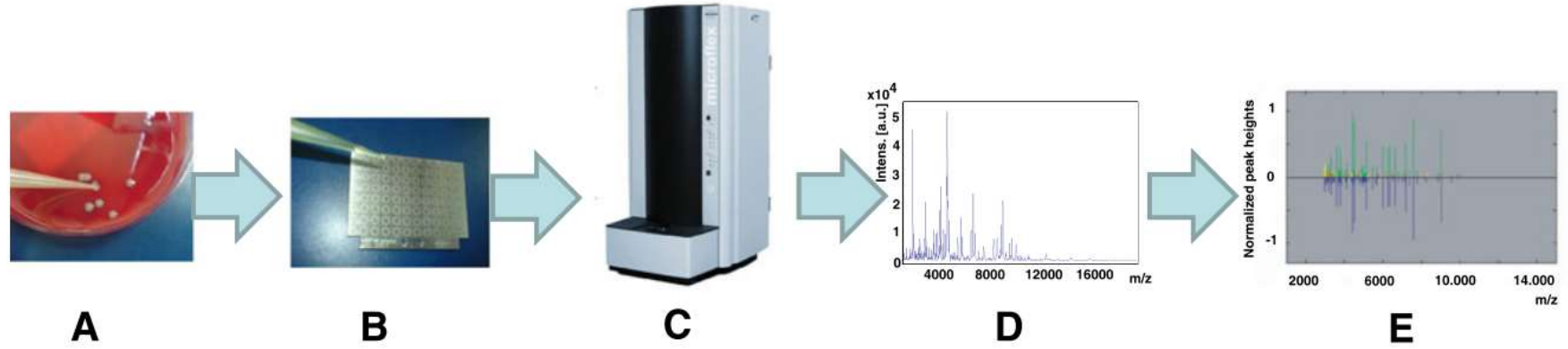
Bilgisayar yazılımı, toplanan spektrumları çok çeşitli izolatlar içeren bir referans veri tabanı ile otomatik olarak karşılaştırır. Bu yazılım referans ile örneğin spektrumunu karşılaştırarak numerik bir değer (skor) hesaplamaktadır. Bu skor değeri, kimliğin geçerliliği hakkında bilgi verir. 2,0'ın üzerinde bir puan değeri genellikle geçerli bir tür seviyesi tanımlaması olarak kabul edilir. 2,0 ve 1,7 arasındaki değerler güvenilir cins düzeyinde tanımlamaları temsil eder. 1,7'nin altında ki skorlar için mikroorganizmanın tanımlanması güvenilir değildir. Ayrıca yazılım, güvenilirlik kontrolleri için en iyi eşleşmenin yanında ek sonuçları da görüntüler (Wieser, Schneider, Jung ve Schubert, 2012). MALDI-TOF-MS ile mikroorganizma tanımlanmasının akış şeması Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

MALDI-TOF-MS sistemleri daha çok klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutinde kullanılsa da bugüne kadar gıda ile ilgili mikroorganizmalar için de pek çok çalışma yapılmıştır (Dušková, Šedo, Kšicová, Zdráhal ve Karpíšková, 2012; Höll vd., 2016; Nacef, Chevalier, Chollet ve Flahaut, 2017; Vorob'eva, Khasaeva, Vasilyuk ve Trenquil, 2011).

İzolasyon kaynağından bağımsız olarak bakterilerin geleneksel fenotipik tanımlamasına paralel olarak rutin MALDI-TOF kütle spektrometresi tanımlamasını incelendiği bir çalışmada koloniler (doğrudan MALDI-TOF plakası üzerine bırakılan izolat başına 4 nokta), bir Autoflex II Bruker Daltonik kütle spektrometresi kullanılarak analize alınmıştır. Peptid spektrumları Bruker BioTyper veritabanı sürüm 2.0 ile karşılaştırılmıştır. Analiz edilen 1660 bakteriyel

izolatın %95,4'ü MALDI-TOF kütle spektrometresi ile doğru bir şekilde tanımlanmıştır; %84,1'i tür düzeyinde, %11,3'ü cins düzeyinde belirlenmiştir. MALDI-TOF kütle spektrometresinin belirlenmesi için gerekli ortalama süre 1 izolat için 6 dakikadır. Bu çalışma MALDI-TOF kütle spektrometresinin, rutin tanımlama için ekonomik ve hızlı yöntem olduğunu göstermiştir (Seng vd., 2009).

Laktobasillerin tanımlanması için yapılan bir çalışmada üç yöntem; Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) ile 16S rDNA MseI ile kısıtlı kısıtlama analizi (16S-ARDRA) uygulanmıştır. Bu yöntemler *Lactobacillus* türlerini tanımlama yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Üç yöntem 19 adet referans *Lactobacillus* suşu üzerinde karşılaştırıldıktan sonra, süt ve et ürünlerinden izole edilen 148 suş PZR ve MALDI-TOF-MS ile karakterize edilmiştir. Suşlar sırasıyla PCR ve MALDI-TOF-MS ile dokuz ve on laktobasil türüne ayrılmış ve bu türlerin dokuzu uyumlu bulunmuştur. Tür seviyesi belirlenmesinin başarı oranları PCR için %77 ve MALDI-TOF-MS için %93 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, yakından ilişkili *Lactobacillus* türleri arasında ayırım yapmak için, MALDI-TOF-MS'nin daha güvenilir bir tanımlama elde etmek için genotipik tekniklerle birlikte kullanılması tavsiye edilmiştir (Dušková vd., 2012). Şekil 2.5'te bakterilerin kütle spektrometrik protein parmak izlerine göre tanımlanması gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Bakterilerin kütle spektrometrik protein parmak izlerine göre tanımlanması. Saflaştırılmış koloniden örnek alınması (A), Örnek tablosuna yüklenen izolata matris solüsyonu ile muamelesi (B), Örneğin cihaza yüklenip okunması (C), İzolata ait spektrumun elde edilmesi (D), Örneğin spektrumunun referans spektrumlarla karşılaştırılarak tanımlanması (E)

Nacef vd. (2017) gerçekleştirdikleri çalışmada, MALDI-TOF kütle spektrometresi (MS) kullanılarak çiğ veya pastörize süt ile yapılan Fransız peynir Maroilles'ten izole edilen laktik asit bakterileri profillerini belirlemişlerdir. Maroilles peyniri kabuğundan ve iç kısmından alınan numuneler, 30 °C'de MRS agara ekim yapılmış ve 197 Gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar, MALDI-TOF-MS ile tanımlamaya tabi tutulmuştur. Tüm izolatlar açık bir şekilde tanımlanmıştır: Çiğ sütle yapılan Maroilles'den 105 suş (kabukta 38 ve iç kısımda 67) ve pastörize sütle yapılan Maroill'den 92 suş (kabukta 39 ve iç kısımda 53) belirlenmiştir. MALDI-TOF-MS tanımlaması ile *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* dâhil olmak üzere LAB'a ait üç cinsin tanımlanması yapılmış, *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*), *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fructivorans*, *Lb. parabuchneri*, türleri en çok belirlenen türler olmuştur. Her iki tür süt ile yapılan Maroilles'de bulunan ortak tür ise *Lb. brevis* olarak belirlenmiştir. Seçilen suşlar üzerinde gerçekleştirilen 16S rDNA tabanlı tanımlama ile elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon göstermiştir ki MALDI-TOF-MS, bakteri karakterizasyonu için hızlı, ekonomik ve yaygın olarak kullanılabilir alternatif bir yöntemdir.

Laboratuvarlar arası, gıda ile ilişkili bakterileri tanımlamak için MALDI-TOF-MS kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada 16 farklı laboratuvarında Bruker Daltonics MALDI Biyotip sistemi, VITEK MS Ruo SARAMIS, VITEK MS IVD Ruo (bioMérieux, Fransa) ve PAPMID (Mabritec AG, İsviçre) cihazları ve sistemleri kullanılmıştır. Referans suşlar ile yapılan çalışmada ilgili bakteri türleri için ortalama %34 ile %100 arasında doğruluk oranları elde edilmiştir. Doğru tanıma yüzdeleri, platform ve kullanılan veri tabanlarından bağımsız olarak karşılaştırılmıştır. Kullanılan farklı marka cihazların elde edilen sonuçlar üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür (Huber, Pavlovic, Maggipinto, Konrad ve Busch, 2018).

Başka bir çalışmada 110 bakteri izolatu (47 tanesi Baird-Parker Agardan, 63 tanesi de Man, Rogosa, Sharpe agardan) MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analize alınmıştır. Stafilokok olmayan Baird-Parker agar izolatlarının 47'sinde en çok bulunan (n = 37) *Macroccoccus caseolyticus*, onu *Enterococcus faecalis* (n = 6) izlemiştir. *Corynebacterium aurimucosum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cronobacter sakazakii* ve *Enterococcus faecium* da tanımlanmıştır. 63 *Lactobacillus* olmayan izolat arasından 18 izolat *Leuconostoc mesentroides*, 17'si *Enterococcus faecalis*, 14'ü *Lactococcus lactis*, 5'i *Enterococcus durans*, 5'i *Lactococcus garvieae*, 2'si *Leuconostoc pseudomesenteroides* ve

pusudiosetosus pusudiocios olarak tanımlanmıştır. *Enterococcus faecalis*, her iki ortam türünden elde edilen tek tür olup, tüm izolatlar tür seviyesinde başarıyla tanımlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, MALDI-TOF kütle spektrometresinin peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımında başarılı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ledina vd., 2018).

Türkiye’de geleneksel peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerini tanımlamak için yapılan bir çalışmada MALDI-TOF-MS yöntemi tercih edilmiştir. Geleneksel olarak yapılan 21 peynir örneğinden toplam 150 laktik asit bakterisi (LAB) izolatu elde edilmiştir, MALDI-TOF MS analizi kullanılarak bunlardan 100’ü cins seviyelerinde *Leuconostoc* (10), *Lactobacillus* (46) ve *Enterococcus* (44) olarak tanımlanmıştır. 71 suş *Enterococcus durans* (6), *E. faecalis* (18), *E. faecium* (24), *E. italicus* (2), *Lb. brevis* (1), *Lb. paracasei* (2), *Lb. plantarum* (1), *Lactococcus lactis* (3), *Leuconostoc lactis* (1), *Leu. mesentroides* (11) ve *Streptococcus parauberis* (2) tür seviyelerinde tanımlanmıştır (Kanak ve Yılmaz, 2018).

Propiyonik asit bakterilerini MALDI-TOF-MS ile tanımlamayı amaçlayan bir çalışma Vorob’eva vd. tarafından (2011) gerçekleştirilmiştir. PAB’ların karakteristik protein pikleri (3496, 5386, 5605, 10 470) elde edilen spektrumlarda gözlemlenmiştir. Ayrıca B12 vitamini üreten ve üretmeyen *P. shermanii* suşları MALDI’de elde edilen parmak izi profilleri ile ayırt edilebilmiştir. MALDI profilleri kullanılarak belirlenen bakteri grupları, filogenetik 16S rRNA gen grupları ile korelasyon göstermiş, böylece bu yöntemin, spesifik olmayan farklılıkların (alt türler, suşlar) ayırt edilebilmesi için kullanılabileceği kanıtlamıştır.

Literatür incelemeleri MALDI-TOF-MS in bakterilerin tanımlanmasında hızlı, güvenilir ve ekonomik bir yöntem olduğunu göstermiştir. Ayrıca propiyonik asit bakterileri de bu yöntemle suş bazında ayırım yapılabilmektedir. Bütün bu bilgilerin ışığında bu çalışmada hem yenilikçi hem ucuz hem de hızlı olması nedeniyle bu tanımlama yöntemi tercih edilmiştir.

2.4. Propiyonik Asit Bakterilerinin Probiyotik Önemi

Probiyotikler denince ağırlıklı olarak bifidobakteriler ve laktik asit bakteriler akla gelmektedir. Bununla birlikte, klasik propiyonibakterilerinin de henüz çok bilinmeyen

probiyotik özellikler sergilediğine dair çalışmalar mevcuttur. Bilinen teknolojik uygulamalarına ek olarak, klasik propiyonibakterileri, umut verici probiyotik özellikleri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir. *Propionibacterium* spp. folik asit, prolin, konjuge linoleik asit ve B12 vitamini gibi insan sağlığını artıran çok çeşitli biyolojik bileşikler üretebilir ve bakteriyosinler veya antifungal bileşikler gibi birkaç farklı biyokoruyucu bileşik sentezleyebilir (Rabah, Rosa do Carmo ve Jan, 2017).

Günümüze kadar propiyonik asit bakterilerinin insan sağlığını olumlu yönde etkileyebilecek bazı özellikleri araştırılmış ve bu bakteriler probiyotik mikroorganizmalar olarak önerilmiştir. Bazı PAB suşları sadece probiyotik preparatlarda kullanılır veya laktik asit bakterileri ve/veya bifidobakteriler ile birleşim halinde kullanılmaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda da PAB'lar genellikle birden fazla farklı probiyotik karışımların içinde, nadiren de tek olarak araştırılmışlardır. Aşağıda PAB'ların bilinen en önemli probiyotik özellikleri listelenmiştir;

- B12 vitamini üretimi,
- Konjuge yağ asitleri üretimi
- β -galaktosidaz enzimini üretebilmesi ve bağırsakta safra tuzlarının emilimini kolaylaştırması,
- Antimikrobiyel aktiviteleri
- Ürettikleri bakteriyosin ile *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Yersinia enterocolitica* gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etki göstermesi
- Bifidobakterilerin gelişimini sitümüle ederek kolon hareketini düzenlemesi,
- Laktoz sindirimini kolaylaştırması,
- Bağırsak mikrobiyotasını düzenlemesi,

2.5. Konjuge Linoleik Asit

2.5.1. KLA Kimyasal Yapısı

Gıdalarda en çok bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, esansiyel yağ asitlerinin tipik özelliği olan *cis* formlarında karbon çift bağları arasında bir metilen bazı içerir. Konjuge yağ asitleri ise pozisyonel ve geometrik formlarında konjuge çift bağlar içermektedir. Doğada birçok farklı konjuge yağ asiti bulunmaktadır. Konjuge linoleik asitler (KLA) hakkında en çok çalışma yapılan yağ asitlerinden biridir (Ogawa vd., 2005).

Konjuge yağ asitleri; *cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis* ve *trans-trans* olmak üzere dört farklı geometrik konfigürasyonda 24 farklı KLA oluşturabilirler. Doğada en çok rastlanan KLA izomerleri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. KLA, pozisyonel (7,9-11,13-) ve geometrik (*cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* veya *trans-trans*) linoleik asit izomerleri (*cis*9, *cis*12-18: 2) karışımıdır. Parodi (1977) ilk kez *c9-t11* izomerini ruminant süt yağından elde ederek tanımlamış ve daha sonra “rumenik asit” olarak adlandırmıştır. Sonra yapılan çalışmalarla süt yağında bulunan baskın izomerin *c9-t11* (%75-90) olmasına karşılık diğer izomerlerin de *t10-c12*, *t9-t12* ve *t7-c9* değişen oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Bauman, Baumgard, Corl ve Griinari, 1999).

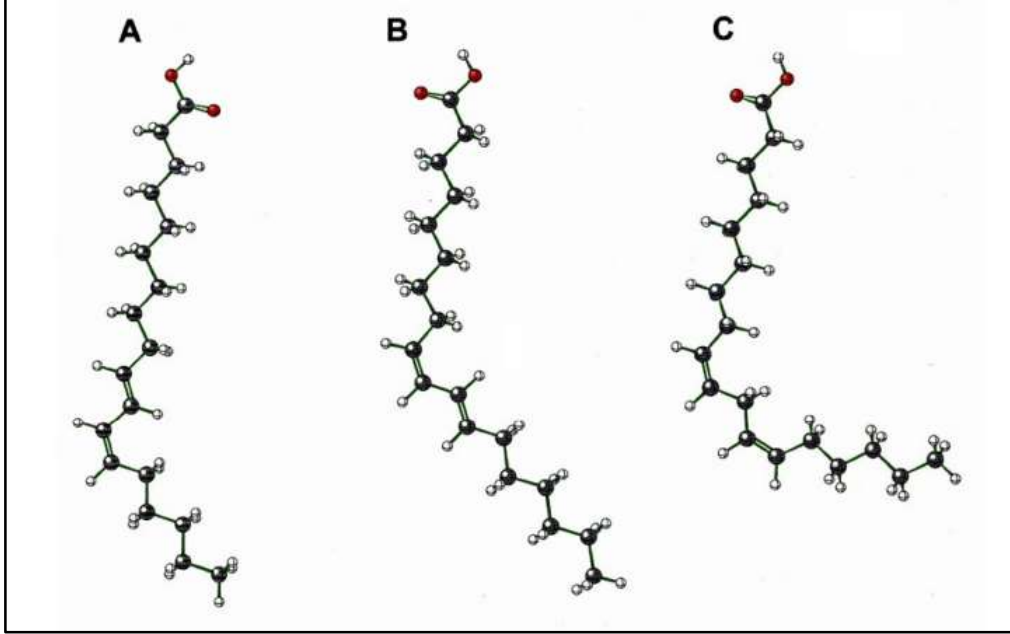
Çizelge 2.2. Doğada en sık bulunan KLA izomerleri

<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11	<i>cis</i> -10, <i>cis</i> -12
<i>cis</i> -10, <i>trans</i> -12	<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	<i>trans</i> -10, <i>trans</i> -12
<i>cis</i> -11, <i>cis</i> -13	<i>trans</i> - 9, <i>trans</i> -11	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -11

KLA’nın neredeyse tüm *cis* ve *trans*- izomerik kombinasyonları gıdalarda tanımlanmıştır. Bununla birlikte, diyetle en sık bulunan KLA izomeri *cis*-9, *trans*-11, okta dekadienoik asittir (*c9-t11* KLA). Aksi belirtilmedikçe KLA'nın bir izomer karışımını gösterdiği bilinmelidir. Eğer, *c9-t11* KLA şeklinde izomer belirtiliyorsa bu gösterim sadece o moleküle karşılık gelmektedir. Bu ayırım önemlidir çünkü farklı izomerlerin *in vivo* farklı aktiviteleri vardır (Kelly, 2001).

Baskın izomer *c9-t11*’den başka önemli biyoaktif özelliklere sahip olan izomer *t10-c12* izomeridir. Şekil 2.6’da linoleik asit ve bu izomerlerin 3 boyutlu gösterimi verilmiştir.

Bu iki izomerinin sağlık etkileri bazen farklı, çoğu zaman da zıt yöndedir. Çeşitli hayvan denekleri üzerinde yapılan çalışmalar *c9-t11* KLA izomerinin büyümeden sorumlu olduğunu ve diğer izomer *t10-c12* KLA izomerinin ise vücut yağını azaltmada etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.6. Konjuge linoleik asit izomerlerinin ve linoleik asidin kimyasal yapısının 3 boyutlu gösterimi (A) *t10-c12* oktadekonoik asit, (B) *c9-t11* oktadekonoik asit ve (C) *c9-c12* oktadekonoik asit (linoleik asit)

KLA ile ilgili çalışmaların artması 1979 yılında yayınlanan ve KLA'nın pişirilmiş sığır etinde antikarsinojenik ve mutajenik etkilerinin belirtildiği çalışılmaya başlanmış ve daha sonra obezite, diyabet ve bağışıklık sistemi üzerine olumlu etkileri oluğunun keşfiyle giderek artmıştır (Mcguire ve Mcguire, 1999; Pariza vd., 1979). KLA'nın en temel kaynağının hayvansal gıdalar olması ve bu ürünlerin fermentasyon gibi bazı prosesler ile arttırılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (Campbell, Drake ve Larick, 2003; Coakley vd., 2007; Kishino, Ogawa, Omura, Matsumura ve Shimizu, 2002; Sieber, Collomb, Aeschlimann, Jelen ve Eyer, 2004).

2.5.2. Ticari KLA Üretimi

Normal olarak, KLA'ları kimyasal olarak sentezlemek için üç üretim yolu önerilmiştir: (1) Alkali izomerizasyonu, (2) Hidroksi yağ asitlerinin dehidrasyonu ve (3) Asetilenik bağların indirgenmesi. Bunlar arasında, substrat olarak linoleik asit veya

linoleik asit açısından zengin bitkisel yağlar kullanılarak gerçekleştirilen alkali katalizli izomerizasyon, KLA izomerlerinin karışımını veren en baskın yöntemdir (Gong, Hu, Wei, Jin ve Wang, 2019).

Alkali izomerizasyon etilen glikol, gliserol, dimetil sülfosid (DMSO), *tert*-butanol ve su gibi farklı solventlerin lityum, sodyum ve potasyum gibi katalizörler kullanılarak genellikle ticari olarak KLA üretmek için tercih edilir (Pariza, 2004). Sentetik olarak üretilen KLA izomerlerinin sağlığa etkileri tüketicilerde şüphe uyandırdığı için doğal yollarla sentezlenen KLA'ya ilgi artmıştır.

KLA doğal olarak linoleik asitin rumende bakteriyel biyohidrojenasyonu ile et ve süt ürünleri gibi ruminant gıda ürünlerinde bulunur. Biyohidrojenasyon; doymamış yağ asitlerinin izomerizasyonla doymuş yağ asitlerine dönüştürülmesi ve rumen bakterileri tarafından doymamış yağ asitlerinin hidrojenasyonunu içine alan genel bir terimdir. KLA rumendeki *Butyrivibrio fibrisolvens* ve diğer rumen bakterileri tarafından linoleik asitin stearik asite biyohidrojenasyon süreci sırasında ara madde olarak veya t-11 C18:1'in endojen dönüşümünden meydana gelmektedir (Bauman vd., 1999)

KLA'nın doğal olarak sentezi hem diyet alınan linoleik asitin rumende gerçekleşen mikrobiyal enzimatik reaksiyonlar ile sentezi hem de meme bezlerinde vaksenik asit sentezi şeklinde gerçekleşmektedir. Bu nedenden dolayı KLA'nın en temel kaynağı süt ve süt ürünleridir (Cossignani ve Blasi, 2019).

2.5.3. KLA Biyosentezi

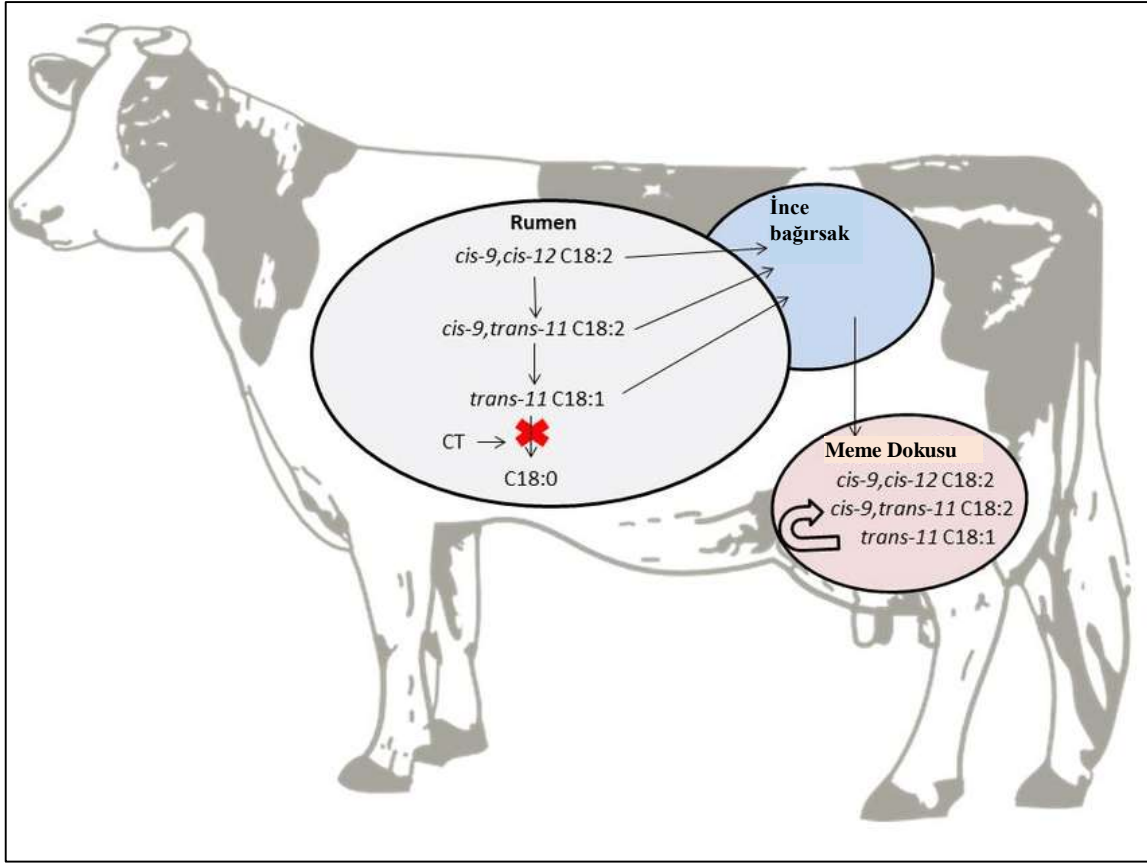
Yapılan çalışmalar KLA'nın doğal olarak ruminant hayvanlarda sentezlenmesi için iki ayrı mekanizma olduğunu kanıtlamıştır

Birinci mekanizma geviş getiren hayvanların rumenlerinde gerçekleşen mikrobiyal biyohidrojenasyon, doymamış yağ asitlerini bağırsak biyotası ile doymuş yağ asitlerine dönüştürme işlemidir. Biyohidrojenasyon, rumende bulunan mikrobiyal ekosistemde yaygın olan eşsiz bir biyolojik süreçtir. *Butyrivibrio fibrosolvens*'in sahip olduğu bir enzim olan linoleat cis-12, *trans*-11 izomeraz enzimi ile rumende bulunan cis-9, cis-12 linoleik asitin 12. karbonunda bulunan çift bağ 11. karbona taşınarak cis/cis olan konfigürasyon cis/*trans* haline dönüştürür (Fritsche vd., 1999).

KLA'nın (*c9-t11*) dokulara emilmeyen kısmı KLA redüktaz enzimi sayesinde vaksenik asite dönüşür. Tipik bir yem diyeti ile beslenen hayvanlarda, ruminal içeriklerde bulunan başlıca biyohidrojenasyon ara maddesi *trans*-vaksenik asittir (*trans*-11 C18: 1, *t*-VA). *Trans*-vaksenik asit (*t*-VA), rumende doymuş yağ asidinin ve doku seviyesinde konjuge linoleik asidin sentezi için bir öncü görevi görür. *t*-VA, rumende stearik asit oluşturmak üzere indirgenir (Griinari vd., 2000; Kelly, 2001).

İkinci yöntem ise dokularda KLA sentezlenmesidir. KLA sentezi memeli adipoz dokularında ve memeli salgı bezlerinde gerçekleşmektedir. Rumende üretilip dokulara geçiş yapan *t*-VA meme salgı bezlerinde ve adipoz dokulardaki Δ -9 desaturaz enziminin aktivitesiyle linoleik aside desaturasyonunda ara ürün olarak KLA oluşturulmasıdır. Şekil 2.7'de KLA ruminatlardaki KLA sentezi gösterilmiştir (Bauman vd., 1999).

Linoleik asitin yanı sıra α -linoleik, γ -linoleik ve oleik asit de rumende önce *t*-VA'ya, daha sonra da stearik asite dönüştürülür. Ancak bu yağ asitlerinde ara ürün olarak *c9-t11* izomerinin sentezi olmamaktadır.



Şekil 2.7. Ruminantlarda gerçekleşen KLA biyosentezi mekanizması

c9-t11 izomeri geniş getiren hayvanların yağ dokusunda bulunan toplam KLA'nın %90'ından fazlasını oluşturan baskın izomerdir. *c9-t11* izomerinin hidrojenasyonu ile oluşan vaksenik asit ise süt ve süt ürünlerindeki baskın doymamış tekli doymamış yağ asididir. Griinari vd. (2000) süt yağ asitlerindeki *c9-t11* izomerinin %64'ünün meme dokusunda vaksenik asitten $\Delta 9$ -desaturaz enzimi aktivitesi ile oluşturulduğunu göstermişlerdir.

2.5.4. KLA Kaynakları

Gıdalarda KLA en çok geniş getiren hayvanlardan elde edilen yağlarda bulunmaktadır. Et, süt ve ürünleri ağırlıklı olarak *c9-t11* KLA izomerini içermektedir. Bunun yanında kümes hayvanları ve yumurtaları da daha az olmakla beraber önemli oranda KLA içermektedir. Bitkisel kaynaklı gıdalarda ise KLA çok düşük miktarlarda bulunabilir (Peng, West ve Wang, 2006). Bazı gıda ürünlerinin toplam KLA ve % *c9-t11* izomeri içerikleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı gıda maddelerinin KLA ve *c9-t11* içerikleri (Fritsche ve Steinhart, 1998; Lin, Boylston, Chang, Luedecke ve Shultz, 1995)

Gıda türü	Toplam KLA (mg/g yağ)	<i>c9-t11</i> 18:2 (%)
Et ve Balık Ürünleri		
Dana Eti	4,3	85
Koyun Eti	5,6	92
Domuz Eti	0,6	82
Tavuk Eti	0,9	84
Yumurta sarısı	0,6	-
Samon Balığı	0,3	-
Karides	0,6	-
Süt ve Süt Ürünleri		
Süt	5,5	92
Tereyağ	4,7	88
Yoğurt	4,8	84
Dondurma	3,6	86
Krem Peynir	3,8	88
Çedar Peyniri	3,6	93
Parmesan Peyniri	3,0	90
Amerikan Peyniri	5,0	93
Yağlar		
İç yağı	2,6	84
Mısır yağı	0,2	39
Aspir yağı	0,7	44
Zeytinyağı	0,2	47

Et ve et ürünlerinin içerdiği KLA miktarı elde edildiği hayvanın türüne göre değişmektedir. Ruminantlar arasında en yüksek KLA içeriğine 5,6 mg/g yağ ile kuzu eti sahiptir. Tek midelilerden elde edilen etler 1 mg/g yağdan daha az KLA içerirken, hindi eti 2-2,5 mg/g yağ, su ürünleri de ihmal edilebilir düzeyde KLA içerir (Fritsche vd., 1999).

Balık ve deniz ürünleri sadece eser miktarlarda KLA ihtiva etmektedir. KLA konsantrasyonu, pike veya levrekte %0,01 ile sazanlarda %0,09 oranlarında değişmektedir (Fritsche vd., 1999).

Yumurtadaki KLA konsantrasyonları, yumurta lipitlerinin %2'sinden fazlasına kadar değişiklik gösterir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda, geviş getirmeyen hayvanlardan alınan yumurtalarda KLA içeriğinin geviş getiren hayvanlardan alınan yumurtalardakinden daha düşük olduğunu göstermiştir (Hur, Kim, Bahk ve Park, 2017). Bununla birlikte, KLA içeriği ruminant olmayan hayvanlarda diyetin KLA ile zenginleştirilmesi yoluyla önemli ölçüde arttırılabilir. Yumurta ile yapılan bir çalışmada %5,0 KLA içeren yem ile beslenen tavukların ürettiği yumurtaların 310-365 mg KLA/yumurta içerdiği belirlenmiştir. Tavuklara 1,0 g KLA/kg yem içeren bir diyetin yaklaşık 3 mg KLA/g yağ içeren yumurtalar ürettiğini göstermiştir (Jones, Ma, Robinson, Field ve Clandinin, 2000).

Ayçiçeği, zeytin, aspir, kolza tohumu, soya fasulyesi, yer fıstığı veya hindistancevizi yağı gibi yenilebilir yağlar yalnızca eser miktarda KLA içerir (<%0.01). Aynı şey margarin için de geçerlidir. Bazı araştırmalarda margarinde ihmal edilebilir miktarda KLA içerdiği bildirilmiştir (Fritsche ve Steinhart, 1998).

Süt ürünlerinde KLA konsantrasyonu hayvanların diyetine bağlı olarak değişmektedir. Hayvanın beslenmesi linoleik asit içeren ürünler ile zenginleştirildiğinde elde edilen ürünlerde KLA oranında artış gözlenmektedir. Süt ürünlerinde KLA içeriği inek sütünde %0,63, yoğunlaştırılmış sütte %1,16, Gouda peynirinde %0,40 ve Jurassic peynirinde %1,70 oranlarında olabilmektedir (Fritsche ve Steinhart, 1998). Süt ürünlerinde KLA içeriğinin geniş çeşitliliği süt yağının KLA içeriğindeki farklılıkları yansıttığı için bu değerler bir ürünün temsilcisi olarak görülmemelidir. İnek sütünde KLA konsantrasyonu normalde 2,0 ile 6,4 mg/g yağ arasında değişmekte ve laktasyon aşamasından, rumen mikrobiyotası ve diyet rejiminden etkilenmektedir (Hur vd., 2017).

Mikrobiyal fermentasyon, süt ürünlerinde biyohidrojenasyon yolundaki izomeraz ve redüktaz reaksiyonları yoluyla KLA içeriğindeki artışlara katkıda bulunabilir. Ayrıca, işlem süresince gerçekleşen sıcaklık değişiklikleri de süt rnlerinde KLA içeriğini etkileyebilir. Peynir gibi süt rnleri KLA'nın en zengin kaynaklarıdır, işleme ve depolama sırasında da gerçekleşen reaksiyonlarla KLA miktarı artabilir (Abd El-Salam vd., 2011).

İnsan diyetinde bulunan en önemli KLA kaynakları süt ve süt ürünleridir. Diyetle alınan günlük KLA alımının yaklaşık %70'ini bu ürünler sağlar, bu da 70 ila 430 mg/gün arasında değişmektedir (Cossignani ve Blasi, 2019). Peynir süt ürünleri içinde en çok KLA içeren ürünlerden biridir. Günlük beslenme diyeti göz önüne alındığında toplam alınan KLA'nın kadınlar için %30'u, erkekler içinse %33' peynirden elde edilmektedir (Chin, Liu, Albright ve Pariza, 1992).

Fermente süt rnlerinde KLA içeriğinin son derece değişken olduğu (fermente sütte 1,9 ile 18,5 mg/g yağ; yoğurtta 2,1 ile 20,8 mg/g yağ), suş tipine ve starter kültürün gelişme koşullarına göre değiştiği bilinmektedir. Fermente süt rnlerinde, KLA konsantrasyonu daha yaygın olarak 3,4 ila 8,8 mg/g yağ arasında değişmektedir (Andrade vd., 2012).

Lavillonniere vd. (1998) yaptıkları çalışmada işlenmiş peynirlerde KLA seviyelerinin doğal peynirlerdekine göre daha yüksek olduğunu bildirmiş ve artan işleme sıcaklığının ve peynir altı suyu protein konsantrasyonu ilavesinin işlenmiş peynir hazırlanması sırasında KLA konsantrasyonlarını arttırabileceğini göstermiştir.

Lin, Boyston, Chang, Leudecke ve Shultz (1995), sert peynirler için uzun olgunlaşma sürelerinin, kısa olgunlaşma srelerinden daha yüksek KLA seviyelerine neden olduğu bildirmişlerdir. 15 peynir çeşidindeki KLA'nın 3,59-7,96 mg/g peynir yağı arasında değiştiğini, ayrıca, üç edar tipi peynirin 6 aylık örneklerinde KLA'nın 3,13-3,55 mg/g yağ arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Mozzarella ve İsviçre peynirlerinin incelendiği bir çalışmada KLA içeriklerinin sırasıyla 4,9 ve 6,7 mg/g yağ olduğu bildirilmiştir (Jiang, Björck ve Fondn, 1998). Lin vd. (1995), konserve peynirin, vakumlu peynirden (sırasıyla 0,303 g/100 g yağ ve 0,270 g/100 g yağ) önemli ölçüde daha yüksek KLA içeriğine sahip olduğunu bulmuşlardır. Abd El-Salam (2011) linoleik asit açısından zengin yağ ilavesinin Ras peynirindeki toplam KLA içeriğini arttırabileceğini bildirmiştir. Çeşitli peynirlerdeki KLA'nın farklı içerikleri,

ağırlıklı olarak ineklerin beslenme şekli, teknolojik işlemede kullanılan bakteri suşları ve peynirin olgunlaşma süresi ile açıklanabilir (Hur vd., 2017).

Hayvanlar merada gezinerek beslendiğinde, süt yağındaki KLA içeriği ineklere bir yem karışımı verildiğinden çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu veriler, linoleik asit ile zenginleştirilmiş beslenmenin ruminal bakteriler tarafından fermentasyon yoluyla süt ve peynirdeki KLA içeriğini artırabildiğini göstermektedir (Domagała, Sady, Grega, Pustkowiak ve Florkiewicz, 2010). Peynir işlemenin, örneğin sıcaklık, mikrobiyal fermentasyon veya olgunlaşmayla ilgili değişikliklerin KLA üretimi üzerindeki etkisi mevcuttur. Buccioni vd. (2010) doymamış yağ asitlerinin, özellikle de çift bağların konjuge olduğu yağ asitlerinin, 100 °C'nin altındaki orta derecede ısınmaya duyarlı olabileceğini ve bu çalışma koşullarının KLA oluşumunu destekleyebileceğini bildirmiştir.

Laktik asit bakterileri, bifidobakteriler ve bazı propionibakterileri peynirde starter kültür olarak kullanılır ve linoleik asidi KLA'ya etkili bir şekilde dönüştürebilir (Cossignani ve Blasi, 2019). Dolayısıyla, KLA ile zenginleştirilmiş peynirler tipik olarak KLA ile zenginleştirilmiş süttten kaynaklanır ve başlangıç kültürleri de KLA konsantrasyonu üzerinde büyük bir etkiye sahiptir.

2.5.5. KLA'nın Sağlığa Etkileri

Obezite, kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde faydalı etkileri nedeniyle KLA'lar araştırılmıştır. KLA'nın sağlık üzerinde etkileri 1987'de antikanser fonksiyonunun ilk kez raporlanmasıyla başlamış ve 1997'de antiobezite özellikleri keşfedildiğinde genişlemiştir (Ha vd., 1989; Mcguire ve Mcguire, 1999).

Pariza ve arkadaşları Wisconsin Üniversitesi'nde et ekstraktlarının KLA içeriğinden dolayı antikanser özellik göstermesini keşfiyle KLA'nın sağlık üzerinde olumlu etkileri olabileceği gözlenmiştir (Ha vd., 1989).

KLA'nın fareler, domuzlar da dâhil olmak üzere hayvanlarda antiobezite ve hipolipemik etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. KLA'nın vücut yağı azaltma etkisinin insanlarda de gözlendiğine dikkat çekilmiş, fakat sonuçlar genellikle farklılıklar göstermiştir. (Poonam, Pophaly, Kumar, De ve Singh, 2012).

Obez ve diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada, %1,5 oranında KLA alımının (%47 *c9-t11* , %47,9 *t10-c12*) kilo alımını azalttığına ve hayvanların toplam vücut yağını azalttığına dair kanıtlara rağmen, şaşırtıcı bir şekilde bunun insanlarda da geçerli olduğunu gösteren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Fuke ve Nornberg, 2017).

Norveç'te gerçekleştirilen bir çalışmada fiziksel olarak aktif kişilerin 12 hafta boyunca 1,8 g/gün KLA karışımı ve zeytinyağı alan bir kontrol grubu arasındaki vücut ağırlığındaki değişiklikler gözlemlenmiş ve KLA tüketen grubun vücut yağında %4'lük bir azalma olduğunu bildirilmiştir (İnanç, 2006).

Obez kişilerde vücut yağının azaltılması için 3 ay boyunca 3,4 g/gün KLA (%75 saflık; *c9-t11* ve *t10-c12* 18:2, 1:1 oranında karışım) alınması gerektiği tahmin edilmektedir. 1 yıllık KLA takviyesinin (trigliserit formunda 3,4 g/gün) sağlıklı insanların vücut yağ kütlesini azalttığı bildirilmiştir (Kurban, 2006).

Yağ metabolizması ile ilgili yapılan başka bir çalışmada 0,5 g KLA/gün içeren bir diyet ile toplam HDL-kolesterol konsantrasyonları %8 artarken, LDL/HDL kolesterol oranı önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Moloney, Yeow, Mullen, Nolan ve Roche, 2004). KLA'nın yüksek yoğunluklu lipoprotein metabolizması üzerinde de olumlu etkileri olmuştur (Moloney ve ark. 2004). KLA'nın önemli izomeri *c9-t11* abdominal obez insanlar üzerinde önemli spesifik metabolik etkileri göstermiştir. İnsan gereksinimi belirlenmemiş olsa da, insanlar için KLA'nın en sık bildirilen alım önerisi 0,8 g/gün (0,6-3,0 g/gün) olarak bildirmişlerdir (Siruana ve Calsamiglia 2016).

KLA ve kanser üzerine ilk çalışma Knekt vd. (1996), süt tüketimi ile meme kanseri arasındaki ters bir ilişkinin KLA'nın etkilerinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Ip ve Scimeca (1997), KLA'nın meme tümörünün inhibe edilmesindeki etkisini, diyet linoleik asit dozundan bağımsız olarak tanımlamıştır. Bu araştırmacılar farelerin diyetine %0,5-2,0 arasında KLA ilave etmişler ve KLA'nın antikarsinojenik aktivitesini %1 KLA konsantrasyonunda maksimum bulmuşlardır.

KLA'nın *c9-t11*- ve *t10-c12*- izomerleri, kemirgen modellerinde kimyasal olarak indüklenen meme karsinogenezini önlemede, kısmen anjiyogenezini inhibe ederek eşit derecede etkili gibi görünürken, *t10-c12*-KLA izomeri p53 yanıtının ortaya çıkarılması ile MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun inhibe edilmesinde *c9-t11*-KLA'dan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Kemp, Jeffy ve Romagnolo, 2003).

KLA'nın kolon kanserine karşı koruyucu etkisi üzerine araştırmalar mevcuttur ve moleküler etki mekanizmaları tanımlanmıştır. 2004 yılında Park vd. farelerde dimetilhidrazin ile indüklenen kolon kanserinin incelenmesi sonucu, kanser insidansının azaltılmasının %1 KLA tüketimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Kim, Kim, Kim ve Park, 2016).

Lee vd., KLA'nın başlangıç ve ilerleme gibi kanserin farklı evrelerine karşı etkili olduğunu bildirmiş ve 22 günlük bir çalışmada tavşanlarda KLA'nın anti-aterojenik etkisini (0,5 g/gün'de) bulmuşlardır (Virangbhai, Goyal, Tanwar ve Sihag, 2020).

Glikoz metabolizmasında da KLA'nın olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Obez, diyabetik sıçanlarla yapılan çalışmalarda, %1,5 KLA ilaveli beslenmenin 2 hafta içinde bozulmuş glikoz toleransını normalleştirdiği ve KLA'nın etkisinin, farmasötik ajan olan troglitazonunkine benzediği bildirilmiştir. KLA'nın antidiyabetik etkisi troglitazonun etkisine benzer PPAR γ aktivasyonundan kaynaklandığı, çünkü KLA'nın PPAR γ agonisti olarak hareket ettiği bildirilmiştir (Houseknecht vd., 1998).

KLA ayrıca bağışıklık fonksiyonları üzerinde de etkiler göstermiştir. Farelerde, %1,0 KLA diyeti ile beslenen hayvanlarda dalak imünoglobulin A (IgA), IgG ve IgM düzeyleri artarken IgE önemli ölçüde azalmaktadır (Sugano, Tsujita, Yamasaki, Noguchi ve Yamada, 1998).

Watkins, Li ve Seifert (1999) kelebek beslemeli tavuklarda yüksek KLA tüketiminden kaynaklanan yüksek düzeyde kemik oluşumu bildirmişlerdir. Diyetle alınan KLA, kemik iliğinde, spesifik doku ve organlarda KLA birikmesine ve periosteumda en yüksek miktarda ve kalpte düşük miktarda KLA oluşması değişikliklere neden olmuştur. KLA'nın doku lipidinde cis-9, *trans*-11'i arttırdığı ve ayrıca kemik biyobelirteçleri ve gelişimine dâhil olduğu bildirilmiştir.

KLA, diğer antioksidanlara göre daha güçlü bir antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Butillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve alfa-tokoferolden daha etkili olduğu çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, tiyo-barbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) oluşumunu baskılamada E vitamini ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA)'dan daha güçlü olduğu bilinmektedir (Virangbhai vd., 2020). KLA, kemo-önleyici ajan gibi davranarak oksidatif stresi inhibe eder ve detoksifiye edici enzim seviyelerini azaltmaktadır. Diyete ilave edilen

%0,25 veya daha fazla KLA'nın meme kanserojenezini inhibe ettiği ve meme dokusunda TBARS oluşumunu azalttığı bilinmektedir.

KLA'nın bahsedilen sağlığa olumlu etkilerinden faydalanabilmek için tüketilmesi gereken miktarlara yönelik çeşitli araştırmalar mevcuttur. Çeşitli metotlar kullanılarak yapılan hesaplamalarda, dengeli beslenme ile günlük KLA alım tahminleri 50-1.000 mg arasında değiştiği bulunmuştur (Mcguire ve Mcguire, 1999). Bununla birlikte, diyetteki KLA alımının ABD'de 50-250 mg/gün ve Almanya'da 350-430 mg/gün olduğu tahmin edilmektedir. KLA alımındaki bildirilen farklılıklar muhtemelen bazı toplumlarda (örneğin Almanya) daha yüksek yağ tüketimi ve bazı bölgelerde bulunan gıdalardaki yüksek KLA konsantrasyonları ile ilgilidir (Mcguire ve Mcguire, 1999). Amerikan diyetindeki KLA kaynakları öncelikle süt ve sığır eti ürünleridir.

Bir yıl boyunca 6 g KLA/gün veya 2 yıla kadar 3,4 g KLA/gün tüketiminin yapılan klinik çalışmalara göre güvenli olduğu düşünülmektedir (Onakpoya, Posadzki, Watson, Davies ve Ernst, 2012). Mevcut genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Recognized As Safe-GRAS) iddiası, “porsiyon başına 1,5 g KLA seviyesinde tüketimin, KLA bakımından zengin yağ içeren süt, süt ürünleri ve meyve suları kategorilerindeki belirli gıdalar haricinde uygun olduğu yönündedir.” Dolayısıyla, KLA'nın yukarıda bahsedilen sağlık etkilerini sağlamak için bir dizi gıda ürününün bu yağ asidiyle zenginleştirilmesi mümkündür.

Süt ve süt ürünlerinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri bu ürünlerin zenginleştirilmiş formlarına da tüketici ilgisini arttırmıştır. Tüketicilerin hem geleneksel hem de yüksek KLA içeren süt ürünlerinin sağlık yararları konusunda bilgilenebilmesi ve tüm süt ürünlerinin genel imajının iyileştirilmesi, KLA ile zenginleştirilmiş ürünlerin başarılı bir şekilde pazarlanmasını sağlayacaktır. Daha önce kalsiyum veya vitamin açısından zenginleştirilmiş süt satın almış olan tüketicilerin, dengeli bir diyet yardımcı olmak için KLA açısından zenginleştirilmiş peynirle ilgilenme olasılıkları daha yüksektir (Peng vd., 2006).

Süt ürünlerinin KLA ile zenginleştirilmesi için en çok tercih edilen yöntem mikrobiyal sentezlenmedir. Sonraki bölümde probiyotik olarak bilinen mikroorganizmaların KLA üretim potansiyelleri açıklanacak ve gıdalarda kullanım olanaklarından bahsedilecektir.

2.6. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Bakterilerin Gıdalarda Kullanılması

Önemli miktarda KLA içeren gıdalar da fonksiyonel gıdalar statüsüne girmektedir (Mcguire ve Mcguire, 1999). Bir gıdanın mikrobiyal üretim ile KLA miktarının arttırılabilmesi fonksiyonel bir gıda elde edilmesine olanak sağlayacaktır. KLA'nın bakteriyel biyosentezi, yüksek izomer seçiciliği ve uygun saflaştırma işlemi nedeniyle ticari üretim için çekici bir yaklaşımdır. Birçok bakteri türünün serbest linoleik asidi (LA) KLA'ya dönüştürdüğü rapor edilmiştir. Şimdiye kadar sadece *Propionibacterium acnes* ve *Lactobacillus plantarum*'daki kesin KLA üreten mekanizmalar tamamen gösterilmiş ve KLA üretiminde kullanılan rekombinant teknolojinin gelişmesini sağlamıştır (Yang vd., 2017).

Mikrobiyal KLA sentezi ile elde edilecek KLA konsantrasyonu çok parametrelili bir prosese bağlı olduğundan zenginleştirilmiş gıdalarda kullanılması için yüksek KLA üretim potansiyeli olan mikroorganizma seçimi ve proses optimizasyonu önem arz etmektedir. Bu kısımda daha önce özellikle PAB'ların KLA üretim yeteneklerini inceleyen çalışmalardan bahsedilecektir.

İlk olarak Propionibakterilerin KLA üretimi Verhulst tarafından rapor edilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. acidipropionici* ve *P. technicum*'un c9, t11-KLA üretebildiği belirlenmiştir (Verhulst, Janssen, Parmentier ve Eyssen, 1987).

Jiang vd. (1998) MRS besi yerinde serbest linoleik asitten KLA üretme kabiliyeti açısından bazı süt starter kültürlerini analiz etmişlerdir. İki *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşu ve bir *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* suşunun serbest linoleik asidi hücre dışı KLA'ya dönüştürebildiğini belirlemişlerdir. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* Propioni-6 Wiesby en yüksek KLA üretim kapasitesine (%35,3 dönüşüm) sahipken, *P. shermanii* AKU1254, serbest LA (4 g/L) ile reaksiyon karışımından 0,11 g/L KLA üretebilmiştir. Farklı LA konsantrasyonları PAB'lar tarafından KLA üretimini etkileyebilir, çünkü gelişme suşa bağlı bir şekilde çok yüksek LA seviyelerinden etkilenebilir. Örneğin, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ATCC 6207, MRS ortamında 0,10 mg/mL LA düzeyinde yüksek oranda c9-t11-KLA (0,17 mg/mL) üretimi gösterirken 0,20 mg/mL LA veya daha yüksek

konsantrasyon uygulandığında, suşun büyümesi büyük ölçüde inhibe edildiğinden, KLA üretimi azalmıştır.

Bifidobacterium ve *Propionibacterium* suşlarının, linoleik asit izomeraz aktivitesi sayesinde KLA, konjuge α -linolenik asit (KLNA), konjuge γ -linolenik asit (KGLA) ve konjuge stearidonik asit (KSA) gibi konjuge olmayan izomerlerinden yeni konjuge yağ asitleri üretebildiği belirlenmiştir (Hennessy vd., 2011; Rainio, Vahvaselkä, Suomalainen ve Laakso, 2002).

Rainio, Vahvaselkä, Suomalainen ve Laakso (2001)'nin yaptığı başka bir çalışmada 510 mg/mL başlangıç linoleik asit seviyesinde maksimum %90 KLA verimi elde edilmiştir. Esas olarak *c9-t11* izomeri %94 oranında oluşmuştur. İzomerizasyonun bu son aşamasında 1 g hücre kütlesi 31mg KLA içerdiğinden, bu da oluşan tüm KLA'ların %46'sının hücre materyalinde olduğu anlamına geldiği belirtilmiştir.

Propionibacterium freudenreichii subsp. *shermanii* ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* suşlarının KLA üretim potansiyellerinin belirlenmesi için bir çalışma yapılmıştır. Aspir yağı, ayçiçek yağı, susam yağı, mısır yağı vb. zengin LA kaynakları oldukları için mikrobiyal KLA üretimi için substrat olarak kullanılabilir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda ayçiçek yağı ile takviye edilmiş sodyum laktat besi yeri (SLM), De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) besi yeri ve yağsız sütte her iki suşun da KLA üretebildiği belirlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tarafından 12 mg/mL ayçiçek yağı içeren MRS besi yerinde 36 saatlik inkübasyondan sonra maksimum KLA (78,8 μ g/mL) üretimi gözlenmiştir (Wang vd., 2007).

P. freudenreichii subsp. *freudenreichii* 23, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 56 veya *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 51 alt türlerinden herhangi biri LA kaynağı olarak hidrolize soya yağı içeren fermente süt ürünlerinde starter olarak kullanıldığında *c9-t11*-KLA ve *t10-c12*-KLA, izomerlerini üretebilmektedir. Ayrıca, bu Propionibakteri suşları ile geleneksel yoğurt kültürü (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*; YC-180) kombine edildiğinde sadece yoğurt kültürleriyle hazırlanan yoğurda göre daha fazla KLA üretebilmektedirler. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* 23 ve YC-180 ile maksimum 0,69 mg/g yağ *c9-t11*-KLA izomeri elde edilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 56 ve YC-180 ile maksimum 0,50 mg/g yağ içeren *t10-c12*-KLA içeriği elde edilmiştir (Gorissen, Leroy, De Vuyst, De Smet ve Raes, 2015).

Emmental peyniri üretimi için laktik asit bakterileri ve propiyonibakteriler kullanılır. Bu nedenle, bazı propiyonibakteri suşlarının serbest linoleik asitten KLA üretme potansiyeli nedeniyle, bu peynirde artan miktarlarda KLA oluşması beklenebilir (Sieber vd., 2004).

Emmental ve Mavi peynirde KLA, Propionibakteriler dahil birincil veya ikincil kültürlerin etkisi ile linoleik asitten oluşturulabilir. Yağsız süt tozu içeren ortamda, laktobasiller, laktokoklar ve streptokoklar serbest linoleik asidi %10'a kadar KLA'ya dönüştürebilirken, Propiyonibakteriler %90'a kadar dönüştürmüştür (Csapó ve Varga-Visi, 2015).

Yüksek veya düşük lipolitik *Propionibacterium* sp. suşları ile üretilen Fransız Emmental peyniri (70 gün olgunlaştırılmış) normal *Propionibacterium* suşuna sahip bir peynirde 9,54 mg/g yağ kıyasla 9,98 veya 9,87 mg/g yağ KLA içerdiği tespit edilmiştir (Gnädig, 2002).

Propiyonik asit bakterilerinin bazı suşlarının serbest linoleik asitten KLA üretme yetenekleri nedeniyle peynirlerde KLA miktarını arttırabilecekleri ve böylece KLA ile zenginleştirilmiş yeni fonksiyonel ürünlerin geliştirebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada da Mihaliç peynirinden izole edilen ve Propiyonik asit bakterisi olarak tanımlanan bakteriler taranmış ve farklı şartlarda KLA üretimleri değerlendirilmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin serbest linoleik asite alternatif olarak linoleik asitçe zengin olan çörek otu yağı ilave edilmiş besi yeri ortamında gelişimi de incelenmiştir. Daha sonra KLA üretim potansiyeli en yüksek suşlar ile linoleik asit ve çörek otu ilave edilen sütler ile Mihaliç peyniri üretimi yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METHOD

3.1. Materyaller

Propiyonik asit bakterilerinin (PAB) izolasyonu için piyasadan toplanan Mihaliç peynirleri ve tanımlanması yapılmış, özellikleri belirlenmiş PAB'lar ile üretilen peynirler bu çalışmanın materyallerini oluşturmaktadırlar.

3.1.1. Mihaliç Peynir Örnekleri

Çalışmada kullanılan Mihaliç peynirleri Çanakkale, Bursa ve Balıkesir bölgelerinde bulunan çeşitli işletme ve marketlerden 2017 yılının Aralık ayında temin edilmiştir. Soğuk zincir bozulmadan Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarına getirilmiş ve analizlere başlayana kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. Aşağıda verilen Çizelge 3.1'de PAB izolasyonu yapmak için toplanan peynirlerin üretim bilgileri gösterilmiştir. Çeşitli üreticilerden elde edilen peynir örnekleri propiyonibakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. İzolasyon çalışmaları için kullanılan Çanakkale, Bursa ve Balıkesir bölgelerinden toplanan Mihaliç peynirlerine ait üretici ve üretim tarihi bilgileri

Kod	Marka	Üretim Tarihi
K1	Kuzusan İvrindi Kelle Peyniri (Koyun)	11/07/2017
K2	Kuzusan Mihaliç Peyniri (İnek)	11/07/2017
K3	Kuzusan Koyun Mihaliç Peyniri	11/07/2017
T1	Telligözoğlu Mihaliç Peyniri (İnek)	02/11/2016
T2	Telligözoğlu Mihaliç Peyniri (%30 Koyun)	02/11/2016
OC	Oğulcan Kelle Peyniri	-
EK	Kartal Süt Ürünleri Eski Manyas Kelle Peyniri	17/06/2017
Ü1	Ümit Süt Ürünleri Mihaliç Peyniri (İnek)	05/09/2017
Ü2	Ümit Süt Ürünleri Mihaliç Peyniri (Koyun)	05/09/2017
KY	Koyuncular Yöre Mihaliç Peyniri	22/07/2017

Ö1	Özdemir Süt Ürünleri Kelle Peyniri (İnek)	07/09/2017
Ö2	Özdemir Süt Ürünleri Kelle Peyniri (Koyun)	07/09/2017
S	Sütaş Mihaliç Peyniri	08/09/2017
A	Altınöz Süt Mihaliç Peyniri	25/07/2017
G	Gediz Çiftliği Mihaliç Peyniri	19/11/2016
GS	Göysüt Süt Ürünleri Mihaliç Peyniri	15/10/2016
D	Dağlı Manyas Kelle Peyniri	18/08/2017
KZ	Kazancı Gönen Mihaliç Peyniri (İnek)	-
DK	Dönmez Kardeşler Mihaliç Peyniri	02/08/2017
ÜP	Üçyıldız Peynir Mihaliç Peyniri	25/08/2017
Kİ	Kayhan İpek Peynircilik Kelle Peyniri	22/12/2016
M	Marsüt Manyas Mihaliç Peyniri	16/08/2017
GA1	Güvenal Mihaliç Koyun Peyniri	26/09/2017
GA2	Güvenal Mihaliç İnek Peyniri	26/09/2017
ÜÇ	Ünal Çiftliği Manyas Peyniri	16/06/2017

3.1.2. Besiyerleri

Mihaliç peynirlerinden PAB'ların izolasyonu için ve daha sonra genel sayımlarını yapabilmek için Yeas Ekstrakt Sodyum Laktat (YEL) besi yeri, Skim Milk Agar, Yağsız Süt Tozu Agar (SMA) ve Man Rogosa ve Sharp (MRS) besi yeri kullanılmıştır. Besiyerlerinin pH'ı 0,01 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. YEL besi yeri içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. YEL katı ve sıvı besi yeri içeriği (Malik vd., 1968)

İçerik	Miktar
Yeast Ekstrakt	10 g/L
Sodyum Laktat	10 ml/L
Pankreatik Pepton	10 g/L
KH ₂ PO ₄	0,25 g/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,005 g/L
Agar (katı besi yeri için)	15 g/L

3.1.3. Kimyasallar

Araştırma kapsamında yapılan analizler için agar (Sigma Aldrich, İspanya), HCl (Merck, Almanya), NaOH (Merck, Almanya), sodyum laktat (Merck, Almanya), yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye), H₂O₂ (Tekkim, Türkiye), asetonitril (Merck, Almanya), formik asit (Merck, Almanya), linoleik asit (Sigma-Supelco, USA), tween 80 (Sigma Aldrich, İspanya), teknik hekzan (Tek Kimya, Türkiye), kromatografik hekzan (Merck, Almanya), isoproponal (Lach-Ner, Çek Cumhuriyeti), plate count agar (Merck; Almanya), MRS agar (Merck, Almanya), fenolftalein indikatör (Norateks Kimya, Türkiye), sülfürik asit (Iso Lab Chemicals, Almanya), amil alkol (Merck, Almanya), potasyum kromat (Horasan Kimya, Türkiye), gümüş nitrat (Tekkim, Türkiye), kloroform (Merck, Almanya), metanol (Merck, Almanya), sodyum sülfat (Surechem Products Ltd., İngiltere), sodyum metoksi (Sigma Aldrich, İspanya), BF₃ (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. Propiyonibakterilerin İzolasyonu

Peynir örneklerinden 25 g tartılıp, 225 mL steril serum fizyolojik (%0,8 NaCl)'de homojenize edilerek 3 çizgi yöntemiyle YEL katı besi yeri içeren plaklara ekimleri yapılmıştır. Petriler anaerobik jarda Anaerocult A kit (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılarak ya da %5 CO₂'li ortamda 30°C'de 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonra YEL besi ortamının üzerindeki kırmızı, krem, sarı, turuncu ve kahve renkli koloniler seçilerek Gram boyamaları ve katalaz testi gerçekleştirilmiştir. Seçilen kolonilerden YEL

sıvı ve katı besi yeri içeren tüplere ve plaklara ekimleri gerçekleştirilmiştir. Sıvı ortamdaki kültürler 48-72 saat %5 CO₂'li ortamda anaerobik inkübatörde (PANASONIC) 30°C'de, plakta bulunan kültürler anaerobik jarda 7-10 gün %5 CO₂'li ortamda 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültürlerin morfolojileri mikroskopta incelenerek Gram pozitif ve X, V, Y şeklinde morfolojiye sahip olanlar muhtemel Propionibakteriler olarak değerlendirilmiştir. YEL sıvı besi yerinde geliştirilen izolatların tanımlamalarının yapılmasında ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stokları hazırlanmıştır. Stok kültürler %30 gliserol içeren YEL besi yerinde -80 °C'de saklanmıştır. Çalışmaların tümü paralelli olarak yapılmıştır (Stackebrandt vd., 2006).

Katalaz Testi

Katalaz enzimi ortamdaki hidrojen peroksidi su ve oksijene ayrıştırır. YEL katı besi yerinde çizgi ekim ile geliştirilen izolatlar inkübasyondan sonra seçilen tipik bir koloni lam üzerine alınarak üzerine katalaz test solüsyonundan (Hidrojen peroksit) 1 damla damlatılmıştır. Sıvı ve koloni öze ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Test sonuçları örneklerde gaz oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Gaz oluşumu gösterenler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Pigmentasyon

PAB'ların aktif kültürlerinden YEL katı besi yeri üzerinde çizgi ekimleri yapılarak, pigment oluşumu için 30°C'de 10 gün %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin kırmızı, krem, turuncu ve kahverengi pigment oluşturmaları değerlendirilmiştir (Yuksekdag, Onal Darilmaz ve Beyatli, 2013).

Morfolojik olarak farklılık gösteren her bir koloni seçilerek taze besi yerine tek koloni ekim yapılmıştır. Ertesi gün koloni saflığı kontrol edilmiş, saf kültür olduğundan emin oluncaya dek yeniden ekim yapılmıştır. Her bir bakteri izolatu iki petride çoğaltılmıştır.

3.2.2. Propiyonibakterilerin MALDI-TOF-MS ile Tanımlanması

İzolatların tanımlanması Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi yöntemiyle yapılmıştır. Tek koloni haline getirilen örnek izolattan bir öze dolusu alınıp 1 mL distile su ile suspense edilip 6000g'de 5 dakika

santrifüj edilmiştir. Daha sonra pellet 50 µL asetonitril/formik asit/su (50:35:15, v/v) karışımı ile 1 dakika boyunca karıştırılarak ekstrakte edilmiştir. Elde edilen supernatant örnek tablosuna (Micro scout 96 target plate) aktarılarak oda şartlarında kurutulmuştur. Matris çözeltisi, α -cyano-4-hydroxycinnamic asit (CHCA) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında kurutulup cihaza yüklenmiştir (Vorob'eva vd., 2011).

MALDI-TOF-MS analizi için Bruker Daltonics (Bremen, Almanya) markalı Düzen Laboratuvarlarında (İstanbul) bulunan cihaz kullanılmıştır. İzolasyonda elde edilen toplam 95 adet izolat paralelli olarak cihazda analize alınmıştır.

Üreticiden temin edilen standart *E. coli* DH5a ekstraktı ile (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) kütle spektrometresi kalibre edilmiştir. Doğrusal moddaki iyon kütle spektrumları Microflex LT kütle spektrometresi ile elde edilmiştir. Kaydedilen kütle aralığı pozitif iyon modunda 3,6-17 kDa aralığındadır. Örneklere ait spektrumlar MALDI Biotyper içinde bulunan Referans Kitaplığı sürüm 4.0.0.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile eşleştirilmiş ve entegre yazılım ile sonuç listesi oluşturulmuştur.

Microflex LT sisteminden elde edilen sonuçlar skor değerleri olarak verilmiştir. Puan değerleri >2,0 (yeşil renk) ve 1,7 ile 2 (sarı renk) sırasıyla tür ve cins düzeyinde tanımlama güvenilir olarak kabul edilmiştir. Verilen puan <1,7 olduğunda, parmak izi veri tabanındaki herhangi bir referans türüyle yeterince eşleşmiyor ve "güvenilir tanımlama" yapılamamıştır.

3.2.3. Propiyonibakteri Sayımı

PAB'ların sayımının yapılması için serum fizyolojik sıvısı ile gerekli dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra bu dilüsyonlardan YEL agara ekim yapılarak 30°C'de 7 gün boyunca %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bakteri sayıları koloni oluşturan birim/mL (kob/mL) olarak hesaplanmıştır (Stackebrandt vd., 2006).

3.2.4. Propiyonibakterilerin Farklı Linoleik Asit Konsantrasyonlarına Duyarlılığının Belirlenmesi

MALDI-TOF-MS ile yapılan tanımlama sonrası *Propionibacterium* olarak tanımlanan bakterilerin linoleik aside karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Bu amaçla stok linoleik asit çözeltisi hazırlanmıştır. 5g linoleik asit (Sigma-Aldrich L1376-5G), 1 mL

Tween 80 (Merck) 100 mL'ye distile su ile tamamlanarak 50 mg/mL konsantrasyonda stok linoleik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltisi 0,45 µm steril filtreden (Sigma-Aldrich) geçirilerek amber şişede -20 °C de saklanmıştır (Jiang vd., 1998).

İzolatların serbest linoleik aside duyarlılığını test etmek için 25, 50, 100 µg/mL LA içeren sıvı YEL besi yerine ekimi yapılarak tarama yapılmıştır. En az iki kez art arda sıvı besi yerinde aktiveleştirilmiş kültürden %1 oranında inokulasyon yapılmıştır. 72 saat 30 °C'de %5 CO₂'li ortamda geliştirilen izolatların duyarlılıkları besi yerlerindeki gelişim durumlarına göre değerlendirilmiştir.

3.2.5. Propiyonibakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransının Belirlenmesi

İzole edilen propiyonibakteriler 30 °C'de iki kez art arda YEL sıvı besi ortamında aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürlerin yoğunlukları 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanıp izolatlarından %1 oranında, pH'sı 2M HCl ile 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 ve 7,0 (kontrol)'a ayarlanan YEL sıvı besi yerlerine inoküle edilerek 30 °C'de anaerobik koşullarda 72 saat inkübe edilmiştir (Rehberger ve Glatz, 1998).

3.2.6. Propiyonibakterilerin Farklı Tuz Konsantrasyonlarına Toleransının Belirlenmesi

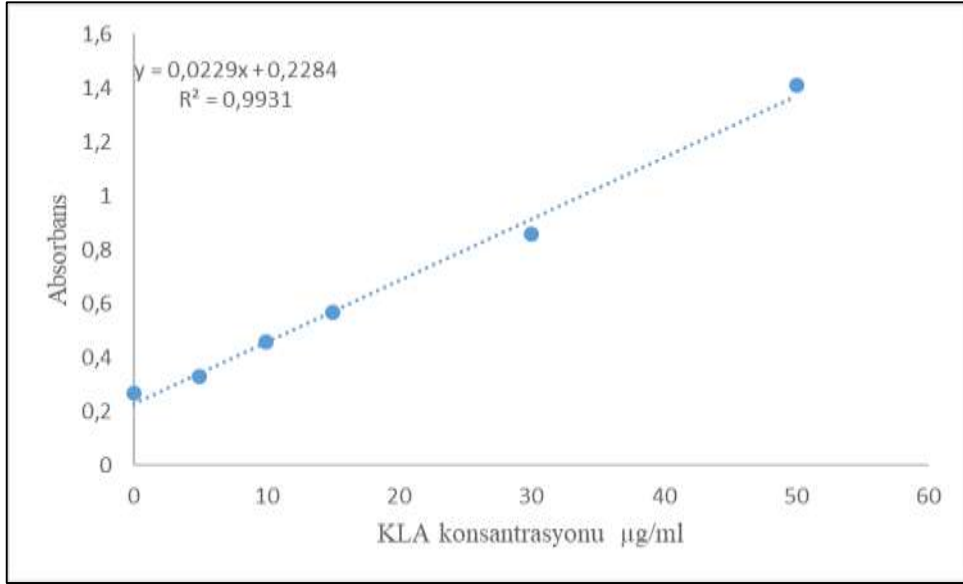
İzole edilen Propiyonibakteriler 30 °C'de iki kez art arda YEL sıvı besi ortamında aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürlerin yoğunlukları 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanan propionibakterileri izolatlarından %1 oranında, tuz konsantrasyonu %0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10,0'a ayarlı YEL sıvı besi yerlerine inoküle edilerek 30 °C'de %5 CO₂'li ortamda anaerobik koşullarda 72 saat inkübe edilmiştir (Marshall ve Odame-Darkwah, 1995). Farklı konsantrasyonlara karşı direnç toplam PAB sayımı yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. Propiyonibakterilerin KLA Üretim Kapasitelerinin Taranması

Sıvı besi yerinde geliştirilen PAB'ların farklı serbest linoleik asit konsantrasyonlarında KLA üretim kapasitelerinin belirlenmesi için spektrofotometrik bir metot kullanılmıştır. PAB olarak tanımlanan izolatların 50, 40, 25, 10 µg/mL LA içeren YEL besi yerinde 30 °C'de %5 CO₂'li ortamda 72 saat inkübasyon sonucu KLA üretim miktarları belirlenmiştir.

İnkübasyon sonrası kültürden 1 mL alınarak 10,000xg'de 1 dakika sentrífújenip supernatant ayrılmıştır. 2 mL isoproponal supernatantla vorteksenerek (Isolab, Germany) karıştırılmıştır. Daha sonra 3 dakika bekletilmiş ve üzerine 1,5 mL hekzan ilave edilmiştir. Tekrar vorteksenerek hekzan fazının ayrılması beklenmiştir. Ayrılan faz UV-spektrometre (Schimadzu, Japon) ile 233 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Barrett, Ross, Fitzgerald ve Stanton, 2007).

KLA konsantrasyonunu belirlemek için bir standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.1.). KLA izomerlerinden oluşan standart çözelti (O5632, Sigma-Aldrich, SUPELCO, USA) 5, 10, 15, 30 ve 50 µg/mL olarak hazırlanmış ve UV-spektrometrede 233 nm dalga boyunda ölçümleri yapılarak eğri çizilmiştir.



Şekil 3.1. KLA konsantrasyonunu belirlemek için 233 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerle hazırlanan standart eğrisi

İzolatların KLA üretim verimlerini hesaplayabilmek için linoleik asit ilave edilmeyen besi yerinde üretilen KLA miktarı, LA ilave edilen besi yerinde üretilen miktardan çıkarılmış ve besi yerine ilave edilen LA miktarına bölünmüştür.

$$\% \text{ Verimlilik} = \left(\frac{\text{LA içeren besi yerinde üretilen KLA} - \text{LA içermeyen besi yerinde üretilen KLA}}{\text{İlave edilen LA miktarı}} \right) \times 100$$

3.2.8. Çörek Otu Yağı İlave Edilmiş Ortamda PAB'lerin Gelişimi ve KLA Üretimi

KLA üretim potansiyeli yüksek olduğu belirlenen izolatların alternatif linoleik asit kaynağı olarak düşünülen çörek otu yağı içeren besi yerindeki KLA üretim miktarları değerlendirilmiştir. Wang vd. (2007)'nin bildirdiği şekilde çörek otu yağı besi yeri ortamına misel bir çözelti halinde ilave edilmiştir. 500 mg soğuk pres çörek otu yağı 50 µL Tween 80 ile karıştırılarak 50 ml'ye saf su ile tamamlanarak 10 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanmış ve amber şişeye konularak buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Çizelge 3.3'te bu çalışmada kullanılan çörek otu yağının yağ asitleri kompozisyonu verilmiştir. Çörek otu yağının yağ asidi kompozisyonunun bölüm 3.5.8.'de açıklandığı gibi belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Soğuk pres Çörek otu yağının % yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asidi	%
Palmitik Asit (C:16)	11,62
Stearik Asit (C:18)	3,00
Oleik Asit (C:18:1)	23,62
Linoleik Asit (C18:2)	59,26
Eikosadienoik Asit (C:20:2)	2,50

Çörek otu yağından KLA üretim miktarını belirleyebilmek için izolatlar linoleik asit konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde çörek otu yağı misel çözeltisi ilave edilmiş besi yerinde 30 °C'de %5 CO₂'li ortamda 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu bakteri sayımları Bölüm 3.2.3' te belirtildiği gibi ve KLA üretim oranları Bölüm 3.2.7'de açıklandığı gibi belirlenmiştir.

3.3. Mihaliç Peynir Analizleri

3.3.1. Mihaliç Peynir Üretimi

KLA kapasitesi belirlenen *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (GS4) ve *P. thoenii* (ÜP1) peynire ilave edilecek kültür olarak seçilmiştir. Ayrıca peynir üretiminde kullanılan süte saf linoleik asit ilavesine alternatif olarak linoleik asit içeriği bakımından zengin olan çörek otu yağı kullanılmıştır. Linoleik asit konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde ilave yapılmıştır.

Araştırma kapsamında Mihaliç peynirleri Balıkesir ilinin Savaştepe ilçesinde bulunan Altınöz Süt Ürünleri üretim tesislerinde üretilmiştir. Mihaliç peynirlerinin yapımında kültür ilaveleri ve linoleik asit ilaveleri Çizelge 3.4.'te verilmiştir. Çizelge 3.4.'te görüldüğü gibi iki farklı propiyonik asit bakterisi tek başına ve beraber kullanılmıştır. Süte ise iki farklı şekilde linoleik asit ilave edilmiştir. Kontrol olarak kültür ve linoleik asit ilave edilmeyen peynir üretimi de yapılmıştır. Deneme iki tekerrürlü gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşma periyodunun 3, 14, 30, 60 ve 90. günlerinde peynirlerin analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Mihaliç peyniri üretiminde kullanılan deneme planı

Kod	Yağ Asidi kaynağı	Kültür türü
LF	Linoleik Asit	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (GS4)
LT	Linoleik Asit	<i>P. thoenii</i> (ÜP1)
LFT	Linoleik Asit	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (GS4) + <i>P. thoenii</i> (ÜP1)
LK	Linoleik Asit	kültür ilavesi yok
ÇF	Çörek Otu Yağı	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (GS4)
ÇT	Çörek Otu Yağı	<i>P. thoenii</i> (ÜP1)
ÇFT	Çörek Otu Yağı	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (GS4) + <i>P. thoenii</i> (ÜP1)

ÇK	Çörek Otu Yağı	kültür ilavesi yok
KF	Yağ ilavesi yok	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (GS4)
KT	Yağ ilavesi yok	<i>P. thoenii</i> (ÜP1)
KFT	Yağ ilavesi yok	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (GS4) + <i>P. thoenii</i> (ÜP1)
KK	Yağ ilavesi yok	kültür ilavesi yok

Peynir üretimi için alınan çiğ süt 32 °C'ye kadar ısıtılmış herhangi bir pastörizasyon işlemi yapılmamıştır. Isıtılan süte %1 oranında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (GS4) ve *P. thoenii* (ÜP1) tek tek ve beraber eklenmiştir. Bir süre beklendikten sonra süte 8 mL/20 L oranında peynir mayası ilave edilmiştir. Yaklaşık 1 saat ile 90 dk arası süren pıhtılaşmadan sonra, ucu "+" şeklinde olan sopalarla pıhtı kırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem yaklaşık 10 dk sürmektedir. Daha sonra pıhtı sıcaklığı 42 °C ye gelene kadar sıcak su ilave edilmiştir. Bu işleme haşlama denmekte ve istenen sıcaklığa ulaşana kadar karıştırma işlemine devam edilmektedir. Bu işlemden sonra peynir altı suyunun ayrılması beklenmiş ve dibe çöken pıhtı Şekil 3.2.de gösterildiği gibi temiz bir tülbente alınarak süzülme işlemi için askıya takılmıştır.



Şekil 3.2. Haşlama sonrası ayrılan telemenin süzülme işlemi için tülbente alınması

Teleme suyunun süzülmesi süresince şişleme işlemi yapılmıştır. Şekil 3.3'te görüldüğü gibi teleme şişlenerek suyunun daha çabuk çıkması ve soğuması sağlanmaktadır. Şişleme işleminden sonra askıdan alınan telemeler üzerine ağırlık koymak kaydıyla baskıya alınmıştır. Baskılama işlemi en az 6-8 saat sürmüş ve “kelle” adı verilen peynir blokları elde edilmiştir.

Kelle blokları baskıdan çıktıktan sonra Şekil 3.4'te gösterildiği gibi %12 salamura içeren tanklarda 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra %18 salamura içeren tanklara aktarılarak soğuk hava depolarına ($6\pm 2^{\circ}\text{C}$) alınmıştır. 3 gün sonra peynirler her peynir örneği için 1,2 kg olacak şekilde paketlenmiş ve soğuk zincir bozulmadan laboratuvara getirilmiştir. Peynirler laboratuvarda $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ de buzdolabında saklanmıştır



Şekil 3.3. Süzölmek için askıya alınan telemelerin şişlenme işlemi



Şekil 3.4. Kellelerin salamura tankında bekletilmesi

3.3.2. Peynir Örneklerinin Analizler için Hazırlanması

Peynir örneklerine uygulanacak fizikokimyasal, tekstürel ve mikrobiyolojik analizler için örnekler laboratuvar ortamında 4 ± 2 °C de buzdolabında tutulmuştur. Olgunlaşma süresince örnekler 3, 14, 30, 60 ve 90. gün sonunda analiz edilmiştir. Peynirlerden ilk önce mikrobiyolojik analizler için aseptik şartlarda numune alınmış, daha sonra fizikokimyasal ve tekstür analizleri için en az 100 g olacak şekilde temiz bir bıçakla kesilerek numune poşetine alınmıştır.

3.4. Mikrobiyolojik Analizler

3.4.1. Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı

Peynir örneklerinde 3, 14, 30, 60 ve 90. gün sonunda toplam mezofilik ve aerobik bakteri (TMAB) sayımını belirlemek için aseptik şartlarda alınan numuneden gerekli dilüsyonları hazırlanarak Plate Count Agara ekimleri yapılmıştır. 32°C de 48 saat inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılmış ve toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı hesaplanmıştır. Bütün ekimler paralelli yapılmıştır (Clark, Brazis, Fowler, Johns ve Nelson, 1978).

3.4.2. Toplam Propiyonik Asit Bakteri Sayımı

Peynir örneklerinde 3, 14, 30, 60 ve 90. gün sonunda toplam propiyonik asit bakteri sayımını belirlemek için aseptik şartlarda alınan numuneden gerekli dilüsyonlar hazırlanarak YEL agara uygun dilüsyonlardan 0,1 mL ilave edilmiş ve yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Anaerobik ortamda 30 °C de 5-7 gün inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılmış ve toplam propiyonik asit bakteri sayısı hesaplanmıştır. Bütün ekimler paralelli yapılmıştır (Stackebrandt vd., 2006).

3.4.3. Toplam Laktik Asit Bakteri Sayımı

Peynir örneklerinde 3, 14, 30, 60 ve 90. gün sonunda toplam laktik asit bakteri sayımını belirlemek için aseptik şartlarda alınan numuneden gerekli dilüsyonları hazırlanmıştır. MRS agarda (Merck) gelişen LAB sayımı için, pH'sı 5,7'ye ayarlanmış steril edilmiş MRS agar kullanılarak uygun dilüsyonlardan 1 mL dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Anaerobik ortamda 30 °C de 48 saat inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılmış

ve toplam laktik asit bakteri sayısı hesaplanmıştır. Bütün ekimler paralelli yapılmıştır (Halkman ve Ayhan, 2000).

3.5. Fizikokimyasal Analizler

3.5.1. Titrasyon Asitliği

Peynir örneklerinden 10'ar gr tartılarak üzerine 10 mL saf su ilave edilmiş havanda ezilerek homojen hale getirilmiştir. Karışım filtre kâğıdından geçirilmiş ve elde edilen süzüntü 500 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen süzüntüden 25 mL bir erlene alınarak üzerine birkaç damla fenolfitaleyn damlatılmıştır. Çözelti 0,1 N NaOH ile hafif pembe renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Peynir örneğinin titrasyon asitlik derecesi %laktik asit (CH₃CHOH-COOH) cinsinden aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (AOAC, 1990a).

$$\%Laktik\ Asit = (V \times 0,009 \times F \times 100)/m$$

V = Titrasyonda harcanan 0,1 N NaOH hacmi (mL)

F = NaOH Faktörü

m= Titrasyonda kullanılan peynir örneği ağırlığı (g)

3.5.2. pH Değeri

Peynir örneklerinde pH ölçümü için 10 g peyniri 20 mL saf su içerisinde iyice homojenize edilmiş ve pH-metre (Hannah, HI2002-02 edge, Michigan, ABD) kullanılarak ölçüm yapılmıştır (AOAC, 1990b).

3.5.3. Kuru Madde Oranı

Kuru madde tayini Gravimetrik yönteme göre yapılmıştır. Rendeden geçirilerek homojen hale getirilen peyniri örneklerinde kuru madde miktarı yaklaşık 5,00 g peynir örneğinin 102±1°C'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulması ile hesaplanmıştır (AOAC, 1990b). Kuru madde oranları % olarak hesaplanmıştır.

3.5.4. Yağ Oranı

Peynir örneklerinde %yağ miktarının belirlenmesi amacıyla Gerber metodundan yararlanılmıştır. Yağ miktarı, Van Gulik bütrometreleri kullanılarak belirlenmiştir.

Rendelenen ve havanda iyice ezilerek homojen haline getirilen peynir numuneleri bütrometrenin beherciğine 3 g tartılmıştır. Üzerine yoğunluğu 1,522±0,005 g/mL olan sülfürik asitten 10 mL ilave edilerek ağzı kapatılmıştır. Daha sonra bütrometreler 65-70°C'lik su banyosuna konularak peynirin erimesi sağlanmıştır. Peynir tamamen eridikten sonra üzerine 1 mL amil alkol ilave edilmiştir. Gerber santrifüjünde 10 dakika santrifüj edilip, bütrometreden doğrudan okuma yapılmıştır (AOAC, 2000a).

3.5.5. Protein Oranı

Protein analizi Gerhardt (Vapodest VAP 20s) cihazı kullanılarak Kjeldahl yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yaş yakma yöntemine tabi tutulan peynir örneklerinin bulunan azot miktarının 6,38 faktörü ile çarpılması sonucu protein oranları hesaplanmış ve sonuçlar % olarak ifade edilmiştir (AOAC, 2002).

$$\%Azot=(V_1-V_0) \times N \times 1,4008/m$$

$$\%Protein=\%Azot \times 6,38$$

V_1 = Titrasyonda harcanan HCl hacmi (mL)

V_0 = Kör deneme sonucu titrasyonda harcanan HCl hacmi (mL)

N = Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0,1 N)

m = Alınan örnek miktarı (g)

3.5.6. Kül Miktarı

Peynir örneklerinde kül oranları, örneklerin kül fırınında 550°C'de yakılması ile gravimetrik (%) olarak belirlenmiştir. Kül fırınında 550°C'de sabit ağırlığa gelmesi için 30 dakika tutulan ve desikatörde soğutulan krozelere 1 g peynir örneği tartılmış ve krozeler kül fırınına yerleştirilerek ön yakma işlemi yapılmıştır. Sıcaklık kademeli olarak artırılarak 550°C'ye çıkartılmıştır. Yakma işlemi, krozeler içerisindeki örnek tamamen beyaz kül rengine dönüşüncüye kadar devam edilmiştir (AOAC, 1990b).

$$\text{Kül Oranı (\%)} = [(M_2 - M_0)/(M_1 - M_0)] \times 100$$

M_0 = Krozenin sabit darası (g)

M_1 = Peynir ilave edildikten sonraki ağırlık (g)

M_2 = Yakma işleminden sonraki ağırlık (g)

3.5.7. Tuz Oranı

Peynirde tuz tayini Mohr metoduna göre yapılmıştır. 10 gr peynir örneği saf suyla havanda ezilerek homojen hale getirilmiştir. Daha sonra filtre kâğıdından süzülerek 500 mL ye tamamlanmıştır. Elde edilen süzüntüden 25 mL alınarak üzerine %0,5'lik potasyum kromat (K_2CrO_4) eklenmiş ve 0,1 N gümüş nitrat ($AgNO_3$) ile kalıcı kiremit kırmızısı renk görülünceye kadar titre edilmiştir. Peynirdeki %tuz miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Marshall, 1992).

$$\%Tuz = [(V-V_0) \times F \times 0,585] / m$$

V = Titrasyonda harcanan 0,1 N $AgNO_3$ hacmi (mL)

V_0 = Sabit için sarf edilen $AgNO_3$ hacmi (mL)

m = Örnek miktarı (g)

F = $AgNO_3$ 'ün faktörü

3.5.8. Yağ Asidi Kompozisyonu Tayini

Peynir örneklerinden yağ asitleri analizi gerçekleştirmek için raf ömrü boyunca ilk önce yağ ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen yağ örnekleri metil ester formuna getirilerek GC-FID cihazı ile kompozisyon analizine tabi tutulmuştur. Yağ asitleri 37 FAME standart çözeltisinin (Nu-Check-Prep, Inc., Elysian, MN, USA; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) alıkonma zamanları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

3.5.8.1. Peynirden Yağ Ekstraksiyonu

Peynir örneklerinden yağ ekstraksiyonu Folch metodundan uyarlanarak yapılmıştır (Folch, Lees ve Sloan Stanley, 1956). Rendelenen peynir örneklerinden 1 g alınarak üzerine 15 mL kloroform: metanol (2:1, v/v) karışımından ilave edilmiştir. Bu karışım 3 dakika boyunca vortekslenerek homojenize edilmiştir. Homojen karışım filtre kâğıdından süzülerek elde edilen filtrat daha sonra 10 dakika boyunca 5000 rpm'de 4°C'de santrifüjlenmiştir. Beş dakika beklendikten sonra 5 dakika 1000 rpm'de tekrar

santrifüjlenerek faz ayrılması sağlanmıştır. Kloroform fazı susuz Sodyum sülfatla (Na_2SO_4) dehidre edilerek esterleşme reaksiyonu için $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.5.8.2. Yağ Asitlerinin Metil Ester Formlarına Esterleştirilmesi

Ekstrakte edilen yağ örnekleri kromatografik analiz için asit-baz metilasyon yöntemiyle esterleştirilmiştir (Özer, Kılıç ve Kılıç, 2016). Örnekten $100\ \mu\text{L}$ alınarak üzerine $2\ \text{mL}$ sodyum metoksi ilave edilmiştir. Vorteksle 2 dakika karıştırılan örnek $50\text{ }^\circ\text{C}$ 'de sıcak su banyosuna konularak $10\ \text{dk}$ beklenmiştir. Daha sonra örneğe $1\ \text{mL}$ %14'lük boron triflorit ilave edilmiş, tekrar $2\ \text{dk}$ boyunca vortekslenildikten sonra $50\text{ }^\circ\text{C}$ de $10\ \text{dk}$ su banyosunda bekletilmiştir. Örneğe daha sonra $5\ \text{mL}$ saf su ilave edilmiş vortekslenmiş ve $5\ \text{mL}$ hegzan ilave edilip tekrar vortekslenmiştir. Bu işlem sonrası tüpte faz ayrımı gözlenmektedir. Oluşan üst faz amber renkli vialle $0,45\ \mu\text{m}$ şırınga filtreden geçirilerek aktarılmış ve analize kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.5.8.3. GC-FID Kromatografik Analiz

Yağ asitlerinin uçucu türevlerinin analizi, Gaz Kromatografisi (GC) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz için Gaz kromatografisi cihazı Alev İyonizasyon Detektörü (FID) ile birlikte kullanılmıştır (SHIMADZU 2010, Japonya). Yağ asitlerinin analizinde, TR-CN 100 ($0,25\text{mm}\times 100\text{m}\times 0,2\text{mm}$) kapiler kolon kullanılmıştır. Giriş sıcaklığı $250\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanılmış, akış hızı (He) $30\ \text{mL/dk}$ olarak belirlenmiştir. Fırın sıcaklık programı $100\text{ }^\circ\text{C}$ 'den başlayarak $240\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye $3\text{ }^\circ\text{C/dk}$ hızla çıkarılmış, $10\ \text{dk}$ $240\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletilmek üzere toplam $60\ \text{dk}$ olarak uygulanmıştır (AOAC, 2000b).

3.5.9. KLA Kompozisyonu Analizi

Metil esterlerine dönüştürülen konjuge yağ asitlerinin belirlenmesinde, TR-CN 100 ($0,25\ \text{mm} \times 100\ \text{m} \times 0,2\ \text{mm}$) kapiler kolon kullanılarak, FID (Flame Ionization Detector, alev iyonlaştırıcı dedektör) detektörlü, otomatik enjektörlü gaz kromatografisi (model GC-FID- 2010 plus, Shimadzu, Japan) ile gerçekleştirilmiştir. $100:1$ split modu seçilmiştir. Sıcaklık profili $130\text{ }^\circ\text{C}$ 'den başlayarak dakikada $2\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik artışla $225\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış, kolon sıcaklığı $225\text{ }^\circ\text{C}$ 'de $20\ \text{dk}$ sabit tutulmuştur (Varga-Visi, Salamon, Lóki ve Csapó, 2012). Taşıyıcı gaz olarak Helyum, yanıcı gaz olarak Hidrojen ve kuru hava kullanılmıştır.

Konjuge linoleik yağ asitlerinin tanımlanmasında Konjuge linoleik yağ asiti (%42 *c9-t11*, %44 *t10-c12*, %10 *c11-t13* ve %5 *cc, tt* octadekadienoik asit) metil esterleri geometrik izomerleri içeren standart (katalog numarası O5632 SigmaAldrich, St Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

3.5.10. Renk Tayini

Peynirlerin renk değerleri Minolta CR-400 renk cihazı (Minolta Corp, Ramsey, NJ, ABD) kullanılarak $L^*a^*b^*$ renk değerleri tespit edilmiştir. $L^*a^*b^*$ renk koordinat sisteminde L^* değeri renk parlaklığını göstermekte olup değeri 0 ile 100 arasında değişmektedir. Renk koordinatları olan a^* ve b^* değerleri ise belirli bir ölçüm aralığına sahip olmayıp, a^* değeri pozitif olduğunda kırmızı, negatif olduğunda yeşil rengi ifade ederken, b^* değeri pozitif olduğunda sarı, negatif olduğunda ise mavi rengi göstermektedir (Martley ve Michel, 2001)

3.6. Tekstür Analizi

Peynir örneklerinin tekstür özellikleri tekstür analiz cihazı (TA. HD. PLUS, Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, İngiltere) ve cihazın P/5 (5 mm DIA CYLINDER STAINLESS) probu kullanılarak belirlenmiştir. TPA; örneği birinci sıkıştırma ile deformasyona uğratarak, sıkıştırmanın kaldırılmasından sonra ikinci bir sıkıştırma deformasyonu ile insanın çiğneme hareketini taklit etmektedir. TPA parametrelerinin hesaplanması cihazın yazılımı doğrultusunda yapılmıştır. Olgunlaşma sonunda yapılan tekstür analizinde sertlik, dış yapışkanlık, elastikiyet, iç yapışkanlık, sakızimsılık, çiğnenebilirlik ve esneme özellikleri değerlendirilmiştir (Çayır, 2018).

Analiz parametreleri:

Prop kalınlığı: 36 mm

Penetrasyon: 0,7 mm (%70 kompresyon)

Yük (Load cell): 50 kg

Örnek kalınlığı: 1 cm

Test öncesi-sonrası probe hızı: 2 mm/sn

Test sırasında probe hızı: 5 mm/sn

Peynirlerin tekstür profil analizinde kullanılan parametreler aşağıda açıklandığı gibi hesaplanmıştır.

- Sertlik: İlk baskı sonucu ürünün gösterdiği maksimum kuvvet
- Dış Yapışkanlık: Ürünün proba ne kadar yapıştığını gösteren kuvvet
- Elastikiyet: İlk baskıdan sonra ürünün kendi haline geçmesi için gösterdiği etki
- İç Yapışkanlık: İlk baskıda gösterdiği direncin ikinci geri çekilişle olan ilişkisi
- Sakızimsılık: Yarı katı gıdalarda kullanılan yapışkanlık terimi (Sertlik \times Yapışkanlık)
- Çiğnenebilirlik: Sadece sert gıdalarda kullanılan ve ürünün çiğnenmeye karşı gösterdiği direnç (Sakızimsılık \times Elastikiyet)
- Esneme: Ürünün orijinal hale gelmek için gösterdiği etki

3.7. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamında yapılan bütün analizlerin sonuçları ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Araştırmada elde edilen veriler JMP 5.0.1.a paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Verilere 2 yönlü ANOVA ile varyans analizi uygulanmış ve farklılıkların karşılaştırılmasında Tukey karşılaştırma testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerde α değeri, 0,05 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Propiyonik Asit Bakterilerinin Mihaliç Peynirlerinden İzolasyonu

25 adet geleneksel yöntemler ile üretilmiş bölüm 3.1.1.'de bilgileri verilen Mihaliç peyniri örneklerinden 95 adet izolat elde edilmiştir. İzolatların Gram boyama, katalaz testi, morfolojik özellikleri ve pigmentasyon sonuçları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Mihaliç peynirinden izole edilen bakterilerin gram boyama, katalaz testi, morfolojik özellikleri ve pigmentasyon sonuçları

İzolat No	Gram Boyama	Katalaz	Morfoloji	Pigmentasyon
K11	pozitif	pozitif	çubuk	beyaz-bej koloni
K12	pozitif	pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
K13	pozitif	pozitif	çubuk	krem-sarı koloni
K21	pozitif	zayıf pozitif	çubuk	krem-sarı koloni
K22	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
K23	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem koloni
K24	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	bej koloni
K31	pozitif	pozitif	kısa çubuk	sarı koloni
K32	pozitif	pozitif	kısa çubuk	krem-opak koloni
K33	pozitif	pozitif	çubuk	krem-sarı koloni
T11	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	opak bej koloni
T12	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
T13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-opak koloni
T14	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
T21	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
T22	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	bej koloni
T23	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni

Çizelge 4.1. (devam ediyor)

T24	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
OC1	pozitif	pozitif	kısa çubuk	krem-sarı koloni
OC2	pozitif	zayıf pozitif	kısa çubuk	krem-sarı koloni
OC3	pozitif	pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
OC4	pozitif	zayıf pozitif	çubuk	beyaz-bej koloni
EK1	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
EK2	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
EK3	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
EK4	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	krem koloni
EK5	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
Ü11	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz koloni
Ü12	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
Ü13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	sarı koloni
Ü14	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	bej koloni
Ü21	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
Ü22	pozitif	pozitif	kısa çubuk	kahverengi koloni
Ü23	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
Ü24	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	kahverengi koloni
KY1	pozitif	pozitif	çubuk	opak bej koloni
KY2	pozitif	pozitif	çubuk	beyaz-bej koloni
KY3	pozitif	pozitif	çubuk	krem koloni
KY4	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	sarı koloni
Ö11	pozitif	pozitif	çubuk	bej koloni
Ö12	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
Ö13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni

Çizelge 4.1. (devam ediyor)

Ö14	pozitif	pozitif	çubuk	sarı koloni
Ö21	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
Ö22	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	opak bej koloni
Ö23	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	opak bej koloni
Ö24	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	bej koloni
S11	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem koloni
S12	pozitif	pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
S13	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
S14	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
S15	pozitif	pozitif	çubuk	beyaz-bej koloni
A11	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	bej koloni
A12	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
A13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
A14	pozitif	pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
G11	pozitif	pozitif	kısa çubuk	sarı koloni
G12	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
G13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
G14	pozitif	pozitif	çubuk	bej koloni
GS1	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
GS2	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
GS3	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
GS4	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
D11	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
D12	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
D13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni

Çizelge 4.1. (devam ediyor)

D14	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
KZ1	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
KZ2	pozitif	pozitif	kısa çubuk	krem-sarı koloni
KZ3	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
KZ4	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
DK1	pozitif	zayıf pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
DK2	pozitif	pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
DK3	pozitif	pozitif	kısa çubuk	beyaz-bej koloni
DK4	pozitif	pozitif	kısa çubuk	turuncu koloni
ÜP1	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	turuncu koloni
ÜP2	pozitif	pozitif	kısa çubuk	opak bej koloni
ÜP3	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
Kİ1	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
Kİ2	pozitif	zayıf pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
Kİ3	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
Kİ4	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
M11	pozitif	zayıf pozitif	çubuk	beyaz-bej koloni
M12	pozitif	pozitif	çubuk	krem-sarı koloni
M13	pozitif	pozitif	çubuk	beyaz-bej koloni
GA11	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
GA12	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
GA13	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
GA21	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
GA22	pozitif	zayıf pozitif	kısa çubuk	krem koloni
GA23	pozitif	zayıf pozitif	kısa çubuk	krem koloni

ÜÇ1	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	krem-sarı koloni
ÜÇ2	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni
ÜÇ3	pozitif	pozitif	X,Y,V şekli	beyaz-bej koloni

Peynirlerden elde edilen izolatların yapılan klasik tanılama çalışmaları sonucunda Gram boyama ve katalaz testi pozitif olanlar belirlenmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin pleomorfik yapıda olması nedeniyle izolatların mikroskopik morfolojileri incelendiğinde kısa çubuk, çubuk ve X, Y, V şeklinde olanlar seçilmiştir. İzolatların koloni pigment oluşturma özellikleri incelendiğinde ise beyaz, bej, krem, sarı, turuncu, kahverengi ve opak renginde gözlemlenen izolatlar muhtemel propiyonik asit bakterisi olarak değerlendirilmiş ve MALDI-TOF-MS analizine alınmıştır.

4.2. MALDI-TOF-MS ile İzolatların Tanımlanması

MALDI-TOF-MS ile 95 adet izolat analiz edilmiş ve Bruker database MALDI Biotyper Reference Library versiyon 4.0.0.1 (Bruker Daltonics) ile karşılaştırıldığında sonuçlar Microflex LT sisteminden skor olarak verilmiştir. Çizelge 4.2.'de en iyi hangi bakteri türü ile eşleştikleri ve aldıkları skorlar gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. MALDI-TOF-MS Analiz Sonuçları

İzolat No	En Uyumlu Mikroorganizma	Skor
S14	<i>Propionibacterium thoenii</i>	1,978
ÜP1	<i>Propionibacterium thoenii</i>	2,063
K32	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	1,826
GS4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,192
K13	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,143
T21	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,148
Ü23	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,025
S11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,061

Çizelge 4.2. (devam ediyor)

D12	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,333
K11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,192
K22	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,283
K24	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,028
T11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,162
OC4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,184
Ü11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	1,983
Ü14	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,318
KY2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,002
Ö22	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,242
KZ1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,189
Kİ2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	1,979
ÜÇ2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	2,197
K21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,365
K33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,155
T24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,348
OC2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,130
KY3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,998
Ö14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,056
A13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,077
GS2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,214
KZ2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,941
Kİ1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,320
M12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,925
GA21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,154

Çizelge 4.2. (devam ediyor)

ÜÇ1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,985
DK2	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	1,964
M11	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,959
K12	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,011
Ü12	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,057
Ö21	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,202
S12	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,160
G13	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,210
A12	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,081
D14	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,382
GA13	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,896
ÜÇ3	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,158
GA12	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,899
A14	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,002
DK1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,985
ÜP3	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,965
GA11	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,098
T12	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,108
EK3	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,145
DK3	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,891
OC3	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,007
S15	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,174
GS3	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2,054
T22	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,976
KY1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,385

Çizelge 4.2. (devam ediyor)

Ö11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,081
Ö24	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,215
A11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,922
G14	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,105
D13	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,997
ÜP2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,925
Kİ3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,966
M13	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2,019
K31	<i>Enterococcus faecium</i>	2,235
Ü13	<i>Enterococcus faecium</i>	2,121
KY4	<i>Enterococcus faecium</i>	1,993
G11	<i>Enterococcus faecium</i>	2,262
S13	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,981
EK4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,103
GA22	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,097
GA23	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,083
Ü22	<i>Enterococcus durans</i>	1,972
Ö13	<i>Enterococcus durans</i>	1,932
DK4	<i>Enterococcus durans</i>	2,104

MALDI-TOF-MS analiz sonuçlarına göre izolatların %81,1 en az tür bazında güvenilir şekilde identifiye edilmiştir. Analize alınan 95 izolattan 21 tanesi *Propionibacterium* spp. olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatların %20'si *Propionibacterium freudenreichii* iken sadece %2'si *Propionibacterium thoenii* olarak belirlenmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin yanında izolatlardan *Lactobacillus* ve *Enterococcus* olarak tanımlananlar Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

İzolatların büyük çoğunluğu (%23,2) *Lactobacillus paracasei* olarak tanımlanırken %13,7 oranında *Lactobacillus plantarum* ve %10,5 oranında *Lactobacillus fermentum* olarak tanımlanmıştır.

Laktobasiller haricinde MALDI-TOF-MS analizine göre izolatların %11,6'sı *Enterococcus* olarak belirlenmiş ve tür bazında da ayırt edilmiştir. Analiz sonucu tanımlanan izolatların oranları Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Tanımlanan *Enterococcus* bakterilerinin 4 tanesi *Enterococcus faecalis*, diğer 4 tanesi *Enterococcus faecium* ve 3 tanesi de *Enterococcus durans* 'tır.

İzolatların sadece %18,9'u cins seviyesinde güvenilir şekilde tanımlanamamıştır. MALDI-TOF-MS analizine alınan 95 izolattan 77 tanesi en az tür bazında güvenilir şekilde tanımlanabilmiştir. Hızlı ve güvenilir bir tanımlama yöntemi olarak MALDI-TOF-MS analizi bu çalışmanın identifikasyon kısmının tamamlanmasını sağlamıştır.

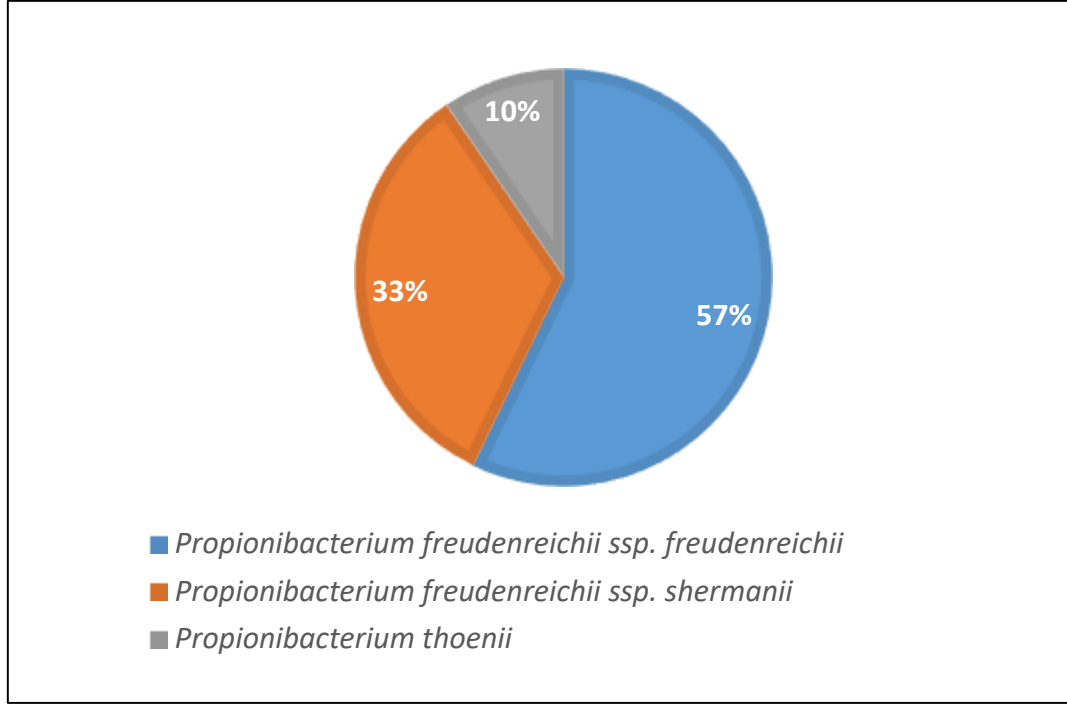
Çizelge 4.3. MALDI-TOF-MS ile tanımlanan izolatların tür bazında dağılım oranları

Tanımlanan Mikroorganizma	İzolot Sayısı	Yüzde (%)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	12	12,6
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	7	7,4
<i>Propionibacterium thoenii</i>	2	2,1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	22	23,2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	13	13,7
<i>Lactobacillus fermentum</i>	10	10,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	4,2
<i>Enterococcus faecium</i>	4	4,2
<i>Enterococcus durans</i>	3	3,2
Güvenilir olmayan tanımlama	18	18,9
Toplam	95	100,0

Kanak ve Yılmaz (2018) tarafından yapılan çalışmada, Türkiye'nin yerel peynirlerinin mikrobiyotasının MALDI-TOF-MS ile incelenmiştir. Bu çalışmada özellikle Laktik asit bakterileri üstünde durulmuş ve elde edilen izolatlar *Enterococcus durans* (6), *E. faecalis* (18), *E. faecium* (24), *E. italicus* (2), *Lactobacillus brevis* (1), *Lb. paracasei* (2), *Lb. plantarum* (1), *Lactococcus lactis* (3), *Leuconostoc lactis* (1), *Leu. mesenteroides* (11), ve *Streptococcus parauberis* (2) olarak tanımlanmıştır. Çalışma kapsamında incelenen peynirlerin arasında Mihaliç peynirinin de bulunmasına rağmen bu çalışmanın aksine hiç Propiyonik asit bakterisi belirlenmemiştir. Bu sonuç, izolatların elde edilmesinde kullanılan besi yerleri ve inkübasyon şartlarının bu mikroorganizmaların gelişimine uygun olmamasından kaynaklanabilmektedir.

Nacef vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen ve bir Fransız peynirinde bulunan laktik asit bakterilerini MALDI-TOF-MS ile belirlemek için yapılan çalışmada *Lactobacillus* sp. (*Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fructivorans*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. brevis*) türleri en baskın grup olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada da %23,3 oranında *Lactobacillus paracasei* en çok bulunan tür olarak belirlenmiştir.

MALDI-TOF analizi ile bu çalışmanın asıl konusunu oluşturan 21 adet Propiyonik asit bakterisi tür seviyesinde tanımlanmıştır. Tanımlanan 21 izolatın hepsi klasik ya da 'dairy' propiyonik asit bakteri grubundandır. *Propionibacterium*'un belirlenen 3 farklı türünün oransal dağılımı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Mihaliç Peynirlerinden İzole edilen *Propionibacterium* türlerinin oransal dağılımı

Propionibacterium freudenreichii subsp. *freudenreichii* (57 %) izole edilerek tanımlanan propiyonik asit bakterileri arasında en baskını olarak belirlenmiştir. Bu tür daha önce İsviçre tipi peynirlerle yapılan bir çalışmada da en baskın tür olarak raporlanmıştır (Baer ve Ryba, 1992). Türkiye’de Mihaliç peynirleri ile yapılan başka bir çalışmada ise *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*’nin bu peynir türünde en sık rastlanan tür olduğu kanıtlanmıştır (Önal-Darılmaz, 2010).

Propionibacterium freudenreichii subsp. *shermanii* peynirlerden izole edilen ikinci yüksek orana sahip (%33) propiyonik asit bakterisidir. Konvansiyonel yöntemler ile *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ve *shermanii*’yi ayırt etmek zor ve zaman alıcıdır. Bu iki alt tür laktoz fermentasyonu ve nitrit indirgeme özellikleri ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* laktozu fermente edip nitratı indirgeyememektedir (Freitas vd., 2015). *P. freudenreichii*’nin alt türlerinin ayırımında moleküler yöntemler başarısız olmasına rağmen MALDI-TOF-MS analizi ayırım için başarılı bir yöntem olmuştur (Vorob’eva vd., 2011). Çünkü MALDI-TOF-MS, 16S rRNA geni tarafından belirtilenden daha ayrıntılı protein profili, vermekte ve izolat örnekleri arasında farklılıkları daha iyi tespit edebilmektedir (Seuylemezian vd., 2018). İzolat örneklerinin MALDI spektrumları, *Propionibacterium*’a ait karakteristik protein

gruplarının ‘marker biyomoleküller’ olması nedeniyle kolayca ayırt edilebildiğini göstermiştir (Vorob’eva vd., 2011).

MALDI analizi ile belirlenen diğer propiyonik asit bakteri türü ise *Propionibacterium thoenii*’dir. Mihaliç peynirinden izole edilen ve tanımlanan propiyonik asit bakterilerinin %10’unu oluşturmaktadır. Bu bulgunun aksine Önal Darılmaz (2010) Türk peynirlerinde bulunan propiyonik asit bakterilerini tanımlamak için yaptığı çalışmada hiç *P. thoenii* belirleyememiştir. Bu sonuç özellikle farklı üreticilerden elde edilen geleneksel peynirlerin farklı lezzet, aroma ve tekstürde olmasının nedeninin farklı mikrobiyotaya sahip olmalarından kaynaklandığını göstermektedir.

Mikroorganizmaların fonksiyonel özelliklerinin suşa bağlı olması gerçeği özellikle starter kültür olarak kullanılacak mikroorganizmaların en azından tür bazında daha iyisi suş seviyesinde tanımlanması gerekmektedir. Moleküler tanımlama yöntemleri yeterince iyi olmalarına rağmen son zamanlarda MALDI-TOF-MS sistemleri hızlı sonuç alma ve düşük maliyetleri nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. MALDI-TOF-MS analizi ile bir mikroorganizma ön hazırlık gerektirmeksizin 5-6 dk gibi kısa bir sürede %20-30 daha ucuza tanımlanabilmektedir (Seng vd., 2009).

Propiyonik asit bakterilerinin güvenli bir şekilde tanımlanması ve birbirinden ayrılması özellikle gıda araştırmaları için büyük önem arz etmektedir. Peynir kalitesi için gerekli olan spesifik starter kültürlerin seçimi, hızlı, ekonomik ve güvenilir bir tanımlama yöntemi olan MALDI-TOF-MS analizleriyle mümkün kılınabilecektir.

4.3. Propiyonibakterilerin Farklı Linoleik Asit Konsantrasyonlarına Karşı Duyarlılığının Değerlendirilmesi

Araştırma kapsamında Mihaliç peynirlerinden izole edilip tanımlanan 21 adet propiyonik asit bakterisinin KLA üretim potansiyellerinin incelenmesi için ilk aşamada linoleik aside olan duyarlılıkları araştırılmıştır. Bölüm 3.2.4.’te bahsedildiği şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar için tüplerdeki bulanıklıklar değerlendirilmiş ve Çizelge 4.4.’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Propiyonik asit bakterilerinin serbest linoleik aside (25, 50 ve 100 µg/mL) karşı duyarlılıkları

Suş No	MALDI-TOF-MS'te Belirlenen PAB Türleri	LA konsantrasyonu (µg/mL)		
		25	50	100
K11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
K22	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
K24	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
T11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
OC4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
Ü11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
Ü14	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
KY2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
Ö22	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
KZ1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
Kİ2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
ÜÇ2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	-	-	-
T21	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	+	+	-

Çizelge 4.4. (devam ediyor)

K13	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	++	+	-
Ü23	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	+	-	-
S11	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	+	-	-
D12	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	++	-	-
K32	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	++	+	-
GS4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	++	+	-
ÜP1	<i>Propionibacterium thoenii</i>	+	+	-
S14	<i>Propionibacterium thoenii</i>	+	-	-

“ - “ bulanıklık yok, gelişme yok, “ + “ az bulanıklık var, gelişme az, “ ++ “ bulanıklık var, gelişme var

Propiyonik asit bakterilerinin serbest linoleik aside karşı duyarlılıklarını taramak için yapılan çalışmada *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan 12 izolat (K11-ÜÇ2) test edilen en düşük linoleik asit konsantrasyonuna (25 µg/mL) karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca test edilen bütün izolatlar 100 µg/mL linoleik asit konsantrasyonuna karşı direnç gösterememiş ve tüplerde herhangi bir gelişmeye rastlanmamıştır. Rainio vd. (2001) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS ile yaptığı çalışmada da 15 µg/mL linoleik asitle başlanan çalışmada gelişme fazında azalma ve konsantrasyon 100 µg/mL olduğunda gelişmenin tamamıyla durduğu belirlenmiştir. Linoleik asidin propiyonik asit bakterileri üzerinde besi yeri ortamında antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Boyaval, Corre, Dupuis ve Roussel, 1995). Bu araştırmada T21, K13, Ü23, S11, D12, K32, GS4 kodlu *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ve ÜP1, S14 kodlu *Propionibacterium thoenii* olarak tanımlanan izolatların hepsi 25 µg/mL linoleik asit konsantrasyonuna karşı direnç gösterip gelişebilirken, sadece T21, K13, K32 ve GS4 kodlu *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ve ÜP1 kodlu *Propionibacterium thoenii* 50 µg/mL linoleik asit varlığında gelişme gösterebilmişlerdir.

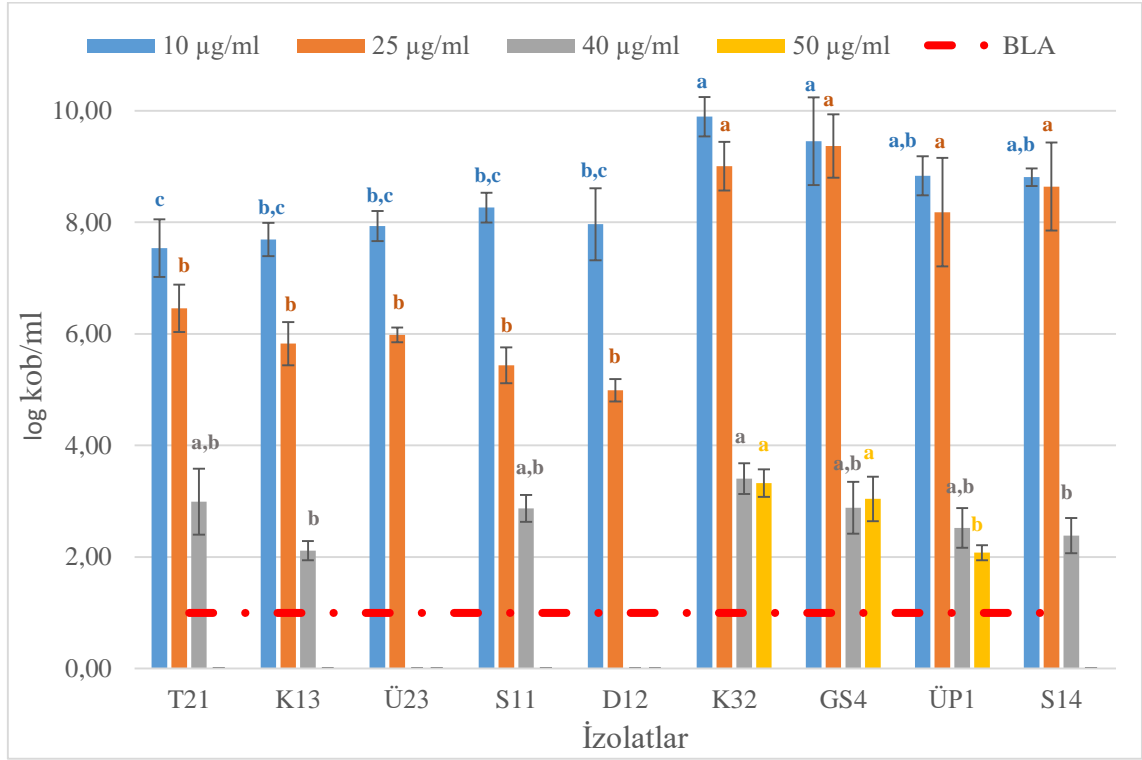
Propiyonik asit bakterilerinin linoleik asit duyarlılığının doğrudan KLA üretim kapasiteleri ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. Jiang vd.'nin (1998) yaptığı çalışmada propiyonik asit bakterilerinin serbest linoleik asidi KLA'ya izomerize etme reaksiyonlarının, bir detoksifikasyon metodu olarak kullanmaları nedeniyle KLA üretimi ile KLA üreten suşlar arasında linoleik asidi tolere edebilme yeteneği arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur.

Linoleik asidin *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS'e karşı antibakteriyel etkisini azaltmaya yönelik yapılan bir çalışmada; polyoxyethylene sorbitan monooleate deterjan yardımıyla 1000 µg/mL linoleik asit konsantrasyonuna kadar direnç sağlandığı tespit edilmiştir (Rainio vd., 2001). Besi yeri ortamında deterjan kullanılarak sağlanan yüksek linoleik asit miktarı, yüksek oranda KLA üretimini sağlarken, bu uygulamanın gıda ürünlerine uygulanabilirliği mümkün değildir.

Propionibacterium freudenreichii subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan izolatlarının hepsi test edilen en düşük konsantrasyona dahi duyarlı olmasından dolayı KLA üretim kapasitelerinin çok düşük olacağı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bundan sonraki analizlerde bu izolatlar kullanılmamıştır.

4.4. Linoleik Asit Duyarlılığı Belirlenen İzolatların KLA Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Linoleik aside karşı duyarlılığı test edilen T21, K13, Ü23, S11, D12, K32, GS4 kodlu *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ve ÜP1, S14 kodlu *Propionibacterium thoenii* izolatlarının 50, 40, 25 ve 10 µg/mL linoleik asit içeren besi yeri ortamında gelişen canlı hücre sayımları bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. 10, 25, 40 ve 50 µg/mL linoleik asit içeren YEL besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterisi sayılarındaki değişim
BLA: Belirlenebilir limitin altında (< 1 log kob/mL)
a, b, c: Her bir LA konsantrasyonu için farklı harfler ile gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

Propiyonik asit bakterilerinin linoleik asite karşı duyarlı oldukları ve LA varlığında gelişiminin azaldığı veya tamamen durduğu bölüm 4.3.'de bahsedilmişti. Bu bölümde daha düşük konsantrasyonlarda PAB'ların sayımı ve bu oranda linoleik asitten KLA üretim miktarları hesaplanmıştır. Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi test edilen en yüksek konsantrasyona (50 µg/mL) K32, GS4 ve ÜP1 kodlu izolatlar direnç göstermiş ve bakteri sayımları sırasıyla 3,32; 3,04 ve 2,08 log kob/mL olarak belirlenmiştir. İzolatlar en yüksek sayıya en düşük konsantrasyonda (10 µg/mL) ulaşmıştır. K32 ve GS4 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, 10 ve 25 µg/mL linoleik asit oranlarında sırasıyla

9,89/9,45 ve 9,00/9,34 log kob/mL sayılarına ulaşmıştır. Linoleik asit oranı 10 µg/mL olduğunda K32, GS4, ÜP1 ve S14 kodlu izolatlar istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0,05$) diğer izolatlardan daha yüksek sayıya ulaşmışlardır.

T21, K13, Ü23, S11, D12 kodlu *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan izolatlar, test edilen her LA oranında K32 ve GS4 kodlu *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* olarak tanımlanan izolatlardan önemli derecede farklı ($p<0,05$) duyarlılık göstermiştir. Bu sonuçlar bir önceki bölümde bulduğumuz LA duyarlılık testi ile tutarlılık içindedir. Aynı şekilde ÜP1 ve S14 kodlu *Propionibacterium thoenii* olarak tanımlanan izolatlar da anlamlı olarak 10 ve 25 µg/mL linoleik asit oranlarında *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan izolatlardan farklılık göstermiştir.

Bu çalışmanın asıl hedeflerinden biri yüksek KLA üreten propiyonik asit bakterilerini belirlemektir. Çizelge 4.5'te LA duyarlılığı test edilmiş 9 adet izolatın KLA üretim miktarları gösterilmiştir. Linoleik asit konsantrasyonu 10 µg/mL olduğunda en yüksek KLA üretimi gerçekleştiren izolatlar sırasıyla GS4, K32 ve ÜP1'dir. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Linoleik aside duyarlılığı daha yüksek olduğu belirlenen T21 ve K13 ise diğer izolatlara göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük verimle KLA üretebilmiştir ($p<0,05$). Rumende bulunan birçok bakteri türünün doymamış yağ asitlerini, özellikle LA'yı KLA'ya dönüştürdüğü bilinmektedir. Bununla birlikte, konjuge yağ asitlerinin verimi suştan suşa değişmekte bu nedenle bakteri seçimi önem arz etmektedir. Ayrıca, pH, sıcaklık, oksijen ve geliştirme ortamının seçimi de dahil olmak üzere birçok faktörün mikrobiyal üretim sürecini etkilediği bildirilmiştir (Gong vd., 2019). KLA üretimi konusunda özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* ön plana çıksa da *Propionibacterium*'un KLA üretimiyle ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (Salsinha, Pimentel, Fontes, Gomes ve Rodríguez-Alcalá, 2018; Angelopoulou vd., 2017; Gorissen vd., 2015; Wang vd., 2007; Auli Rainio vd., 2002; Jiang vd., 1998; Verhulst vd., 1987).

Çizelge 4.5. 10, 25, 40 ve 50 µg/mL linoleik asit içeren YEL besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterilerinin toplam KLA üretim miktarları (µg/mL) ve LA'yı KLA'ya dönüştürme oranları (%)

izola flar	LA konsantrasyonu
---------------	-------------------

	10µg/mL		25 µg/mL		40 µg/mL		50 µg/mL	
	KLA µg/mL	Verim (%)	KLA µg/mL	Verim (%)	KLA µg/mL	Verim (%)	KLA µg/mL	Verim (%)
T21	2,81±0,10 c	28,07	3,85±0,53 b,c	15,41	-	-	-	-
K13	3,06±0,22 c	30,60	4,23±0,15 b	16,90	-	-	-	-
Ü23	3,27±0,25 b,c	32,70	2,94±0,84 c	11,76	-	-	-	-
S11	4,12±0,37 b	41,20	-	-	-	-	-	-
D12	3,63±0,52 b,c	36,33	-	-	-	-	-	-
K32	6,84±0,53 a	68,43	8,85±0,26 a	35,40	-	-	-	-
GS4	7,16±0,23 a	71,57	9,08±0,46 a	36,30	-	-	-	-
ÜP1	6,63±0,50 a	66,33	3,28±0,57 c	13,10	-	-	-	-
S14	4,50±0,75 b	45,00	3,93±0,59 b,c	15,70	-	-	-	-

-: KLA belirlenmemiştir.

a,b,c: Her bir sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

Lactobacillus, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait farklı türlerin konjuge linoleik asit üretimlerinin incelendiği bir çalışmada serbest linoleik asit (500 µg/mL) içeren besi yeri ortamında Propiyonibakterilerin, KLA üretim oranları %14-28 arasında, değişmektedir. Propiyonibakteriler içinde en yüksek KLA üretimi *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* S28'de 140 µg/mL, olarak, en düşük KLA sentezi ise *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* S21'de 70 µg/mL olarak belirlenmiştir. (Yiğit Doğan, 2011). KLA dönüştürme oranları bu çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında daha düşüktür, fakat üretilen KLA miktarları daha yüksek oranda substrat kullanıldığı için daha yüksektir. Bakterilerin LA'ya karşı duyarlılığının suşa bağlı değiştiği bilinmekte ve bu duyarlılığın KLA üretim kapasitesini etkilediği bilinmektedir. Yiğit Doğan'ın (2011) çalışmasında kullandığı PAB suşları LA'ya karşı daha dirençli olduklarından ve farklı besi yerinde KLA üretimi gerçekleştirildiğinden dolayı yüksek konsantrasyonlarda KLA üretebilmişlerdir.

Rainio vd. (2001) *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS ile KLA üretimi gerçekleştirmek için yaptıkları çalışmada asıl olarak polyoxyethylene sorbitan monooleate kullanarak LA direncini arttırmayı amaçlamışlardır. Linoleik asit içeren (600

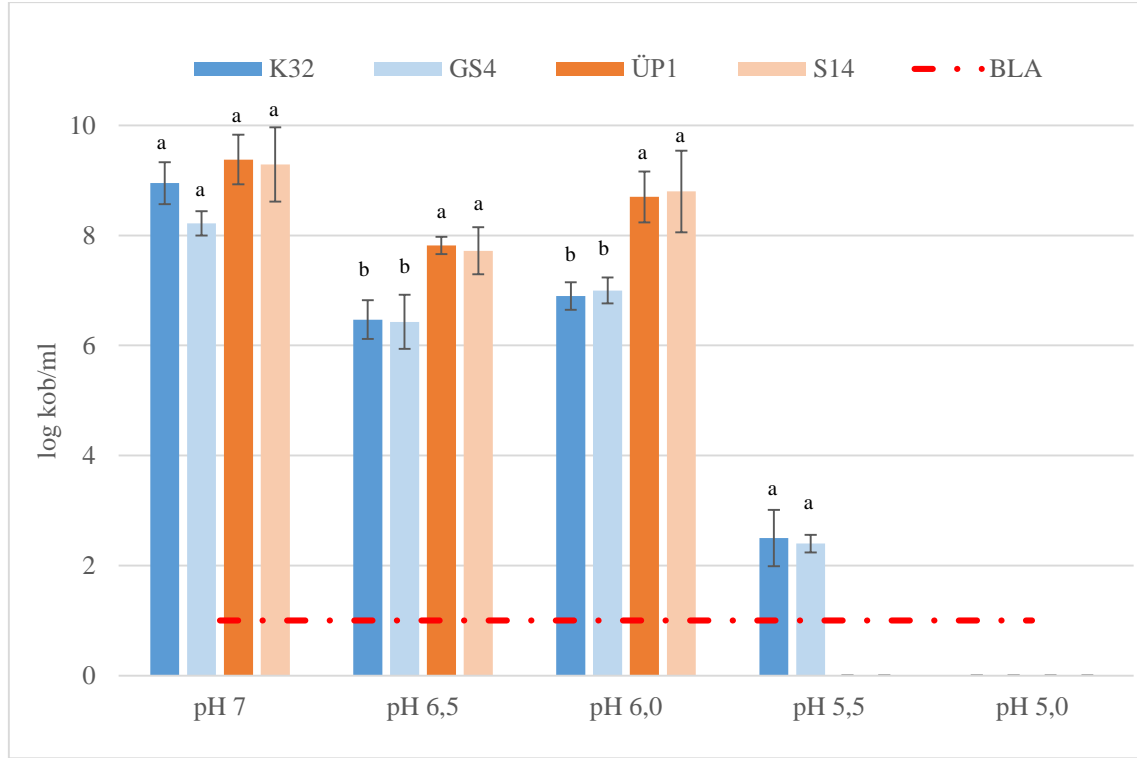
$\mu\text{g/mL}$) MRS besi yerinde herhangi bir deterjan ilavesi olmadığında sadece %0,4 oranında (2,4 $\mu\text{g/mL}$) KLA üretebilmişlerdir. Kullanılan substrat miktarı bizim çalışmamızdakinden çok daha yüksek olmasına rağmen elde edilen KLA miktarı daha düşüktür. Bizim çalışmamızda 10 $\mu\text{g/mL}$ LA içeren YEL besi yerinde 2,8-7,2 $\mu\text{g/mL}$ KLA, 25 $\mu\text{g/mL}$ LA bulunan ortamda ise 11,8-36,3 $\mu\text{g/mL}$ KLA üretilmiştir.

Propionibacterium ve *Bifidobacterium* cinslerine ait bazı mikroorganizmaların farklı yağ asitlerini KLA dönüştürme oranlarının incelendiği bir çalışmada *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 9093, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* Propioni-6 ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ATCC 6207 suşlarının linoleik asidi (450 $\mu\text{g/mL}$) KLA'ya dönüştürme verimliliği çalışılmıştır. En yüksek dönüştürme oranı %47,4 ile *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 9093 (214 $\mu\text{g/mL}$ KLA) aittir. Diğer *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS suşu ise aynı ortamda sadece %8,8 dönüşüm sağlayabilmiştir (6 $\mu\text{g/mL}$ KLA). Bu sonuçlar KLA üretim yeteneğinin suş bazında değişebildiğini göstermektedir (Hennessy vd., 2012). Çalışmada ulaşılan en yüksek dönüştürme oranı (%47,4) bu çalışmada bulunan en yüksek dönüştürme oranından (%71,6) düşüktür. Buradan açıkça anlaşılmaktadır ki KLA dönüştürme oranı kullanılan bakterilerin izomerizasyon kapasitesiyle ilgilidir (Hennessy vd., 2012; Jiang vd., 1998)

Yüksek linoleik asit konsantrasyonunun KLA üretimini doğrudan etkilediği çalışmamızda da gözlemlenmiştir. Test edilen 40 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ LA içeren besi yeri ortamında hiç KLA sentezi gerçekleşmemiştir. Linoleik asidin inhibe edici etkisinden dolayı bu oranlarda bakteri gelişimi ya çok azalmış ya da tamamen durmuştur (Şekil 4.2.). KLA üretim kapasitelerinin suşa bağlı olarak çok değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Bununla beraber ortam şartlarının da KLA sentezinde etkisi mevcuttur. Bu çalışma kapsamında yüksek KLA üretim potansiyeline sahip PAB izolatları Mihaliç peynir üretiminde kullanılması hedeflendiği için pH ve tuz konsantrasyonunun KLA üretimi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla KLA verimi anlamlı oranda ($p < 0,05$) yüksek olan K32, GS4, ÜP1 ve S14 kodlu izolatlar ile çalışmaya devam edilmiş bu bakterilerin farklı pH'da ve farklı oranda tuz içeren ortamlarda gelişmeleri değerlendirilmiştir.

4.5. Propiyonibakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransının Değerlendirilmesi

KLA sentezleme yeteneği 10 µg/mL LA konsantrasyonuna göre yüksek olduğu belirlenen K32, GS4, ÜP1 ve S14 kodlu izolatların farklı pH değerlerine (pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 ve 5,0) sahip besi yeri ortamında 72 saat inkübasyon sonucu sayımları yapılmış (bölüm 3.2.3) ve elde edilen sayımlar Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 ve 5,0 olan besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterisi sayılarındaki değişim

BLA: Belirlenebilir limitin altında (< 1 log kob/mL)

a,b: Her bir pH'da farklı harfler ile gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

Propiyonik asit bakterilerinin pH duyarlılıkları değerlendirildiğinde optimum gelişme pH'sı olan pH 7 seviyesinde tüm izolatların sayımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p>0,05). Bakteri sayıları pH 7 de 8,22-9,38 log kob/mL aralığındadır. Gelişme ortamının pH'sı 6,5 olduğunda K32 ve GS4 (*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) kodlu izolatların sayısı sırasıyla %27,7 ve %21,7 oranında azalmış ve önemli derecede diğer iki izolattan (ÜP1 ve S14) farklılık göstermişlerdir (p<0,05). ÜP1 ve S14 kodlu izolatlar ise pH 7'deki sayımlarına göre sırasıyla %16,6 ve %16,9 oranında azalma göstermiştir. Tüm izolatlardan elde edilen verilere göre propiyonibakterilerin farklı pH

değerlerine direnci oldukça zayıf bulunmuştur. Besi yerindeki pH değişimi bakterilerin gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir.

İzolatların tamamı pH5'te gelişim gösterememiş ve tamamen inhibe olmuştur. *P. thoenii* olarak tanımlanan ÜP1 ve S14 kodlu izolatlar ise pH 5,5 olduğunda da gelişim gösterememiştir.

P. freudenreichii subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* olarak tanımlanan bakteriler optimum gelişim pH'ları (pH 7) dışında bütün pH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde birbirinden farklıdır (p<0,05). pH 6 oranı haricinde bütün pH seviyelerinde *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. thoenii*'ye göre daha dirençlidir. Aynı türler içinde ise farklı pH değerlerine karşı gösterilen direnç önemli bulunmamıştır (p>0,05).

Geleneksel Türk peynirlerinden izole edilen propiyonik asit bakterilerinin pH dirençlerinin değerlendirildiği bir çalışmada ortamdaki asitlik miktarı ile bakterilerin yoğunluğunu ters orantılı olduğu bildirilmiştir. Araştırmamızdan farklı olarak test edilen *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DO7 suşunun pH 2 seviyesine kadar direnç gösterebildiği, bakterilerin pH dirençlerinin yüksek EPS üretim kabiliyetleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Önal-Darılmaz, 2010).

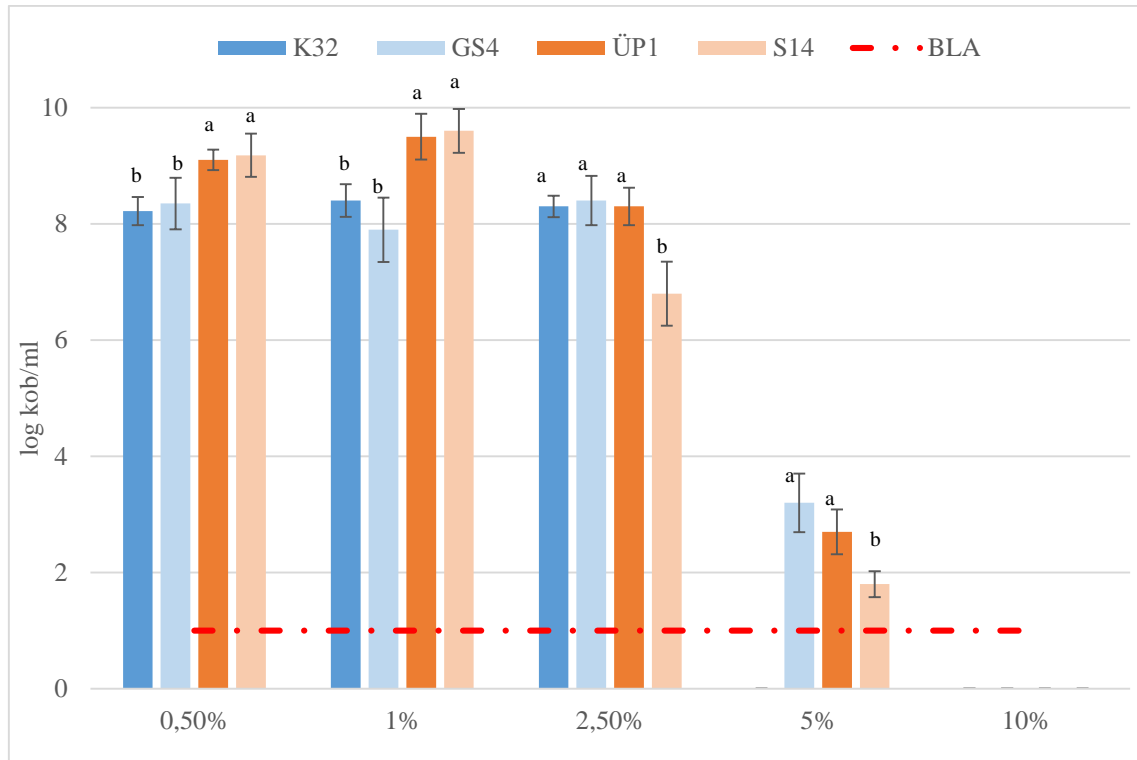
Campaniello, Bevilacqua, Sinigaglia ve Altieri (2015) PAB'ların probiyotik özelliklerini belirlemek için gerçekleştirdikleri çalışmada pH 2,5 ve %0,3 safra tuzu içeren besi yerinde 3 saat sonunda test edilen (*P. freudenreichii*, *P. thoenii*, *P. jensenii* ve *P. acidipropionici*) bakterilerin hiç birinde canlılık kaybı gözlemlenmezken 24 saatlik inkübasyon sonucunda *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. jensenii* ve *P. thoenii* bakterileri en az %30 oranında canlılığını yitirmiştir. İnkübasyon süresi pH direncini olumsuz etkilemektedir. Bizim çalışmamızda farklı pH seviyelerinde 72 saat inkübasyon sonrası bakteri sayımı yapılmış ve pH değerinin azalmasıyla bakteri sayımının azaldığı net bir şekilde görülmüştür.

Test edilen suşların, asidik pH'da canlılığını koruyabilme yeteneklerinin literatürde bulunan sonuçlardan farklı olma eğilimi ayrıca güçlü suş spesifikliğine bağlı olabilir. Boke, Aslım ve Alp (2010) klasik propiyonik asit bakterilerinde pH direncinin suşa bağlı olarak değiştiğini bildirmiştir.

Suşa göre değişen asit direncinin yanında bakterilerin geliştiği besi yeri ortamının da bu direnç mekanizmasında önemli etkisi olmaktadır. Serbest besi yeri ortamında geliştirilen bakterilerin peynirde bulunanlara göre daha fazla asit duyarlılığı olduğu belirlenmiştir (Altieri, 2016). Çalışmamızda da besi yeri ortamında pH 5 seviyesinde izolatlar canlılığını devam ettiremezken Mihaliç peynir üretiminde kullanıldıklarında canlılıklarını devam ettirebilmişlerdir.

4.6. Propiyonibakterilerin Farklı Tuz Konsantrasyonlarına Toleransının Değerlendirilmesi

K32, GS4, ÜP1 ve S14 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* olarak tanımlanan izolatların farklı tuz oranlarına (%0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10) sahip besi yeri ortamında 72 saat inkübasyon sonucu ulaştıkları hücre sayısı bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Tuz oranı %0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10 olan besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterisi sayılarındaki değişim

BLA: Belirlenebilir limitin altında (< 1 log kob/mL)

a,b: Her bir tuz konsantrasyonunda farklı harfler ile gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tüm izolatlardan elde edilen verilere göre *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* bakterilerinin %0,5 ve %1'lik tuz konsantrasyonuna toleransı istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* olarak tanımlanan K32 ve GS4 kodlu izolatlar %0,5 tuz içeren besi yeri ortamında sırasıyla 8,22 ve 8,35 log kob/mL sayısına ulaşırken tuz oranı %1 olduğunda bu değer 8,4 ve 7,9 log kob/mL olarak belirlenmiştir. *P. thoenii* olarak tanımlanan ÜP1 ve S14 izolatları ise %0,5 ve %1 tuz oranlarında sırasıyla 9,1/9,2 ve 9,5/9,6 log kob/mL değerlerine ulaşmıştır.

Tuz konsantrasyonu %2,5 olduğunda ise S14 kodlu izolat diğer bakterilerden daha fazla hassasiyet göstererek istatistiksel olarak anlamlı derecede sayısı azalmış ($p<0,05$) ve 6,8 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu tuz konsantrasyonunda diğer üç izolat arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p<0,05$).

K32 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* %5 ve %10 tuz konsantrasyonunda tamamen inhibe olurken, GS4 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* %5 tuz oranına en dirençli bakteri olmuştur. Fakat bu izolat da %10 tuz oranına direnç gösterememiştir. GS4 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve ÜP1 kodlu *P. thoenii* %5 tuz oranına karşı önemli derecede direnç gösterirken S14 kodlu *P. thoenii* istatistiksel olarak önemli farkla daha az direnç gösterebilmiş ve belirlenebilir limite yakın tahmini sayıda (1,8 log kob/mL) gelişebilmiştir.

Tüm izolatlar %10 tuz oranına tolerans gösterememiş ve inhibe olmuştur. Propiyonik asit bakterilerinin artan tuz konsantrasyonlarında aktif kalabilme yeteneği suşa bağımlı olduğu bildirilmiştir (Thierry vd., 2011a). Bu çalışmada tuza karşı olan tolerans düşük konsantrasyonlarda türe bağlı iken, %5 tuz oranında suş bazında farklılık gözlenmiştir.

Tuz oranının artmasıyla suşların dirençliliği arasında gözlenen farklar literatürde de tespit edilmiş ve tuzun etkisi propiyonik asit fermentasyonunun tamamen bitmesi ya da azalması şeklinde gözlenmiştir. Tuz duyarlılığı normal şartlarda (%1 tuz) teknolojik yeteneklerden bağımsız olmasına karşın tuz oranının artmasından en fazla CO₂ üretimi etkilenmektedir. Bazı tuza duyarlı suşlar, birbirine yakın bir propiyonat/asetat oranı göstermektedir. Bu değer, Propionibakteriler için tarif edilen üçüncü metabolik yola karşılık gelir: üç laktat -> 1 süksinat + 1 propiyonat + 1 asetat (Richoux, Faivre ve Kerjean, 1998).

4.7. Çörek Otu Yağı İlave Edilmiş Ortamda PAB'ların Gelişimi ve KLA Üretiminin Değerlendirilmesi

Linoleik asit konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde çörek otu yağı ilave edilmiş besi yeri ortamında geliştirilen izolatların gelişim durumları ve KLA üretim miktarları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Çörek otu yağı içeren besi yerinde gelişen propiyonik asit bakterilerinin gelişim durumları ve toplam KLA üretim miktarları (µg/mL)

İzolatlar	log kob/mL	KLA µg/mL
K32	8,21 ± 0,24 b	3,99 ± 0,16 a
GS4	9,10 ± 0,48 a	4,24 ± 0,31 a
ÜP1	9,26 ± 0,33 a	3,91 ± 0,36 a
S14	8,45 ± 0,66 a,b	2,10 ± 0,11 b

a,b,c (↓): Her sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır.

Çörek otu yağı içeren besi yerinde geliştirilen izolatlar 9,29-8,21 log kob/mL aralığında gelişim göstermişlerdir. ÜP1 kodlu *P. thoenii* izolatı en yüksek sayıma ulaşırken, GS4 ve S14 izolatları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir fark yoktur (p>0,05). K32 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ise 8,21 log kob/mL ile diğerlerine göre daha az gelişme göstermiştir.

İzolatların linoleik asit kaynağı olarak çörek otu yağı ilave edilen besi yerinde KLA üretim miktarları 2,10- 4,24 µg/mL aralığında belirlenmiştir. GS4 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* en yüksek miktarda (4,24 µg/mL) KLA üretebilmiştir. K32 ve ÜP1 kodlu izolatlar istatikselsel olarak anlamlı derecede farkı olmayan miktarlarda KLA üretebilmişlerdir (p>0,05). En az oranda KLA üretimi S14 kodlu *P. thoenii* ile gerçekleştirilmiştir.

Saf linoleik asitten elde edilen KLA üretimleri ile karşılaştırıldığında çörek otu yağı içeren besi yeri ortamında, ortalama %45 daha az KLA üretimi gerçekleştiği görülmektedir.

Literatürdeki çalışmaların birçoğunda benzer sonuçlar gözlenmiştir. Ayçiçek yağı ile saf linoleik asitten laktik asit bakterilerini kullanarak KLA üretimini araştıran bir çalışmada hidrolize edilmiş ayçiçek yağından (4 mg/mL) 0,064 mg/mL KLA elde edebilirken saf linoleik asit ilave edildiğinde 1,65 mg'a kadar KLA üretilebildiği bildirilmiştir (Ballıkaya, 2007).

Hidrolize ve hidrolize olmayan soya yağının ilave edildiği süt benzeri bir besi yeri ortamında KLA üretimini inceleyen bir çalışmada *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 56, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 51 ve *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* 23 bakterileri hidrolize yağ içeren ortamda KLA üretebilirken (2,21 mg KLA/ g yağ), %1 hidrolize olmayan soya yağı içeren besi yerinde KLA üretememişlerdir (Xu, Boylston ve Glatz, 2004). Bu çalışmada çörek otu yağı hidroliz edilmeden misel çözelti olarak kullanıldığı için KLA üretiminde azalma gözlenmiş olabilir.

Farklı oranlarda Ayçiçek yağı kullanılarak KLA üretimini inceleyen bir çalışmada ise Ayçiçek yağı bu çalışmada olduğu gibi misel çözelti olarak besi yerine ilave edilmiş ve KLA üretimi değerlendirilmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, sodyum laktat besi yerinde kontrolde 3,41 µg/mL KLA üretebilirken, 9,6 mg/mL Ayçiçek yağı içeren besi yerinde KLA konsantrasyonunu 73,9 µg/mL'ye arttırmıştır (Wang vd., 2007). Yağsız süt tozu ve MRS besiyerlerinin de test edildiği çalışmada gelişme ortamının da bakterinin KLA üretim miktarı üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. Araştırmamızda çörek otu yağı içeren YEL besi yerinden 2,1-4,24 µg/mL KLA elde edilmiştir. Wang vd.(2007) 3,41 µg/mL olan KLA miktarının besi yerine polyoxyethylene sorbitan monooleate içeren ayçiçeği karışımını ilave ederek arttırmayı başarmıştır.

Linoleik asit, pH, tuz duyarlılığı ve çörek otu yağı içeren besi yerinde gelişimi değerlendirilen izolatlar arasında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* olarak tanımlanan K32 ve GS4 kodlu izolatların incelenen özelliklerinin çoğunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Sadece %5 tuz oranına GS4 kodlu izolat anlamlı derecede direnç gösterirken (p<0,05) K32 gelişme gösterememiştir. Ayrıca her iki izolat MALDI-TOF analizi sonucu aynı suş olarak tanımlandığı için peynir yapımında KLA verimi %72 olan GS4 kodlu izolat kullanılmıştır. *P. thoenii* olarak tanımlanan ÜP1 ve S14 izolatlar arasında linoleik asit duyarlılığı açısından anlamlı bir farklılık olmazken (p<0,05), tuz direnci incelendiğinde ÜP1 kodlu *P. thoenii* istatistiksel olarak önemli derecede farklılık göstermiştir. Ayrıca bu iki izolatın KLA verimi değerlendirildiğinde %66 verimle ÜP1

kodlu izolat anlamlı derece yüksek verime sahip olduğu için peynir üretiminde bu kültür kullanılmıştır.

Sonuç olarak mihaliç peynirinden izole edilip tanımlanan 21 adet PAB ilk önce LA duyarlılıklarına göre taranmış ve dirençli olan 9 izolatın KLA üretim kapasitesi değerlendirilmiştir. Buradan KLA üretme yeteneği en yüksek belirlenen 4 izolatın pH ve tuz duyarlılıklarına bakılmıştır. İzolatların pH duyarlılıkları arasında ayırt edici bir farklılık olmadığında tuz direnci en iyi olan ve KLA üretim kapasitesi yüksek olan *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* GS4 ve *P. thoenii* ÜP1 bakterileri peynir üretimi için seçilmiştir.

4.8. Mihaliç Peynir Üretimi

KLA miktarı yükseltilmiş Mihaliç peyniri üretimi gerçekleştirmek amacıyla bu çalışma kapsamında özellikleri ve KLA üretim potansiyelleri değerlendirilen *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* beraber ve ayrı ayrı kullanılmıştır. Linoleik asit kaynağı olarak süte saf linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmiştir. Her iki parametre için kontrol üretimi de yapılmış toplam 12 adet Mihaliç peynir örneği analiz edilmiştir (Çizelge 3.4).

4.9. Mihaliç Peyniri Mikrobiyolojik Analizleri

Peynirlerin mikrobiyolojik özellikleri özellikle peynirin olgunlaşmasında en önemli faktörlerden biridir. Mikroorganizmalar hem peynir üretiminde hem de olgunlaşma sürecinde çok önemli görevler alırlar. Olgunlaşma süresince gerçekleşen komplike reaksiyonların birincil sorumlularıdır. Peynir mikrobiyotası peynirde hem lezzet oluşumu hem de tekstür oluşumu açısından çok önemlidir. Bu kapsamda bu çalışmada olgunlaşma boyunca peynirlerin toplam mezofilik aerobik, laktik asit ve propiyonik asit bakteri sayımları yapılmıştır.

4.9.1. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma Periyodunda Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) Sayısı

Peynir örneklerinde 3, 14, 30, 60 ve 90. gün sonunda toplam mezofilik ve aerobik bakteri sayımını 32°C de 48 saat inkübasyon sonrası Bölüm 3.4.1'de açıklandığı gibi yapılmıştır. Peynirlerin olgunlaşma boyunca TMAB sayıları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Peynirlerde toplam canlı bakteri sayısı kullanılan çiğ sütün kalitesine, kullanılan

salamuranın tuz oranına, su aktivitesine, pH'ya, ve asitliğe bağlıdır (Gürsoy ve Kesenkaş, 2011). Bu kriter açısından peynirler incelendiğinde olgunlaşma zamanının toplam canlı sayısına etkisinin önemli olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

Çizelge 4.7. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma boyunca Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri sayısı (log kob/g)

LA kaynağı: Linoleik Asit (L)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavesiz) (K)
Zaman	3. Gün	9,34±0,04 a AB	9,63±0,10 a A	9,52±0,34 ab AB	9,12±0,12 b B
	14. Gün	8,43±0,94 ab A	9,26±0,15 b A	9,13±0,59 b A	9,82±0,07 a A
	30. Gün	8,20±1,03 ab B	9,48±0,03 ab AB	10,05±0,07 a A	10,02±0,03 a A
	60. Gün	9,42±0,03 a A	8,75±0,05 c B	9,66±0,20 ab A	9,45±0,09 ab A
	90. Gün	7,65±0,19 b C	8,04±0,11 d BC	8,81±0,04 b AB	9,39±0,55 ab A
LA kaynağı: Çörek Otu Yağı (Ç)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavesiz) (K)
Zaman	3. Gün	9,25±0,03 b BC	9,54±0,01 a B	9,99±0,21 a A	8,97±0,07 b C
	14. Gün	9,72±0,02 a AB	9,34±0,09 ab BC	10,17±0,21 a A	9,15±0,34 ab C
	30. Gün	9,67±0,01 a A	9,56±0,06 a A	9,37±0,05 b A	9,63±0,23 a A
	60. Gün	8,06±0,02 c B	8,95±0,02 bc A	8,87±0,08 bc A	8,85±0,05 b A
	90. Gün	8,14±0,19 c B	8,54±0,34 c AB	8,56±0,36 c AB	9,11±0,21 ab A
LA kaynağı: Kontrol (K) LA veya çörek otu yağı ilave edilmedi					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavesiz) (K)
Zaman	3. Gün	9,46±0,12 ab B	9,47±0,05 b B	10,17±0,25 a A	8,58±0,33 cd C
	14. Gün	10,43±0,15 a A	9,77±0,12 a B	9,79±0,05 b B	9,85±0,19 ab B
	30. Gün	10,37±0,05 a A	9,52±0,16 ab B	9,95±0,05 ab AB	10,13±0,43 a A
	60. Gün	9,33±0,35 ab A	8,91±0,08 c A	9,04±0,08 c A	9,21±0,17 bc A
	90. Gün	9,01±0,43 b A	8,06±0,06 d A	7,94±0,04 d A	8,13±0,17 d A

A,B,C (→) aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir ($p<0,05$).

a,b,c,d (↓) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

Linoleik asit ilavesi yapılan süttten hazırlanan peynirlerin olgunlaşmanın 3. gününde TMAB sayıları 9,12-9,63 log kob/g arasında değişmektedir. Bu süttten yapılan peynirlerde TMAB sayısı kullanılan kültüre göre önemli seviyede değişmiştir ($p<0,05$). Bu grubun kontrolü olarak üretilen kültür ilavesiz peynirde (LK) olgunlaşma başında düşük olan bu değer olgunlaşma süresince artmış ve 90. günde 9.39 log kob/g'a ulaşmıştır. Kültür ilave edilen örneklerde (LF ve LT) ise olgunlaşma sonunda toplam canlı sayısı iki kültürün beraber kullanıldığı örnek (LFT) hariç önemli oranda azalmıştır ($p<0,05$). Olgunlaşma sonunda en düşük TMAB sayısı 7,65 log kob/g ile *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (LF) aittir. *P. thoenii* ve her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirlerdeki (LT ve LFT) sayım ise aynı grupta yer alarak varyans analizi sonucu anlamlı bir farklılık göstermemişlerdir ($p>0,05$). Şekil 4.5.'te görüldüğü üzere TMAB sayısı en çok *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (LF) azalırken kontrol örneğinde (LK) değişiklik görülmemiştir.

Çörek otu yağı ilave edilen sütler ile hazırlanan peynirler incelendiğinde bu grubun kontrol örneği (ÇK) dışında tüm örneklerde olgunlaşma sonunda TMAB sayısında azalma gözlenmiştir. Olgunlaşmanın 3. gününde her iki kültürün beraber kullanıldığı örnekte (ÇFT) TMAB sayısı 9,99 log kob/g ile diğer örneklerde istatistiksel olarak önemli derecede yüksektir ($p<0,05$). Olgunlaşmanın başında en düşük değer (8,97) herhangi bir kültür ilave edilmeden üretilen kontrol örneğine (ÇK) aittir. Olgunlaşmanın 30. gününde kültürler arası fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0,05$). Olgunlaşmanın 60. gününden itibaren azalmaya başlayan TMAB sayısı, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* bakterisinin ürettiği propiyonik asidin diğer mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Olgunlaşmanın 90. gününde *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (ÇF) en düşük TMAB sayısına sahip olarak diğer peynir örneklerinden anlamlı olarak farklılık göstermiştir. Olgunlaşmanın sonunda ise linoleik asit ilaveli sütlerde olduğu gibi herhangi kültür ilavesi olmadan üretilen kontrol örneği (ÇK) en yüksek TMAB sayısına sahiptir. Süte ilave edilen kültürlerin TMAB sayısına etkisi açıkça görülmektedir. Her iki kültürün de inhibisyon etkisine neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kontrol süttünden (LA veya çörek otu yağı ilave edilmeden) yapılan peynirlerde olgunlaşmanın başında TMAB sayısı 8,58-10,17 log kob/g arasında değişirken, en yüksek değer her iki kültürün beraber kullanıldığı (KFT), en düşük sayı ise herhangi kültür ilavesi

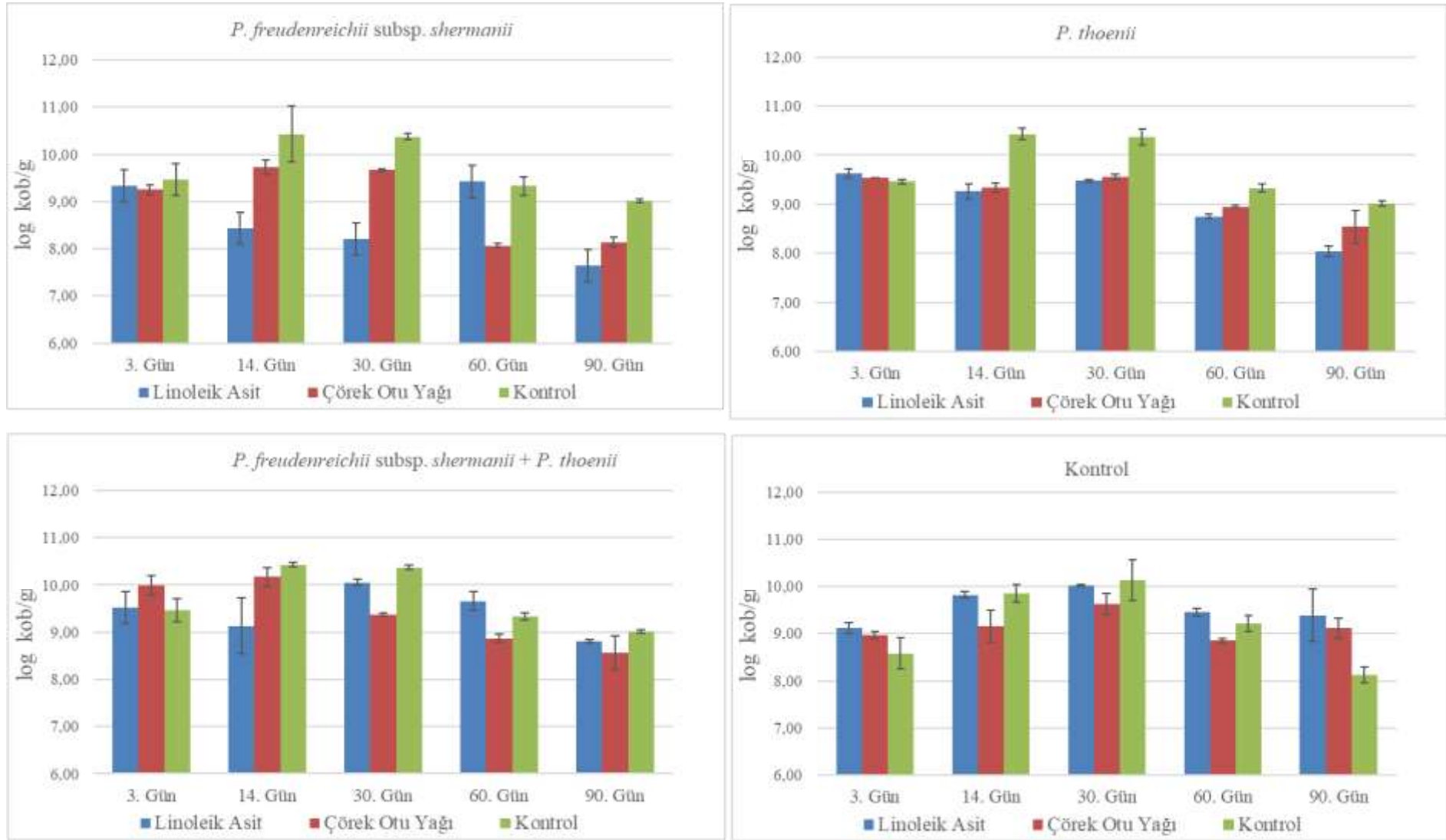
olmayan kontrol örneğinde (ÇK) tespit edilmiştir. Olgunlaşmanın TMAB sayısı üzerine etkisi anlamlı bulunmuş ve olgunlaşmanın sonunda bu değer tüm örneklerde azalmıştır ($p < 0,05$).

Tüm örnekler için olgunlaşma süresince TMAB sayıları 14. ve 30. günlerde artma eğilimindeyken 60. günden sonra azalma eğilimine girmişlerdir (Şekil 4.5.). Linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilen sütler ile yapılan peynirlerin aksine kontrol sütünden (LA veya çörek otu yağı ilave edilmeyen) yapılan peynirlerde olgunlaşma sonunda toplam canlı sayılarında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p > 0,05$).

Peynirlerin olgunlaşma dönemleri boyunca hem mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu ortaya çıkan ürünler hem de olgunlaşma için gerekli biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler peynir mikrobiyotasında bulunan mezofilik ve aerobik bakterilerin gelişimine destek ve/ veya engel olabilmektedir. Olgunlaşma periyodunda gözlenen TMAB sayısındaki artış ve azalmaların nedeni bu şekilde açıklanabilir.

Şen (1991) Mihaliç peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerini belirlediği araştırmasında çiğ süttten yapılan mihaliç peynirlerinin TMAB sayısını olgunlaşma başında ve sonunda sırasıyla $9,3 \times 10^9$ ve $1,4 \times 10^7$ kob/g olarak bildirmiştir. Benzer şekilde olgunlaşma boyunca TMAB sayısında azalma özellikle linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (LF) ve *P. thoenii* (LT) ile yapılan, çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (ÇF) ile yapılan ve herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten her iki kültürün beraber kullanılmasıyla üretilen (KFT) peynirlerde gözlemlenmiştir.

Bulut (2006), çiğ ve pastörize süttten yaptığı Mihaliç peynirlerinde toplam canlı sayısını sırasıyla olgunlaşma başında $3,7 \times 10^9$ kob/g ve $3,8 \times 10^8$ kob/g olgunlaşma sonunda ise $1,7 \times 10^9$ kob/g ve $9,6 \times 10^8$ kob/g olarak bildirmiştir. Bu çalışmada olgunlaşma boyunca mezofilik bakteri sasisindeki artış olgunlaşma süresince gerçekleşen reaksiyonlar sonucu açığa çıkan metabolitlerin bu bakterilerin gelişimini desteklediği şeklinde açıklanmıştır. Bizim araştırmamızda peynirle çiğ süttten yapılmış ve olgunlaşma başında Bulut'un (2006) çalışmasında çiğ süttten yapılan peynirlerim TMAB sayısına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.5.'te Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı verilmiştir



Şekil 4.5. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı

Kamber (2008) Marmara bölgesinde bulunan geleneksel peynirleri değerlendirdiği çalışmada ise Mihaliç peynirlerinin TMAB sayısını $4,9 \times 10^7$ ve $5,3 \times 10^7$ kob/g olarak bildirmiştir. Bu değerler genel olarak bizim alışmamızdaki TMAB sayılarından dūřuktur. Kamber, bu sayıların olgunlaşmanın hangi aşamasında belirlendiğini makalesinde belirtmemiştir.

4.9.2. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma Periyodunda Toplam Propiyonik Asit Bakteri Sayısı

Peynirlerde PAB sayısını Bölüm 3.4.2’de aıklanığı gibi yapılmıştır. YEL besi yerinde anaerobik ortamda gerçekleşen inkübasyon sonucu belirlenen sayılar izelge 4.8’de gösterilmiştir. Peynire ilave edilen kültürler PAB grubundan olduğu için kontrol grubuna göre önemli farklılıklar belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Linoleik asit ilave edilen sütlerden yapılan peynirlerde olgunlaşmanın 3. gününde toplam propiyonik asit bakteri sayısı $7,61-3,72$ log kob/g arasında değişmektedir. Her iki kültürün tek tek ve beraber kullanıldığı peynirlerin (LF, LT ve LFT) toplam PAB sayıları arasında anlamlı bir farka rastlanmazken ($p > 0,05$) herhangi bir kültür ilavesi olmayan peynir rneđi (LK) istatikselsel olarak anlamlı derecede diğerlerinden daha az PAB ihtiva etmektedir. Olgunlařma süresince LA ilaveli sütten yapılan peynirlerin hepsinde 14. günde en yüksek PAB değerine ulaşılmıştır. Olgunlařma sonunda ise bütün peynirlerde bu değer azalırken en dūřk toplam PAB sayısı $6,91$ log kob/g ile kontrol rneđinde (LK) belirlenmiştir. Kültür ilave edilen peynirler (LF, LT ve LFT) arasında ise olgunlaşma sonunda toplam PAB değerleri arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p > 0,05$).

Çizelge 4.8. Mihaliç Peynirlerinin olgunlaşma boyunca Toplam Propiyonik Asit Bakteri sayısı (log kob/g)

LA kaynak: Linoleik Asit (L)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavessiz) (K)
Zaman	3. Gün	7,55±0,21 c A	6,95±0,02 d A	7,61±0,03 c A	3,72±0,49 c B
	14. Gün	8,96±0,01 a A	8,87±0,06 a B	8,87±0,02 a B	7,92±0,03 a C
	30. Gün	8,52±0,19 b AB	8,70±0,02 a A	7,61±0,15 c C	8,30±0,13 a B
	60. Gün	8,19±0,01 b AB	8,13±0,13 b AB	8,06±0,06 b B	8,31±0,03 a A
	90. Gün	7,17±0,09 d AB	7,37±0,12 c A	7,29±0,01 d AB	6,91±0,29 b B
LA kaynak: Çörek Otu Yağı (Ç)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavessiz) (K)
Zaman	3. Gün	7,23±0,05 c AB	6,53±0,05 c B	7,53±0,05 b A	4,03±0,54 c C
	14. Gün	8,92±0,01 a A	8,63±0,06 a B	8,63±0,06 a B	7,45±0,02 a C
	30. Gün	8,69±0,17 a A	8,55±0,23 a A	8,55±0,23 a A	7,48±0,00 a B
	60. Gün	8,26±0,12 b A	8,48±0,37 a A	8,48±0,37 a A	7,17±0,09 a B
	90. Gün	7,02±0,02 c A	7,12±0,08 b A	7,12±0,08 b A	6,40±0,10 b B
LA kaynak: Kontrol (K)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavessiz) (K)
Zaman	3. Gün	7,71±0,03 c B	7,76±0,03 b B	8,46±0,05 b A	3,52±0,04 a C
	14. Gün	9,11±0,07 a A	8,97±0,03 a B	8,92±0,03 a B	5,75±0,04 b C
	30. Gün	8,79±0,07 b A	8,65±0,14 a A	8,82±0,01 a A	6,39±0,07 c B
	60. Gün	7,25±0,03 d B	8,96±0,53 a A	8,36±0,08 b A	6,69±0,03 d B
	90. Gün	7,24±0,04 d B	7,38±0,04 b A	6,90±0,04 c D	7,00±0,00 e C

A,B,C (→) aynı günde kültürler arası istatistiksel fark her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.

a,b,c,d,e (↓) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir (p<0,05).

Propiyonik asit bakteri sayılarının arasında anlamlı bir fark olmaması kullanılan linoleik asit miktarının (10 µg/mL) inhibisyona neden olmadığını kanıtlamaktadır. Linoleik asidin antimikrobiyal etkisi ilave edilecek linoleik asit konsantrasyonunu önemli kılmaktadır.

Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten hazırlanan peynirler incelendiğinde olgunlaşma başında en yüksek toplam PAB sayısının 7,53 log kob/g ile her iki kültürün beraber kullanılarak üretilen peynire (ÇFT), en düşük sayının ise 4,03 log kob/g ile kontrol örneğine (ÇK) ait olduğu görülmüştür. Varyans analizine göre *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (ÇF), her iki kültürün beraber kullanıldığı peynir (ÇFT) ile aynı grupta yer alırken, *P. thoenii* ile yapılan peynir (ÇT) 6,53 log kob/g sayısı ile bu gruptan önemli derecede farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Çörek otunun *P. thoenii* üzerinde içeriğinde bulunan fenolik maddelerden kaynaklı inhibisyon etkisi yapmış olabileceği düşünülmektedir. Çörek otu özellikle sahip olduğu thymoquinone (TQ) nedeniyle yüksek antimikrobiyal etkiye sahiptir (Forouzanfar, Fazly Bazzaz ve Hosseinzadeh, 2014). *P. thoenii* aynı zamanda penisilin, gentamisin, streptomisin, ampisilin, kanamisin, ofloksasin, nitrofurantoin ve rifampisin gibi çeşitli antibiyotiklere karşı diğer PAB grubunda bulunan bakterilere göre daha yüksek duyarlılık gösterdiği bilinmektedir (Önal-Darılmaz, 2010) Olgunlaşmanın 14., 30., ve 60. günlerinde toplam PAB sayısı artma eğilimindeyken olgunlaşmanın sonunda tüm peynir örneklerinde önemli bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Olgunlaşma sonunda linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirlerde olduğu gibi sadece herhangi kültür ilavesi olmayan peynir örneği (ÇK) diğer örneklerden ayrılarak en düşük toplam PAB sayısına (6,40 log kob/g) sahip olmuştur. Kültür ilaveli tüm peynirler (ÇF, ÇT ve ÇFT) aynı grupta yer alarak birbirleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Kontrol sütü çörek otu yağı veya linoleik asit ilavesi olmayan süttür. Bu sütle hazırlanan peynirler incelendiğinde olgunlaşmanın başında bütün peynir örneklerinde toplam PAB sayılarının linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilen yağlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.6.). Bunun nedeni kullanılan kültürlerin yanında peynirin doğal biyotasında bulunan farklı propiyonik asit bakterileri linoleik asidin inhibisyon özelliğinden etkilenmeleridir. Linoleik asidin konsantrasyona bağlı olarak propiyonik asit bakterileri üzerinde inhibe edici özelliği daha önce yapılan çalışmalar kanıtlanmıştır (Jiang vd., 1998). Olgunlaşmanın 14. gününde *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) en yüksek toplam PAB sayısına (9,11 log kob/g) ulaşmıştır. Olgunlaşma boyunca toplam bakteri sayısı değişmekle beraber 14. günde kültür ilaveli bütün peynirlerde (KF, KT ve KFT) en yüksek seviyeye ulaşılmış ve daha sonra azalma eğilimi göstermiştir. Olgunlaşma sonunda örneklerdeki toplam PAB sayısı 6,90 ile 7,38 log kob/g

arasında değişmesine rağmen yapılan varyans analizine göre hepsi farklı grupta yer almıştır.

Olgunlaşma süresinin toplam propiyonik asit bakteri sayısına etkisi tüm örneklerde olgunlaşma boyunca önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca ilave edilen kültür türünün önemli bir etkisi yokken ($p<0,05$) kültür ilave edilmeyen kontrol örneklerine göre anlamlı oranda daha fazla sayıya ulaşmışlardır.

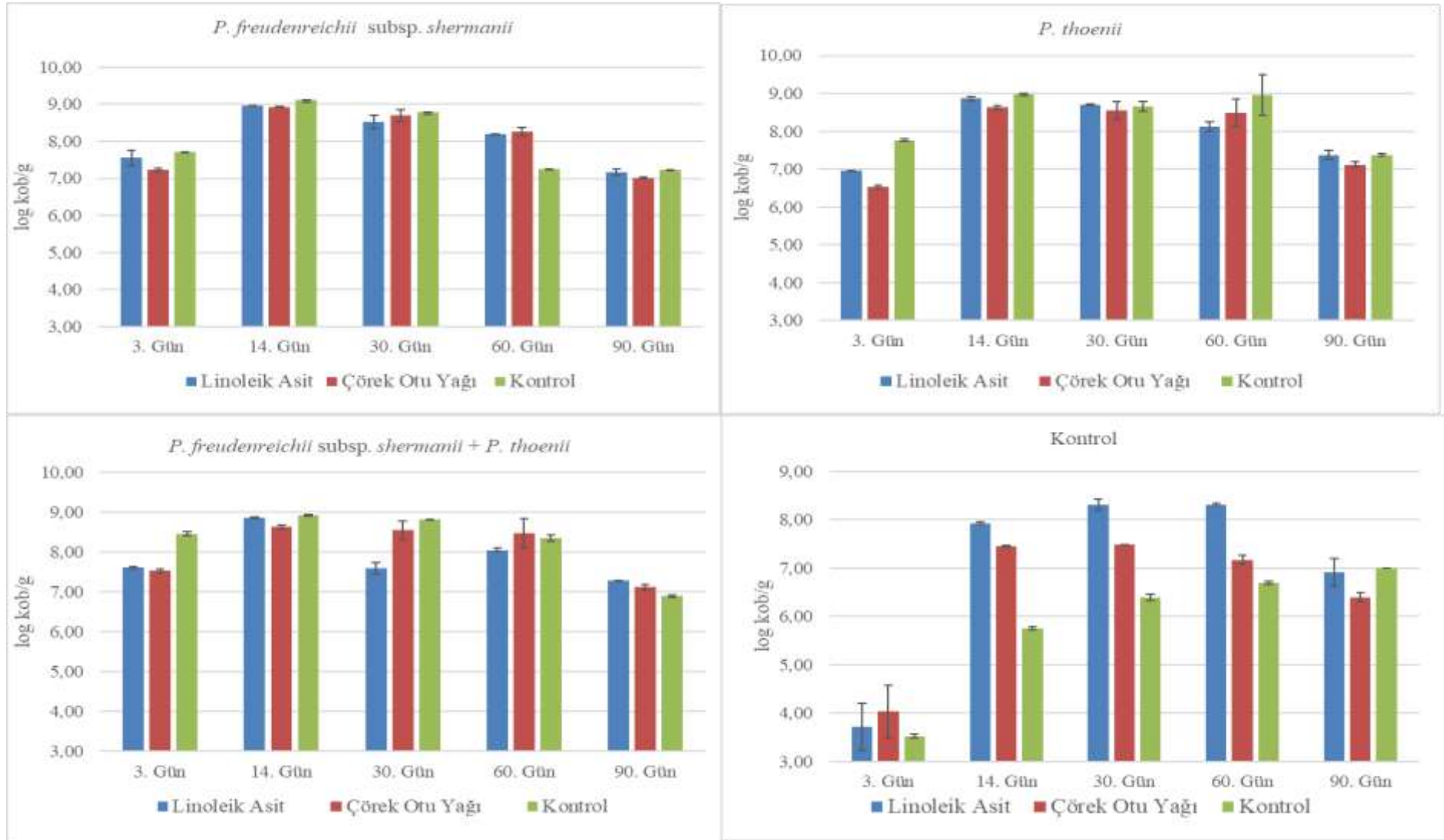
Özer ve Kesenkaş (2019) çalışmalarında farklı starter kültürler kullanarak ürettikleri Mihaliç peynirlerinin toplam propiyonik asit bakteri sayılarını olgunlaşma boyunca incelemiş ve 7,10-7,95 log kob/g arasında değişen değerlerde açıklamışlardır. Bizim çalışmamıza paralel olarak olgunlaşma sonunda toplam propiyonik asit bakteri sayısında azalma ve starter kültür olarak propiyonik asit bakterisi ilave edilen peynirlerde kontrol örneğine göre istatistiksel olarak önemli oranda artış gözlemlenmiştir. Özer ve Kesenkaş'ın çalışmasında PAB sayısı daha kısıtlı bir aralıkta değişmesinin nedeni ilave edilen kültürlerin PAB'ların yanında *Lb. helveticus*, *S. thermophilus* ve *Lb. mesentroides* subsp. *cremoris* gibi farklı türde bakterileri de içerdiğinden kaynaklanıyor olabilir. Açıkça görülmektedir ki PAB ilavesi yapılarak üretilen peynirlerin her iki çalışmada da propiyonik asit bakteri sayısı artmıştır.

Çiğ ve pastörize sütle yapılan Mihaliç peynirlerini inceleyen bir çalışmada, toplam PAB sayısı pastörize süttten yapılan peynir örneklerinde olgunlaşmanın başında ve sonunda sırasıyla $1,2 \times 10^8$ kob/g, $6,6 \times 10^8$ kob/g, çiğ süttten yapılan peynir örneklerinde ise $7,0 \times 10^8$ kob/g ve $2,5 \times 10^8$ kob/g olarak belirlenmiştir (Solak Bulut ve Akın, 2013). Bu çalışmada peynirlere herhangi bir kültür ilavesi olmamasına rağmen bizim çalışmamızda kültür ilaveli yapılan peynirlerin değerlerine yakın bulunmuştur. Herhangi kültür ilavesi olmadan üretilen peynirin (KK) toplam PAB sayısı ise (3,5 log kob/g) önemli derecede Bulut'un çalışmasında bulunan değerlerden daha düşüktür. Buradan anlaşılmaktadır ki çiğ süttün doğal biyotasında bulunan bakteri popülasyonu çok fazla farklılık göstermekte bu da bu süttten elde edilen ürün kalitesini etkilemektedir.

Kullanılan süttün mikrobiyal yükü, işletme biyotası, proses şartları peynirlerin mikrobiyal özelliklerini etkilemektedir (Gürsoy ve Kesenkaş, 2011). Bu nedenle çalışmalar arasında farklar görülmektedir.

Önal-Darılmaz (2010) propiyonik asit bakterilerini izole etmek için gerçekleştirdiği çalışmada farklı peynir örneklerinde toplam PAB sayısını belirlemiştir. Bu peynirlerde en yüksek PAB sayımı Kars Gravyer peynirinde $7,2\pm 0,24$ log kob/g olarak belirlenmiştir. Balıkesir Mihaliç peynirinde ve Mihaliç Kelle peynirinde ise toplam PAB sayısı sırasıyla $5,0\pm 0,27$ ve $3,6\pm 0,24$ log kob/g olarak açıklanmıştır. Mihaliç peynirine belirlenen değerler bizim çalışmamızda belirlenen değerlerden oldukça düşüktür. Düşük PAB sayısının nedeni kullanılan hammadde, proses şartları ve olgunlaştırma koşullarından kaynaklanmış olabilir.

Şen (1991), çiğ süt, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 2 dk ve $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk ısıtım uygulanmış sütler ile hazırlanan Mihaliç peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerini incelemiştir. Bu peynirlerin toplam PAB sayımı olgunlaşma başında ve sonunda sırasıyla çiğ süt ile yapılanda $9,3\times 10^7$, $1,9\times 10^5$ kob/g, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 2 dk ısıtılan sütten yapılan örneklerde $1,2\times 10^7$, $6,4\times 10^4$ kob/g ve $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dk ısıtılan süt ile yapılanlarda $9,2\times 10^2$, $6,4\times 10$ kob/g olarak raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda çiğ sütten yapılan kontrol peynirinin PAB değerlerine benzer sonuçlar bulunmuştur. Pastörizasyon işlemi PAB sayısını etkilemekte ve 2 log seviyesine kadar azalmasına neden olabilmektedir.



Şekil 4.6. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam propiyonik asit bakteri sayımı

4.9.3. Mihaliç Peynirlerinin Olgunlaşma Periyodunda Toplam Laktik Asit Bakteri Sayımı

Laktik asit bakterileri peynirde olgunlaşma süresince gerçekleşen reaksiyonların birçoğundan sorumludur. Mihaliç peynirlerinde laktik asit bakteri sayımı Bölüm 3.4.3’de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.7.’de gösterilmiştir. Olgunlaşma süresinin peynirlerin toplam LAB sayısı üzerinde anlamlı etkisi olduğu yapılan varyans analizi ile gösterilmiştir ($p < 0,05$). Olgunlaşmanın sonuna doğru genel olarak peynirlerin toplam LAB sayısında azalma gözlenmiştir.

Çizelge 4.9. Mihaliç Peynirlerinin olgunlaşma boyunca Toplam Laktik Asit Bakteri sayısı (log kob/g)

LA kaynak: Linoleik Asit (L)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavessiz) (K)
Zaman	3. Gün	8,22±0,02 b AB	8,33±0,10 b A	8,28±0,05 c AB	8,15±0,00 b B
	14. Gün	8,45±0,03 a A	8,41±0,04 b A	8,55±0,10 b A	8,40±0,10 ab A
	30. Gün	8,06±0,02 c B	8,41±0,02 b A	8,74±0,02 a C	8,26±0,19 ab AB
	60. Gün	8,48±0,04 a B	8,56±0,05 a B	7,93±0,06 d A	8,48±0,04 a B
	90. Gün	7,86±0,05 d A	7,91±0,02 c A	6,95±0,01 e A	7,86±0,05 c A
LA kaynak: Çörek Otu Yağı (Ç)					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavessiz) (K)
Zaman	3. Gün	8,35±0,05 ab B	8,29±0,01 a B	8,70±0,16 ab A	7,18±0,03 b C
	14. Gün	8,56±0,06 a AB	8,26±0,00a B	8,87±0,06 a A	7,42±0,38 ab C
	30. Gün	8,26±0,12 b A	8,34±0,19 a A	8,52±0,03 b A	8,10±0,49 a A
	60. Gün	7,93±0,03 c A	7,30±0,00 b C	7,74±0,04 c B	7,94±0,10 ab A
	90. Gün	6,74±0,17 d B	7,15±0,15 b A	7,00±0,00 d AB	7,20±0,20 b A
LA kaynak: Kontrol					
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (Kültür İlavessiz) (K)
Zaman	3. Gün	8,44±0,03 ab A	8,42±0,12 b A	8,15±0,11 ab B	8,57±0,08 ab A
	14. Gün	8,70±0,04 a A	8,68±0,04 a A	8,62±0,03 a A	8,67±0,04 a A
	30. Gün	8,54±0,08 ab AB	8,43±0,03 b B	8,67±0,04 a A	8,51±0,06 ab B

60. Gün	8,34±0,02 b A	8,41±0,00 b A	7,76±0,58 bc A	8,41±0,09 b A
90. Gün	7,23±0,23 c B	7,00±0,00 c B	7,22±0,04 c B	7,83±0,02 c A

A,B,C (→) aynı günde kültürler arası istatistiksel fark her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.

a,b,c,d (↓) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir (p<0,05).

Linoleik asit ilave edilen süttten üretilen peynirlerde olgunlaşmanın başında toplam laktik asit bakteri sayısı 8,15- 8,33 log kob/g arasında değişmektedir. Kültür ilave edilerek hazırlanan peynirlerin (LF, LT ve LFT) toplam LAB sayısı, kontrol olarak hazırlanan kültürsüz peynire (LK) göre önemli oranda daha yüksektir (p<0,05). Toplam LAB sayısı tüm peynir örnekleri için birbirine çok yakın olmakla beraber varyans analizine göre *P. thoenii* ile yapılan peynirin (LT) bakteri sayısı 8,33 log kob/g ile en yüksektir. Olgunlaşma boyunca peynirlerin toplam LAB sayısı arasında farklılıklar olsa da olgunlaşma sonunda tüm peynirlerin toplam LAB sayısı önemli oranda azalmıştır (p<0,05). Peynir prosesinde kullanılan laktik asit bakterilerinin otolizi peynirin olgunlaşması için gerekli proteoliz reaksiyonları için çok önemlidir. Peynirde istenen tat aroma gibi kalite özelliklerinin oluşması bu reaksiyonlara bağlıdır (Üçüncü, 2004). Olgunlaşma sonunda tüm peynir örnekleri varyans analizine göre aynı grupta yer almış ve peynir örnekleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmemiştir (p>0,05).

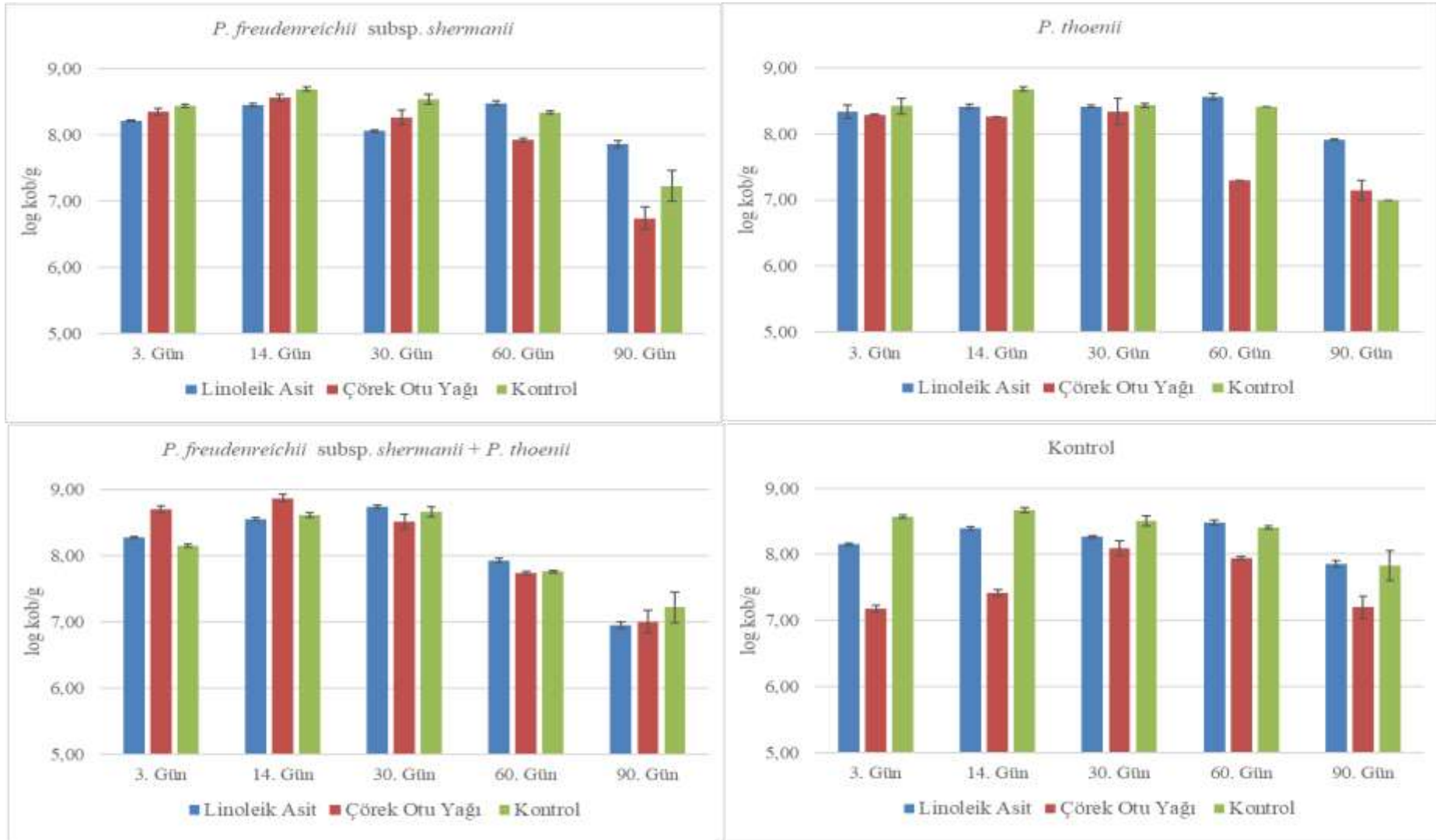
Çörek otu yağı ilave edilmiş süt ile hazırlanan peynir örneklerinde en yüksek toplam LAB sayısı olgunlaşma başında 8,70 log kob/g ile her iki kültürün beraber kullanıldığı örneğe (ÇFT) aittir. Kültürlerin tek tek kullanıldığı örnekler (ÇF ve ÇT) 8,35- 8,29 log kob/g toplam LAB sayısı ile aynı grupta yer alırken kontrol örneği (ÇK) 7,18 log kob/g değeri ile en düşük değere sahiptir. Çörek otu yağında bulunan fenolik maddeler bu bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki göstermiş olabilir. Olgunlaşma boyunca kontrol örneğinde toplam LAB sayısı en çok 8,10 log kob/g olarak 30. günde belirlenmiş ve daha sonra azalma eğilimi göstermiştir. Olgunlaşmanın 30. gününde örnekler arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (p>0,05). Fakat olgunlaşmanın sonunda *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (ÇF) 6,74 log kob/g değeri ile en düşük bakteri sayımına sahiptir. *P. thoenii* ile yapılan (ÇT) ve kontrol (ÇK) örnekleri ise sırasıyla 7,15 ve 7,20 log kob/g değerleri ile istatistiksel olarak önemli oranda diğerlerinden ayrılmışlardır (p<0,05).

Kontrol sütü ile yapılan örnekler incelendiğinde olgunlaşmanın başında toplam laktik asit bakteri sayısı her iki kültürün beraber kullanıldığı ve çörek otu yağı ilave edilmiş peynir örneği (ÇFT) hariç tüm örneklerde diğer sütler ile yapılanlardan daha yüksektir

(Şekil 4.7.). Hem linoleik asidin hem de çörek otu yağının peynirde bulunan laktik asit bakterileri üzerinde inhibisyona neden olduğu sonucuna varılabilir. Olgunlaşmanın başında tüm örneklerdeki toplam laktik asit bakteri sayısı çok yakın olmakla beraber her iki kültürün beraber kullanıldığı peynir örneği (KFT) 8,15 log kob/g değeri ile varyans analizine göre diğer örneklerden anlamlı olarak farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Diğer örneklerde olduğu gibi otoliz kaynaklı olgunlaşmanın sonuna doğru toplam LAB sayısı, kontrol sütü ile yapılan tüm örneklerde azalmıştır. En düşük toplam LAB sayımı 7,00 log kob/g ile *P. thoenii* ile yapılan örneğe (KT) aittir. Kültür ilave edilmeden yapılan peynir örneği (KK) 7,83 log kob/g toplam laktik asit sayısı ile olgunlaşmanın sonunda diğer örneklerden anlamlı şekilde ayrılmıştır ($p<0,05$).

Mihaliç peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerinin incelendiği diğer çalışmalarda Bulut (2006) toplam mezofilik laktik asit bakteri sayısını pastörize süttten yapılan peynirlerde $9,3 \times 10^6$ - $4,6 \times 10^7$ kob/g, çiğ süttten yapılan peynirlerde $1,2 \times 10^8$ - $8,6 \times 10^7$ kob/g arasında belirlemiştir. Kamber (2008) araştırmasında mihaliç peynirlerinin laktik asit bakteri sayısını $1,9 \times 10^6$ - $4,7 \times 10^3$ kob/g olarak raporlamıştır. Gölge (2009) starter kültür ilavesi ile hazırladığı kelle peynirlerinde olgunlaşmanın başında ve sonunda çiğ süttten geleneksel yöntemlerle yapılan 8,61-6,00, pastörize süttten starter kültür ilavesi olanlar ise 6,53-4,98 ve 6,36-4,85 log kob/g arasında laktik asit bakterisi belirlemiştir. Önal-Darılmaz (2010) içinde Mihaliç peynirinde bulunduğu farklı peynir türlerini incelediği araştırmasında LAB sayısını Balıkesir Mihaliç peynirinde 8,7 log kob/g, Mihaliç Kelle peynirinde 7,7 log kob/g olarak bildirmiştir. Bizim çalışmamızda bulunan değerler ile bahsedilen çalışmalar arası farklılıklar kullanılan ham maddeden, uygulanan üretim metotlarından ve starter kültür ilavesi olup olmamasından kaynaklanabilmektedir.

Peynirlerin mikrobiyotası peynir için kullanılan süttün mikrobiyotasından, üretim sırasında ortamdaki kaynaklanan kontaminasyondan ve olgunlaşma süresince gerçekleşen mikrobiyal faaliyetlerden etkilenmektedir. Mikrobiyotada bulunan mikroorganizmaların etkileşimi peynirin kalite özelliklerinin gerçekleşmesinde etkin rol almaktadır. Olgunlaşma süresince bu etkileşim peynirlerin farklı farklı özelliklere sahip olmasına neden olmaktadır.



Şekil 4.7. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam laktik asit bakteri sayımı

4.10. Mihaliç Peyniri Fizikokimyasal Analizleri

4.10.1. Titrasyon Asitliği ve pH Değerleri

Peynirin en önemli kimyasal özelliklerinden biri, pıhtılaşmadan olgunlaşmaya kadar prosesin tüm aşamalarında aroma, tat ve tekstür oluşumunu etkilediği için asitlik düzeyidir. Bu çalışma kapsamında üretilen peynirlerin asitlik düzeyleri bölüm 3.5.1’de açıklandığı gibi titrasyon asitliği ile laktik asit cinsinden hesaplanmıştır. Ayrıca olgunlaşma periyodunda gerçekleşen fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişimlerde önemli bir parametre olan pH değeri de bölüm 3.5.2’de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve tek yönlü varyans analiz sonuçları ile 90 günlük olgunlaşma süresindeki değişimleri Çizelge 4.10’da gösterilmiştir. Peynirlerin titrasyon asitliği değerleri %0,85-2,12 arasında değişmekle beraber bütün peynir örneklerinde en yüksek asitlik olgunlaşma periyodunun sonunda (90.gün) gözlemlenmiştir. En yüksek asitlik kontrol sütünden *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii*’nin beraber katılarak üretildiği peynirde %2,12 olarak belirlenmiştir.

Linoleik asit ilave edilen süttten yapılan peynirler dikkate alındığında genel eğilim olgunlaşmanın 30. ve 90. gününde yükselen asitlik seviyesi olarak gözlemlenmiş sadece *P. thoenii* ilave edilerek yapılan peynirde (LT) 14. günde anlamlı oranda yükselirken 60. günde önemli derecede azalmıştır ($p<0,05$). Bu azalmanın nedeni proteolitik enzimlerin proteinleri hidrolizi sonucu ortaya çıkan amonyak gibi bazik özellikli bazı bileşiklerin oluşan asitliği nötrlemesi olabilir (Dağdemir, 2001). Olgunlaşma periyodunun sonunda kültürler arası farklılığı değerlendirmek için yapılan varyans analizine göre sadece *P. thoenii* ile yapılan peynirin (LT) titrasyon asitliği (%1,35) anlamlı olarak diğerlerinden farklıdır ($p<0,05$). Sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile (LF) ve iki kültürün beraber kullanıldığı (LFT) peynirler herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan kontrol peynirinden (LK) önemli derecede farklılık göstermemiştir ($p>0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilen sütle yapılan peynirlerde de en yüksek asitlik değerleri olgunlaşma periyodunun sonunda gözlemlenmiştir. Üçüncü (3.) ve 14. günde düşük olan asitlik seviyesi 30. günde önemli derecede artmış fakat 60. günde ise düşüş göstermiştir. Süte ilave edilen çörek otu yağı peynirde bulunan diğer mikroorganizma faaliyetlerini etkilemiş ve asitlik gelişiminde farklılıklara neden olmuş olabilir (Bulut, 2006).

Olgunlaşma periyodunun sonunda ise farklı kültürlerle yapılan peynirler arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$).

Çizelge 4.10. Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma süresince titrasyon asitliği (%Laktik asit) ve pH değişimleri

LA kaynak	Kültür türü	%Laktik Asit				
		3. Gün	14. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
Linoleik asit (L)	F	1,79±0,09a	1,67±0,05a	1,43±0,18b	1,17±0,05c	1,52±0,08Ab
	T	1,21±0,14bc	1,65±0,05a	1,12±0,05c	0,85±0,13d	1,35±0,09Bb
	F+T	1,21±0,04b	1,44±0,09b	1,93±0,14a	1,25±0,17b	1,75±0,14Aa
	K	1,25±0,09b	1,25±0,09b	1,84±0,04a	1,92±0,05a	1,75±0,13Aa
Çörek otu yağı (Ç)	F	1,70±0,09b	1,39±0,13c	1,89±0,09a	1,52±0,06c	1,93±0,05Aa
	T	1,04±0,05c	0,94±0,13c	1,92±0,04a	1,48±0,08b	1,98±0,09Aa
	F+T	1,17±0,09c	1,44±0,09c	1,79±0,09b	1,25±0,10c	1,97±0,09Aa
	K	1,08±0,09c	1,03±0,05c	1,84±0,14a	1,54±0,02b	1,92±0,09Aa
Kontrol (K)	F	1,12±0,05b	2,01±0,05a	1,93±0,04a	1,18±0,08b	1,82±0,11BCa
	T	1,34±0,26b	1,21±0,31b	1,44±0,00b	1,05±0,0c	2,02±0,13ABa
	F+T	1,57±0,04b	0,85±0,13d	1,57±0,05b	1,20±0,07c	2,12±0,12Aa
	K	1,92±0,13a	0,99±0,18b	1,80±0,09a	1,08±0,09b	1,71±0,09Ca
pH değerleri						
Linoleik asit (L)	F	5,73±0,02a	5,55±0,03c	5,73±0,01a	5,61±0,01b	5,52±0,01Ac
	T	5,72±0,01a	5,51±0,01b	5,67±0,04a	5,45±0,04b	5,36±0,02Bc
	F+T	5,60±0,01b	5,48±0,03c	5,64±0,01a	5,60±0,01b	5,38±0,02Bd
	K	5,67±0,01a	5,55±0,03c	5,60±0,01b	5,46±0,01d	5,38±0,02Be
Çörek otu yağı (Ç)	F	5,64±0,01a	5,47±0,02b	5,56±0,01a	5,48±0,03b	5,31±0,02Cc
	T	5,67±0,01a	5,38±0,02c	5,62±0,01b	5,69±0,02a	5,37±0,02ABc
	F+T	5,77±0,01a	5,57±0,01b	5,78±0,01a	5,54±0,01c	5,34±0,02BCd
	K	5,82±0,01a	5,56±0,03c	5,70±0,02b	5,69±0,01b	5,39±0,02Ad
Kontrol (K)	F	5,77±0,01a	5,67±0,03b	5,69±0,01b	5,32±0,03c	5,36±0,05Bc
	T	5,78±0,01a	5,49±0,02b	5,77±0,01a	5,57±0,04b	5,45±0,03Ab
	F+T	5,80±0,01a	5,57±0,03c	5,67±0,01b	5,62±0,03bc	5,45±0,03Ad
	K	5,64±0,01b	5,59±0,02c	5,69±0,02a	5,56±0,01c	5,47±0,02Ad

a,b,c,d,e (→) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

A,B,C(↓) aynı sütunda kültürler arası farkı göstermektedir ($p<0,05$)

F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, FT: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

Kontrol sütü ile yapılan peynirlerde ise benzer bir laktik asidi profili gözlemlenmiştir. Fakat kontrol sütü ile yapılan ve herhangi bir kültür ilavesi olmayan peynir rneğinde (KK) olgunlaşmanın başında %1,92 olarak belirlenen asitlik seviyesi hem süte ilave edilen linoleik asit kaynaklarının hem de kültürlerin sütün doğal mikrobiyotasında bulunan asit üretebilen mikroorganizmaları etkilediğini göstermektedir. Olgunlaşma periyodunda ise 60. günde asitlik düzeyi anlamlı oranda farklı olsa da 90. gün sonunda yapılan analizlere göre en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Titrasyon asitliğinde gözlenen bu artışın sebebi ise lipoliz sonucu açığa çıkan serbest yağ asitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (ağlar, 1990). Kültürler arası farklılık olgunlaşma sonunda değerlendirilmiş ve kontrol sütü ile yapılan peynirlerden iki kültürün beraber kullanıldığı (KFT) ve sadece *P. thoenii*'nin kullanıldığı (KT) peynirler diğerlerinden önemli derecede yüksek oranda asitlik seviyesine sahiptir. Sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirin (KF) asitliği ise hem sadece *P. thoenii* ile yapılan (KT) hem de hiç kültür ilave edilmeden yapılan peynirden (KK) anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$).

Peynirlerin pH değerlerini incelediğimizde (izelge 4.10.) 5,31 ile 5,82 arasında değiştiğini görüyoruz. Olgunlaşma periyodunun sonunda en düşük pH değeri çörek otu yağı ilave edilmiş sütten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (F) (5,31), en yüksek pH (5,82) ise yine çörek otu yağı ilave edilmiş sütten herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan peynir (K) rneğine aittir.

Linoleik asit ilave edilen sütten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirin (LF) olgunlaşma başında pH'sı 5,73 iken, olgunlaşma sonunda önemli derecede azalmış ve 5,52 olmuştur ($p<0,05$). Benzer azalma *P. thoenii* ile yapılan peynirde (LT) de gözlenmiştir. İki kültürün beraber kullanıldığı peynirde (LFT) başlangıç pH'sı diğerlerinden anlamlı derecede farklı ve yine olgunlaşma sonunda düşme eğilimindedir ($p<0,05$). Olgunlaşma periyodunun sonunda kontrol olarak yapılan kültür ilavesiz peynir (LK) ile iki kültürün beraber kullanıldığı (LFT) ve *P. thoenii*'nin tek başına kullanıldığı (LT) peynirlerde istatistiki bir farklılık yokken ($p>0,05$) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*'nin tek başına kullanıldığı peynirin (LF) pH'sı anlamlı olarak farklılık göstermiştir ($p<0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilmiş sütler ile yapılan peynirlerde en düşük pH (5,31) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (F) olgunlaşma sonunda

belirlenmiştir. Çörek otu yağı ilave edilerek yapılan bütün peynirlerde pH değeri olgunlaşma süresince düşme eğilimi göstermiştir. Olgunlaşma sonunda ise herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan peynir (ÇK) diğerlerinden istatistiki olarak önemli derecede farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Sadece *P. thoenii* (ÇT) ve her iki kültürün beraber kullanıldığı (ÇFT) peynirlerde ise önemli bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Kontrol sütü ile yapılan peynirlerde ise aynı eğilim gözlenmiş, pH olgunlaşmanın 90. gününde en düşük seviyeye ulaşmıştır. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) olgunlaşma sonunda istatistiki olarak diğerlerinden farklılık göstererek ($p<0,05$) ve en düşük pH değerine (5,36) sahip olmuştur. Peynir örneklerinin pH değerlerindeki değişim titrasyon asitliği %laktik asit değerleriyle paralellik göstermiştir.

Şen (1991) çiğ ve pastörize süttten üretilen Mihaliç peynirlerini incelediğinde pH değerlerinin 4,35-6,55 arasında değiştiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada 90 günlük olgunlaşma sonucunda Mihaliç peynirlerinin pH değerleri 5,4-6,11 arasında bildirilmiştir (Öner ve Aloglu, 2004). Gölge (2009) ise doktora çalışmasında incelediği kelle peynirlerinin pH'sını 5,28-6,11 aralığında belirlemiştir. Bu çalışmada belirlenen pH değerleri ile yukarda bahsedilen çalışmaların sonuçları benzerlik göstermektedir.

4.10.2. Kurumadde İçerikleri

Peynirlerde nem dışında bulunan peynirin içeriğini oluşturan tüm besinsel bileşenler kuru madde olarak adlandırılır ve peynirin kalitesini gösteren önemli parametrelerden biridir. Çalışma kapsamında üretilen peynirlerin kuru madde oranları olgunlaşma periyodu boyunca 3, 14, 30, 60 ve 90. günlerde değerlendirilmiş tüm analizler bölüm 3.5.3'te belirtildiği gibi paraleli yapılmıştır. Peynirlerin kuru madde miktarları olgunlaşma süresince zamana bağlı olarak Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Peynirlerin kuru madde oranları %55,4- 66,3 arasında değişmektedir. Örnekler arasında en yüksek kuru madde oranı olgunlaşma sonunda %66,3 ile linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmemiş sütle ve iki kültürün beraber kullanımı ile yapılan peynirdir (KFT). Peynirlerin kuru madde oranları olgunlaşma süresince artma eğilimindedir. 90 gün süren olgunlaşma periyodu bütün örneklerin kuru madde oranlarını anlamlı miktarda arttırmıştır ($p<0,05$). Mihaliç peyniri salamurada olgunlaştırılan bir peynir olduğu için olgunlaşma süresince gerçekleşen tuz-su alışverişi nedeniyle kuru madde oranları değişiklik gösterebilmektedir.

Çalışma kapsamında üretilen 12 adet peynirin kuru madde oranlarının olgunlaşma boyunca elde edilen değerlerin ortalaması alınarak varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre kültür türleri ve süte ilave edilen linoleik asit kaynağı arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Kültür türü x LA kaynağı arasındaki interaksiyon ise istatistiki olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Varyans analizinde önemli bulunan sonuçlar Tukey karşılaştırma testi ile değerlendirilmiş ve Çizelge 4.11 de gösterilmiştir. Olgunlaşma boyunca elde edilen kuru madde oranlarının ortalamaları ise Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince Kurumadde değişimi

LA kaynağı	Kültür türü	% Kuru Madde				
		3. Gün	14. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
Linoleik asit (L)	F	61,4±0,9Ab	60,2±1,7Bb	56,1±0,5Cc	62,9±1,6Aab	63,7±1,1ABa
	T	57,1±0,2Cc	60,9±1,6ABab	61,5±1,5ABb	60,4±0,9ABb	62,2±0,8Ba
	F+T	58,6±1,0Bc	62,0±1,4ABab	59,6±0,4Bc	61,3±0,1Ab	62,9±0,1Ba
	K	58,9±0,6Bc	62,4±0,3Ab	64,3±2,5Aab	61,3±1,9ABbc	65,1±0,8Aa
Çörek otu yağı (Ç)	F	59,3±0,2Bc	61,1±0,9Bbc	61,7±0,6ABa	62,7±0,8Aa	62,6±1,4ABab
	T	61,9±0,1Ac	63,7±0,1Aa	61,6±0,7Aa	62,0±0,4Abc	62,9±0,5Bb
	F+T	61,0±0,7Ab	60,6±0,8Bb	61,7±1,3ABb	57,1±0,1Cc	64,4±0,5Aa
	K	62,1±0,9Aa	64,3±1,6Aa	59,8±0,7Bb	59,9±0,5Bb	63,4±0,1Ba
Kontrol (K)	F	55,4±1,1Bc	59,0±0,8Bb	62,7 ±0,6Aa	60,7±1,8ABab	62,2±0,0Ba
	T	60,9±0,9Ab	64,9±1,1Aa	58,7±0,7Bc	62,1±0,1Aa	65,8±4,3ABa
	F+T	58,8±1,8Ac	59,9±1,9Bbc	63,8±1,2Aab	62,1±1,0ABb	66,3±2,0Aa
	K	60,1±2,6Ab	61,6±0,8Bb	59,2±1,2Bb	60,4±0,8Bb	64,2±1,0Aa

A,B,C (↓)aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.

a,b,c (→)aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, F+T: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

Linoleik asit ilave edilerek yapılan peynirlerde Çizelge 4.12’de görüldüğü üzere kültürler arası anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynir örneğinin kuru madde miktarı, çörek otu yağı ilaveli süttten hazırlananda (ÇF) en yüksek orandayken, diğer sütler ile yapılan peynirlerin kuru madde oranlarından önemli derecede farklılık göstermemiştir. ($p>0,05$). Linoleik asit ilave edilmiş sütle kültür ilavesi olmadan üretilen peynir (LK) en yüksek ortalama kuru madde oranına (%62,4) sahip iken *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına (LF) ve *P. thoenii* ile berber kullanılarak (LFT) üretilen peynirlerin kuru madde oranlarından istatistiki olarak anlamlı derecede farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). *P. thoenii* ile yapılan peynirde (LT) ise en düşük ortalama kuru madde oranı (%60,4) belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültür türüne ve süte ilave edilen linoleik asit kaynağına göre olgunlaşma boyunca ortalama kuru madde oranları.

Kültür	Linoleik asit (L)	Çörek otu Yağı (Ç)	Kontrol (K)
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	60,9±2,9ABa	61,5±1,8ABa	59,9±2,99Aa
<i>P. thoenii</i> (T)	60,4±0,9Bb	62,4±1,7Aa	62,5±2,62Aa
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	60,8±1,8ABb	61,0±0,7Ba	62,2± 3,2Aab
Kontrol (K)	62,4±1,2Aa	61,9±2,4Aa	61,1±2,1Aa

A,B, (↓)aynı sütunda kültürler arası istatistiksel farkı göstermektedir($p<0,05$).

a,b (→)aynı satırda linoleik asit kaynakları arasındaki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilerek üretilen peynirlerde *P. thoenii* ile yapıla peynirin (ÇT) kuru maddesi %62,4 değeriyle en yüksek iken, iki kültürün beraber kullanıldığı (ÇFT) peynir en düşük kuru madde oranına (%61) sahiptir. Bu peynir haricinde kalan peynir örneklerinin (ÇF, ÇT ve ÇK) kuru maddeleri %61,5-62,4 arasında değişmekte ve aralarında anlamlı bir fark belirlenememiştir ($p>0,05$).

Kontrol sütü olarak kullanılan linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmayan sütle üretilen peynirlerin kullanılan kültür türüne bağlı olarak kurumadde oranları %59,9-62,5 arasında değişmekte ve aralarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$).

Mihaliç peynirleriyle yapılan daha önceki çalışmalarda gözlemlenen kuru madde oranları ile bu çalışmada belirlenenler değerler paralellik göstermiştir. Şen (1991) ve Bulut (2006) çalışmalarında inceledikleri Mihaliç peynirlerinin kuru madde oranlarını sırasıyla (%63-68) ve (%62-68) olarak bildirmişlerdir. Laktik asit bakterileri ilave edilerek ve farklı haşlama sıcaklıklarının test edildiği başka bir çalışmada ise üretilen peynirlerin kuru madde oranları %54,6-58,7 arasında değişmektedirlerdir. Bu çalışmada elde edilen oranlardan daha düşük olmasının nedeni kullanılan çiğ sütün özelliklerinden, uygulanan üretim şekline ve ayrıca test edilen starter kültürlerinin etkisinden kaynaklanabilmektedir (Özer, 2015).

4.10.3. Yağ Oranları

Peynir kalitesinde yağ oranı önemli bir parametre olarak yer almaktadır. Peynirdeki yağ oranı peynirin hem tadını hem de besin değerini etkilemektedir. Bu çalışmada Mihaliç peynirlerinin yağ oranları bölüm 3.5.4.'te belirtildiği gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.13'te gösterilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi %25,1-34,1 arasında değişmektedir. Olgunlaşma süresi boyunca yağ oranlarında değişim olmakla beraber olgunlaşma periyodunun yağ oranlarına etkisi anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Linoleik asit ilave edilmiş süttten hazırlanan peynir örneklerinde olgunlaşma periyodunun sonunda en yüksek yağ oranı (%34) herhangi bir kültür ilavesi yapılmadan üretilen peynirde (LK) gözlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) ise olgunlaşmanın 90. gününde %28 yağ oranı ile en düşük orana sahiptir. Fakat bu peynirin olgunlaşma başı ve sonu arasında anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Olgunlaşma süresince kuru madde oranındaki değişimlerden kaynaklanan yağ oranında değişimler gözlenmiştir. *P. thoenii*'nin kullanıldığı peynirde (LT) ise olgunlaşmanın başında yağ oranı %25 iken 90. günün sonunda önemli oranda değişmiş ve %30'a ulaşmıştır ($p<0,05$). Her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirin (LFT) olgunlaşmanın 3. günü ve 90. günü arasında ise anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$).

Çizelge 4.13. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince %Yağ Oranları

LA kaynağı	Kültür türü	%Yağ				
		3. Gün	14. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
Linoleik asit (L)	F	29,8±2,3ab	28,5±0,5ab	26±1,0b	30,5±1,5a	28±2,0abB
	T	25±1,0b	31±1,0a	31±1,0a	26,5±0,5b	30±2,0aB
	F+T	28,5±0,5b	31,5±1,5a	29±1,0ab	30,5±0,5ab	31±1,0abB
	K	27,5±2,5b	31±1,0ab	34±1,0a	30,5±0,5ab	34±1,0aA
Çörek otu yağı (Ç)	F	27,5±0,5a	28±1,0a	28,5±1,0a	29±1,0a	27,5±0,5aC
	T	28,5±0,5b	31,5±0,5a	31±1,0a	32±1,0a	30,5±0,5aB
	F+T	29±1,0ab	28±2,0ab	31,5±1,5a	25,5±0,5b	31,5±1,5aAB
	K	29±0,0ab	32,5±2,5a	29±1,0ab	27±1,0b	31,5±0,5aA
Kontrol (K)	F	28,5±0,5a	28,5±1,5a	27±1,0a	29,5±0,5a	31±3,0aA
	T	30±0,0b	33,8±1,3a	26,5±0,5c	30±1,0b	33±2,0abA
	F+T	27,5±2,5c	29±2,0bc	33±1,0ab	31,5±1,5abc	34±1,0aA
	K	28,75±1,25a	30±2,0a	28,5±0,5a	29±3,0a	31,5±1,5aA

A,B,C (↓) aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.

a,b,c (→) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

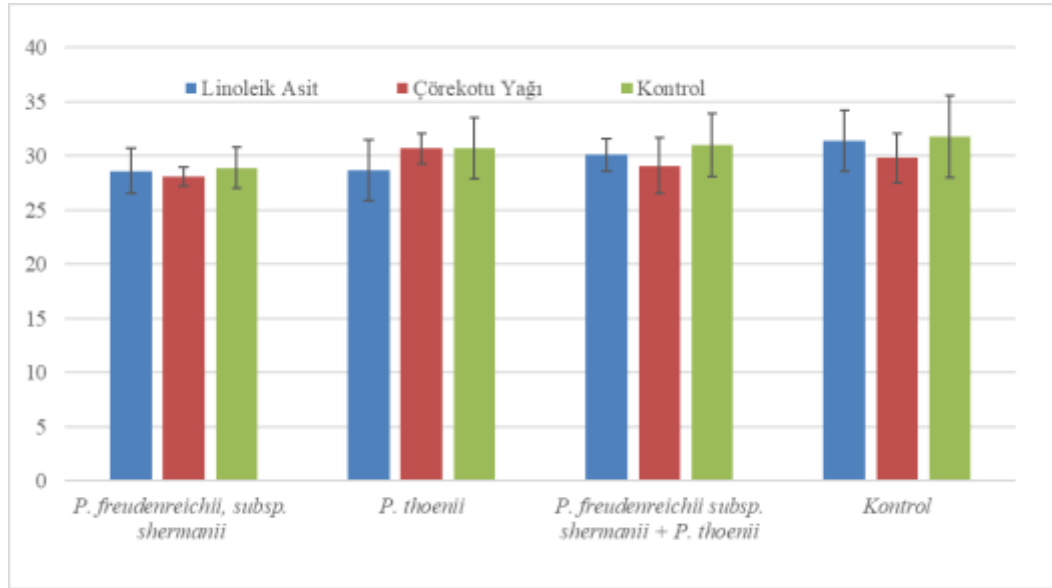
F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, F+T: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

Çörek otu yağı ilave edilen sütlerden yapılan peynirlerde en yüksek yağ oranı %32,5 olarak olgunlaşmanın 14. gününde, herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan örnekte (ÇK) belirlenirken, en düşük oran %25,5 olarak her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirde (ÇFT) gözlenmiştir. *P. thoenii* ile yapılan peynir (ÇT) haricinde bütün peynirlerde olgunlaşmanın başında ve sonunda yağ oranlarında anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). *P. thoenii* ile yapılan peynir (ÇT) ise olgunlaşmanın 3. gününde %28,5 yağ oranına sahipken olgunlaşmanın 90. gününde %30,5 değerine yükselmiştir. İki değer arasındaki fark istatistiki olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Kontrol sütünden *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P.thoenii*'nin beraber kullanılarak üretildiği peynirde (KFT) yağ oranı olgunlaşmanın 90. gününde en yüksek

değerde (%34) belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 3. gününde ise bu peynir örneğinde yağ oranı %27,5 olarak belirlenmiştir. Bu peynir (KFT) örneği için olgunlaşma süresinin yağ oranına etkisi önemli olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu sütte hazırlanan diğer üç peynirde (KF, KT ve KK) de olgunlaşmanın başında ve sonunda yağ oranlarında önemli derecede fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Peynirlerin yağ oranlarındaki değişim kuru madde oranlarındaki değişime paralellik göstermiştir. Süte ilave edilen saf linoleik asit ve çörek otu yağı peynirlerin yağ oranını istatistiki olarak anlamlı etkilememiştir ($p > 0,05$). Fakat sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirler (LF, ÇF ve KF) Şekil 4.8.'de görüldüğü üzere her süt örneği için önemli derecede daha düşük yağ oranına sahiptir. Düşük yağ oranının nedeni kullanılan sütün kuru madde miktarlarındaki değişimden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca peynir üretim prosesi esnasında proteazların aktivitesi sonucunda kazein yapısının parçalanması, teleminin haşlanması ve depolanması sırasındaki kayıplar nedeniyle yağ kaybı gözlenebilmektedir (Çağlar, 1990).



Şekil 4.8. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültürlere göre ortalama %yağ oranları

Bu araştırma kapsamında üretilen peynir örneklerinin yağ oranları daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında Özer (2015) %21,50-23,25, Öner ve Aloğlu (2004) %21,50-24,00, Özcan (2000) %22,57-24,57 arasında bulunduğu ortalama yağ değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum kullanılan hammadde çiğ sütün

farklılığından, uygulanan üretim yönteminden ve depolama koşullarının farklılığından kaynaklanabilmektedir.

Aday (2010) 15 farklı Mihaliç peynirini incelediği çalışmasında yağ oranlarını %25-33 arasında Bulut (2006) ise çiğ ve pastörize süt ile yapılan Mihaliç peynirlerinin yağ oranlarını %27-31 arasında belirlemiştir. Marmara bölgesinde bulunan peynirleri inceleyen başka bir çalışmada ise Mihaliç peynirinin yağ oranları %23,75-30,65 arasında değiştiği raporlanmıştır (Kamber, 2008). Bu değerler, bu çalışmada belirlenen değerler ile paralellik göstermektedir.

Olgunlaşma süresince peynir örneklerinin kuru madde oranlarındaki değişimler diğer bileşenlerin oranlarını da etkilemiştir. Yağ oranları önemli derecede değişmemekle beraber olgunlaşma periyotlarında farklılıklar göstermişlerdir.

4.10.4. Protein Oranları

Peynirin kuru maddesini oluşturan en önemli bileşenlerinde biri de proteindir. Bu araştırma kapsamında üretilen peynirlerin protein oranları bölüm 3.5.5.'te açıklandığı gibi yapılmıştır. Peynirlerin olgunlaşma süresince protein oranlarındaki değişim Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Peynirlerin olgunlaşmanın başındaki protein oranları %21,39-23,76 arasında değişirken, olgunlaşmanın 90. gününde %18,18-20,29 arasında değişmektedir. Olgunlaşma süresince en yüksek protein oranı (%23,76) herhangi bir linoleik asit ilavesi yapılmayan ve sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) örneğinde gözlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca protein oranlarında istatistiki olarak önemli derecede değişim gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Linoleik asit ilave edilmiş süttten hazırlanan peynir örneklerinde olgunlaşma periyodunun sonunda en düşük protein oranı (%18,76) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir örneğinde (LF) belirlenmiştir. Fakat kültürler arası farklılığı değerlendirmek için uygulanan varyans analizine göre linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirler arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. ($p > 0,05$). Aynı peynirler için (*P. thoenii* ile yapılan hariç) olgunlaşmanın başı ve sonunda ki protein içerikleri değerlendirildiğinde protein oranı 14. günde azalmaya başlamış ve 60. günde en düşük seviye ulaşmıştır. Protein oranı olgunlaşmanın başı ile sonu arasında önemli

derecede azalmıştır ($p<0,05$). Fakat olgunlaşmanın 30. 60. ve 90. günleri arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.

Çizelge 4.14. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince % Protein Oranları

LA kaynağı	Kültür türü	% Protein				
		3. Gün	14. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
Linoleik asit (L)	F	21,39±1,70a	20,16±1,38ab	18,99±1,08ab	17,67±0,28b	18,76±0,74ab
	T	22,63±0,74a	19,99±1,10ab	19,89±1,77ab	19,78±1,00ab	19,50±0,83b
	F+T	21,78±1,70a	21,63±1,53a	20,14±0,64ab	18,40±0,64b	19,99±0,39ab
	K	22,73±2,46a	21,31±1,76ab	19,54±0,71ab	18,01±0,49b	19,10±0,52ab
Çörek otu yağı (Ç)	F	21,67±0,43a	20,82±1,06a	20,67±1,79a	20,08±0,58a	20,29±0,53a
	T	23,57±2,47a	21,07±2,12ab	19,72±0,89ab	17,99±0,98b	19,08±0,71b
	F+T	21,73±1,46a	20,35±1,99a	18,97±1,31a	18,78±1,15a	19,61±0,81a
	K	22,75±0,25a	21,98±0,75a	19,18±0,24b	18,88±0,71b	20,10±0,85b
Kontrol (K)	F	23,76±1,61a	20,88±1,39ab	20,61±0,59ab	18,40±0,64b	18,18±1,28b
	T	22,65±0,83a	21,10±1,06ab	19,40±0,93bc	18,52±0,21c	19,12±0,43bc
	F+T	22,93±2,01a	21,73±2,32a	20,86±1,12a	19,78±0,79a	19,93±1,32a
	K	22,91±2,23a	21,61±1,76a	19,65±1,60a	19,01±0,72a	19,52±0,67a

a,b,c (→)aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p<0,05$)

F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, F+T: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

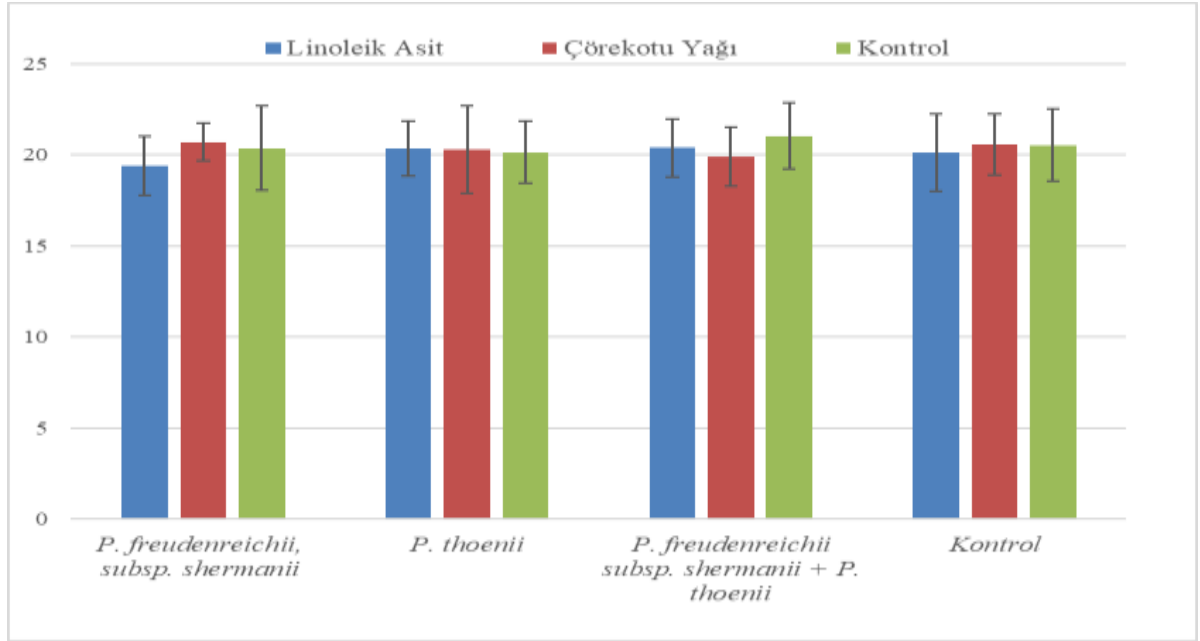
Çörek otu yağı ilave edilen süttten hazırlanan peynir örneklerinin protein içerikleri %23,57-17,99 arasında değişmektedir. Olgunlaşma süresince *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan (ÇF) ve her iki kültürün beraber kullanıldığı (ÇFT) peynir örneklerinde protein oranlarında azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Kontrol örneğinde (ÇK) ve *P. thoenii* ile yapılan örnekte (ÇT) ise olgunlaşmanın 3. günü ve 90. günü arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark vardır ($p<0,05$). Herhangi kültür ilavesi yapılmadan kontrol olarak üretilen peynirde (ÇK) protein içeriği olgunlaşmanın 30. gününde önemli oranda azalmıştır. *P. thoenii* ile yapılan örnekte (ÇT) ise olgunlaşmanın 60. gününde azalma gözlenmiştir.

Süte linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmadan kontrol olarak yapılan peynirlerin protein oranları da olgunlaşma periyodu boyunca azalma gözlenmiştir. Bu azalma özellikle *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (KF) ve *P. thoenii* kültürlerinin tek başına kullanıldığı (KT) örneklerde protein miktarının istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) için olgunlaşmanın başında %23,76 olan protein oranı olgunlaşmanın sonunda %18,18'e düşmüştür. *P. thoenii* ile yapılan (KT) peynir için ise protein içeriği %22,65-19,12 arasında değişmiştir. Her iki kültürün beraber kullanıldığı (ÇFT) ve hiç kültür kullanılmayan (ÇK) örneklerde ise protein oranı sırasıyla %22,93, %22,91 den %19,93, %19,52'ye düşmesine rağmen bu azalma istatistiki açıdan önemli değildir ($p>0,05$). Proteolitik aktivite sonucu gözlemlenen protein oranının azalması gerçekleştirilen diğer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Çiğ ve pastörize sütle yapılan Mihaliç peynirlerinin protein içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, olgunlaşmanın başında ve sonunda protein içeriği %21,15 ve %18,90 iken, çiğ süttten işlenen Mihaliç peynirlerinin protein içeriği %29,29 ve %18,88 olarak bulunmuş ve olgunlaşma zamanının protein oranına etkisi önemli olduğu belirtilmiştir (Bulut, 2006). Bizim çalışmamızda da olgunlaşma süresince protein oranı önemli oranda azalmıştır. Akbulut vd. (1995) yaptıkları çalışmada protein azalmasının nedenini proteinlerin kısmen parçalanarak suda çözünen bileşiklere ayrışması ve proteinin salamura suyuna geçmesi olarak açıklamışlardır. Özcan (2000) çalışmasında ortalama protein oranlarının %19,89-23,14 arasında değiştiğini bildirmiştir. Aday (2010) ise Mihaliç peynirinin karakteristik özelliklerini araştırdığı çalışmasında incelediği peynirlerin protein içeriklerini %18,64-24,62 arasında değiştiğini raporlamıştır. Bu değerler bizim çalışmamız kapsamında belirlenen protein içerikleri ile paralellik göstermektedir. Özer (2015) gerçekleştirdiği çalışmada ise Mihaliç peynirlerinin protein oranlarını olgunlaşma başlangıcında %26,57-28,16 arasında, olgunlaşma sonunda ise 26,64-26,89 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu oranların bu çalışmadakinden yüksek olduğu görülmektedir. Özer çalışmasında farklı haşlama sıcaklıklarını test etmiş yüksek haşlama sıcaklığının primer proteolizi etkilediğini bildirmiştir.

Peynirlerin ortalama protein oranları Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Uygulanan varyans analizi sonucu süte ilave edilen linoleik asit kaynağının ve kültür çeşidinin etkisi

önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Peynirlerin protein miktarındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruplarda yer almaktadırlar.



Şekil 4.9. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültürlerle göre ortalama %protein oranları

Proteolitik aktivite, peynirin olgunlaşmasında meydana gelen glikoliz, lipoliz gibi biyokimyasal reaksiyonların yanında peynirin tat ve tekstürel özelliklerini en çok etkileyen faktördür. Peynirdeki proteolizi olgunlaşma süresince kalıntı rennet enzimi ve ilave edilen kültürlerin proteolitik aktivitesi sayesinde gerçekleşmektedir. Ortalama protein oranlarındaki farklılıklar değerlendirildiğinde *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii*'nin proteolitik aktivitesinin kontrol örneğine göre farklılık göstermediği belirlenmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin proteolitik aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada suşlar arasında büyük farklılıklar olduğu ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* türünün en az proteolitik aktiviteye sahip türlerden biri olduğu bildirilmiştir (Lemée, Gagnaire ve Maubois, 1998).

Propiyonik asit bakterilerinin süt proteinlerini hidrolize etme yeteneklerinin zayıf olduğunu Gürsoy ve Kesenkaş (2011) peynir mikrobiyolojisi kitabında şöyle açıklamıştır; “Bu bakterilerin gelişimi rennet ve starter kültür kaynaklı proteolizi sonucu açığa çıkan ürünler ile desteklenmeyi gerektirmektedir.” Propiyonik asit bakterilerinin gelişimleri, süte ilave edilecek diğer starter kültürlerin etkileşimiyle olgunlaşma süresince destek gerekebilmektedir.

4.10.5. Kül Miktarı

Peynir örneklerindeki kül miktarı, salamurada bulunan tuzdan ve süttten geçen mineral madde miktarı ile ilişkilidir. Peynirlerde bulunan tuz oranı ile kül oranı arasında doğrusal bir ilişki olması beklenmektedir. Bu çalışma kapsamında hazırlanan peynir örneklerinin kül analizleri Bölüm 3.5.6’da anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.15’te verilmiştir.

Çizelge 4.15. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince % Kül Oranları

LA kaynağı	Kültür türü	% Kül				
		3. Gün	14. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
Linoleik asit (L)	F	6,35±0,63c	6,94±0,06BCbc	7,83±0,48b	9,27±0,06a	9,67±0,67a
	T	6,31±0,67d	7,76±0,24Acd	8,64±1,00bc	9,90±0,40ab	10,25±0,09a
	F+T	6,08±0,13d	7,42±0,47ABc	8,62±0,32b	9,44±0,17ab	9,80±0,47a
	K	5,91±0,36b	6,29±0,29Cb	8,35±1,02a	8,93±0,94a	10,10±0,57a
Çörek otu yağı (Ç)	F	7,93±0,98a	7,95±0,31a	9,68±0,02Aa	10,05±1,50a	9,55±0,29a
	T	8,09±1,42a	7,64±0,97a	8,32±0,68Ba	9,42±0,21a	9,27±0,27a
	F+T	7,05±0,16b	7,43±1,10b	8,00±0,33Bab	8,90±0,08a	9,12±0,18a
	K	7,37±0,45b	7,25±0,01b	8,28±0,66Bab	9,33±0,63a	9,43±0,44a
Kontrol (K)	F	6,54±0,05Ab	6,62±0,62ABb	7,47±0,12ABab	8,60±0,94ABa	8,27±0,61Ca
	T	5,75±0,50ABc	7,81±0,50Ab	8,49±0,49Ab	9,670,13Aa	10,18±0,02Aa
	F+T	5,42±1,12ABc	5,93±0,98Bbc	6,49±1,18Bbc	7,99±0,35Bab	9,14±0,20Ba
	K	4,63±0,33Bd	5,75±0,16Bc	7,00±0,67ABb	8,08±0,47Bab	8,50±0,17BCa

A,B,C (↓)aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.

a,b,c,d (→)aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir (p<0,05).

F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, F+T: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

Peynirlerin kül oranları olgunlaşma boyunca değişirken olgunlaşmanın sonuna doğru artma eğilimi göstermiştir. Olgunlaşmanın başında en düşük kül oranı %4,63 olarak kontrol sütü ile kültür ilavesi yapılmadan üretilen peynirde (KK) belirlenmiştir. En yüksek

oran ise %8,09 ile çörek otu yağı ilave edilmiş ve *P. thoenii* ile yapılan peynir (ÇT) örneğinde belirlenmiştir. Peynirlerin kül oranları %4,63 ile %10,10 arasında değişmiştir.

Linoleik asit ilave edilen sütlerden farklı kültürler ile yapılan tüm peynirlerde olgunlaşmanın 3. ve 90. günü arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirin (LF) kül oranı %6,35 ten %9,67'ye yükselmiştir. Bu sütte yapılan tüm peynir örneklerinde olgunlaşma boyunca kül oranında %30-50 arasında artış gözlenmiştir. Aynı olgunlaşma zamanında peynirler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Kültür ilavesi yapılarak hazırlanan tüm peynir örneklerinin (LF, LT ve LFT) kül değerleri olgunlaşmanın 60. gününde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Kontrol olarak hazırlanan kültürsüz peynir (LK) ise olgunlaşmanın 30. gününde anlamlı olarak artmıştır.

Çörek otu yağı ilave edilen sütlerde ise kül içerikleri %7,05 ile %9,55 arasında değişmiştir. Bu süttten yapılan peynirlerde de olgunlaşma boyunca kül oranı artmasına rağmen ayrı ayrı *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (ÇF) ve *P. thoenii* (ÇT) ile üretilen örneklerde olgunlaşma boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$). Olgunlaşma süresince peynirlerdeki kül miktarı artışı %15 ile %29 arasında değişmektedir. Aynı olgunlaşma zamanında peynirler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sadece olgunlaşmanın 30. gününde *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ilave edilerek yapılan peynirin (ÇF) kül oranı diğerlerinden önemli derecede farklıdır ($p<0,05$).

Linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmayan süttten yapılan peynirlerde de kül oranı aynı eğilimi göstermiş ve olgunlaşma boyunca artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Kül oranları %5,42 ile 10,18 arasında değişmiştir. Diğer peynirlerden farklı olarak bu sütte yapılan peynirlerde her bir olgunlaşma periyodunda kültürler ile yapılanlar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ($p<0,05$). Tüm olgunlaşma periyotlarında *P.thoenii* ile yapılan peynir örneği (KT) diğer örneklerden önemli derecede daha yüksek kül oranına sahiptir. Olgunlaşma sonunda ise *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirin (KF) en düşük kül oranına (%8,27) sahip olduğu belirlenmiştir.

Peynirlerin ortalama kül miktarları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Çizelgede gösterildiği üzere *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirlerin kül oranı

kontrol sütü ile yapılandırılarak anlamlı olarak yüksektir ($p<0,05$). *P. thoenii* ile yapılan peynirler ise süte ilave edilen linoleik asit kaynağına göre herhangi bir anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Her iki kültürün beraber kullanıldığı peynir örneklerinde linoleik asit ilave edilen sütle hazırlanan örnek, kontrol sütü ile hazırlanandan önemli derecede farklı iken, çörek otu yağı ilave edilmiş sütle hazırlanan peynir diğer iki örnekten istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı değildir. Hiç kültür ilave edilmeden yapılan peynirlerde çörek otu yağı ilave edilmiş süttten yapılan diğerlerinden anlamlı oranda daha yüksek kül miktarına sahiptir ($p<0,05$).

Çizelge 4.16. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültür türüne ve süte ilave edilen linoleik asit kaynağına göre ortalama kül oranları.

Kültür	Linoleik asit (L)	Çörek otu Yağı (Ç)	Kontrol (K)
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	8,01±1,39Aab	9,03±1,17aA	7,5±0,99ABb
<i>P. thoenii</i> (T)	8,57±1,57Aa	8,55±1,01aA	8,38±1,65Aa
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	8,27±1,44Aa	8,10±0,94Aab	6,99±1,60ABb
Kontrol (K)	7,92±1,75Aab	8,33±1,04Aa	6,79±1,53Bb

A,B, (↓)aynı sütunda kültürler arası istatistiksel farkı göstermektedir($p<0,05$).

a,b (→)aynı satırda linoleik asit kaynakları arasındaki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

Süte ilave edilen linoleik asit ve çörek otu yağı ise peynirlerin kül oranlarında anlamlı bir etkiye sahip değildir ($p>0,05$). Varyans analizine göre sadece kontrol süttünden yapılan peynirler (KK) önemli farklılıklar göstermiştir ($p<0,05$). *P. thoenii* ile yapılan peynir diğerlerinden daha yüksek kül oranına sahipken her iki kültürün beraber kullanıldığı ve sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirler istatistiksel olarak birbirinden farklılık göstermemiştir.

Farklı kül oranlarının nedeni bu örneklerin pH ve titrasyon asitliğinin farklılığından ve dolayısıyla peynir ortamına alınan tuz oranının değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özcan (2000) yaptığı çalışmasında olgunlaşmanın kül oranına etkisini önemli bulmuş ve Mihaliç peynirlerinin kül oranını %6,91 ile 8,46 arasında olduğunu raporlamıştır. Bu değerler bu çalışmada belirlenen değerler ile benzerlik göstermektedir.

4.10.6. Tuz Oranı

Peynir üretiminde salamura uygulaması peynirin tat ve aroma gelişimini, tekstürel özelliklerini ve peynirde gerçekleşen mikrobiyal faaliyetleri etkilemektedir. Olgunlaşma süresince peynir kitlesinden suyun ayrılması ve peynirin sertleşmesi doğrudan peynirdeki tuz oranı ile ilişkilidir (Hayaloglu vd., 2012). Bu çalışmada peynirlerin tuz analizi bölüm 3.5.7’de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.17’de gösterilmiştir.

Olgunlaşma süresince beklenildiği gibi peynirlerin tuz oranında artış gözlenmiştir. Olgunlaşmanın başında en düşük tuz oranı %4,42 ile kontrol sütünden herhangi kültür ilavesi yapılmadan üretilen peynir örneğinde (KK) görülürken, en yüksek tuz oranı %6,16 ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten her iki kültürün beraber kullanılarak yapılan peynir (ÇFT) örneğinde belirlenmiştir. Olgunlaşma sonunda ise en düşük tuz oranı %8 ile kontrol süttünde kültürsüz yapılan peynire (KK) aitken en yüksek tuz oranı da %10,18 ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (ÇFT) belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince % Tuz Oranları

LA kaynağı	Kültür türü	% Tuz				
		3. Gün	14. Gün	30. Gün	60. Gün	90. Gün
Linoleik asit (L)	F	5,61±0,19Ac	6,17±0,42Abc	6,88±0,21Cb	8,54±0,27Ba	9,13±0,37Aa
	T	5,75±0,04Ad	6,95±0,44Ac	8,12±0,15Ab	8,44±0,31Bab	9,34±0,59Aa
	F+T	5,85±0,16Ad	6,55±0,19Ac	7,82±0,06Bb	9,17±0,36Aa	9,10±0,28Ba
	K	5,83±0,14Ad	5,91±0,57Ad	7,40±0,37Bc	8,64±0,46ABa	9,15±0,05Aa
Çörek otu yağı (Ç)	F	5,8±0,07ABd	7,93±0,23Ac	7,88±0,23Ac	9,37±0,25Bb	10,18±0,33Aa
	T	6,11±0,15Ac	7,52±0,09Bd	8,19±0,25Ac	9,87±0,07Ab	10,05±0,1Aa
	F+T	6,16±0,20Ad	7,09±0,09Cc	7,75±0,45Ab	8,20±0,21Cb	8,86±0,14Ca
	K	5,75±0,03Be	6,97±0,1Cd	8,08±0,19Ac	8,91±0,17Bb	9,43±0,08Ba
Kontrol (K)	F	5,55±0,07Ad	6,14±0,31Bc	7,10±0,18Ab	8,18±0,08Aa	8,01±,86Aa
	T	5,38±0,15Ac	7,16±0,21Ab	7,48±0,17Ab	8,63±0,15Aa	9,24±0,56Aa
	F+T	4,93±0,09Bd	5,95±0,13Bc	6,13±0,13Bc	7,31±0,59Bb	8,66±0,26Aa

	K	4,42±0,09Cd	5,40±0,02Cc	6,64±0,08Bb	7,60±0,04Ba	8,02±0,78Aa
--	----------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

A,B,C (↓)aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.

a,b,c,d,e (→)aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p<0,05$).

F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, F+T: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

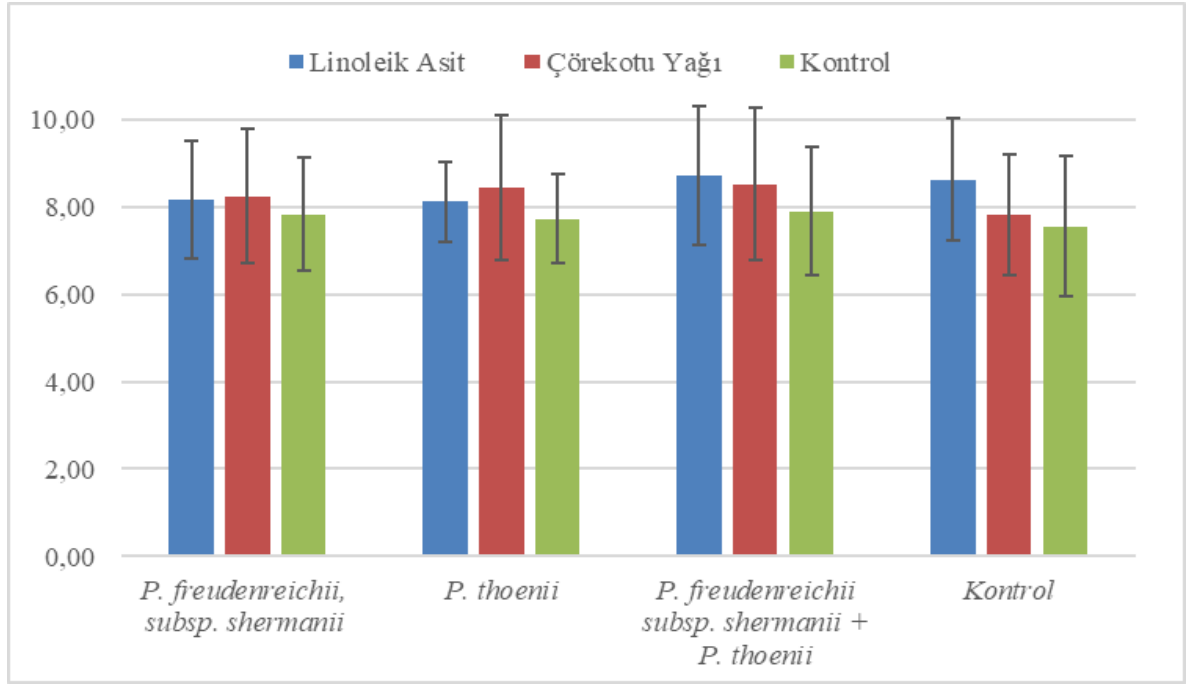
Linoleik asit ilavesi yapılan süttten üretilen tüm peynirlerde olgunlaşma süresince tuz oranlarında istatistiksel olarak önemli derecede artış gözlenmiştir. Olgunlaşmanın peynirlerin tuz oranlarına etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Örnekler arası farklılıklar ise olgunlaşmanın 3.ve 14. gününde önemsiz iken diğer günlerde önemli bulunmuştur. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) örneğinde olgunlaşma süresince %62 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Olgunlaşmanın her döneminde tuz içerikleri birbirinden farklılık göstermiştir.

Çörek otu yağı ilave edilen süttten hazırlanan peynirlerde olgunlaşmanın başında en yüksek tuz oranı %6,16 ile her iki kültürün ilave edildiği örnekte (ÇFT) gözlemlenirken en düşük oran %5,75 ile herhangi bir kültür ilavesi olmayan örnekte (ÇK) belirlenmiştir. Diğer örneklerde olduğu gibi olgunlaşma süresince tuz oranı anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0,05$). Olgunlaşma sonunda en yüksek tuz oranı (%10,18) *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (ÇF) olmasına rağmen sadece herhangi kültür ilavesi olmayan (ÇK) ve iki kültürün beraber kullanıldığı peynir örneği istatistiksel olarak önemli derecede diğerlerinde ayrılmıştır ($p<0,05$).

Linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmeyen kontrol süttünden yapılan peynirlerde de olgunlaşma boyunca tuz oranı kademeli olarak artmıştır. Olgunlaşmanın başında en yüksek tuz oranı %5,55 ile *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir örneğinde (KF) belirlenirken en düşük %4,42 ile herhangi kültür ilavesi olmayan peynirde (KK) gözlenmiştir. Olgunlaşma sonunda ise tüm peynir örneklerinde %41 ile %79 arasında tuz içeriği artmıştır. En yüksek tuz oranı %9,24 ile *P. thoenii* ile yapılan peynir örneğinde (KT) gözlenmiş olmasına rağmen peynir örneklerinin tuz içerikleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince elde edilen tuz içeriklerinin ortalaması dikkate alındığında süte ilave edilen linoleik asit ve çörek otu yağının kontrole göre etkisi anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Şekil 4.10.'da görüldüğü üzere kültürler arasında farklılık da tespit edilememiştir. Sadece kontrol süttünden herhangi bir kültür ilave edilmeden

yapılan peynirin (KK) tuz oranı diğerlerinden daha düşük olarak belirlenmiş fakat aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.10. Mihaliç peynirlerinin kullanılan kültürlerle göre ortalama % tuz oranları

Mihaliç peynirlerinde daha önce yapılan çalışmalarda tuz oranları %5,09-%6,73 (Özer, 2015), %3,86-%5,32 (Hayaloğlu vd., 2012), %3,27-%8,18 (Aday, 2010), %1,51-%11,57 (Bulut, 2006), %3,82-%8,07 (Özcan, 2000) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada belirlenen tuz içerikleri diğer çalışmalarda belirlenen değerlere yakın ancak biraz daha yüksek olarak saptanmıştır. Peynirde bulunan tuz oranı salamuranın tuz konsantrasyonu, sıcaklık, asitlik olgunlaşma süresi gibi parametrelere bağlı olduğu için bu gibi farklılıklar gözlenebilmektedir (Hayaloğlu vd., 2008).

4.10.7. Yağ Asitleri Kompozisyonu

Peynirin olgunlaşması süresince gerçekleşen önemli biyokimyasal olaylardan biri de serbest yağ asitlerinin oluşumudur. Lipitlerin hidrolizi, çoğu olgunlaşmış/olgunlaşmamış peynir tipi için bir kalite parametresi olarak kullanılır, çünkü lipit hidrolizi tarafından tetiklenen değişiklikler, peynirin fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özelliklerini etkiler. Yağ asitleri peynirin tat ve aroma oluşumunu doğrudan etkilemektedir (Özdemir vd., 2004). Kısa zincirli yağ asitleri keton ve esterler gibi çeşitli hoş koku

bileşenlerinin üretimlerinin ilk basamağını oluşturmaktadır (Aday ve Karagul Yuceer, 2014).

Yağ asitlerinin açığa çıkması için gerçekleşen lipolizin seviyesi peynir türlerine göre farklılık göstermektedir. Bazı İtalyan peynirlerinde lipoliz çok yüksek seviyelerde gerçekleşirken, salamurada olgunlaştırılan peynirlerde daha düşük seviyede gerçekleşmektedir. Peynir sütünün pastörizasyonu, sütte bulunan lipazın çoğunu etkisiz hale getirildiği için çiğ ve pastörize süttten yapılan peynirler arasında lipoliz seviyesi açısından önemli farklılıklar vardır. Bununla birlikte, lipolitik enzimler sadece çiğ süttten değil, aynı zamanda starter ve starter olmayan bakteriler ve/veya ekzojen lipazlardan da kaynaklanmaktadır (Hayaloglu ve Karabulut, 2013).

Olgunlaşma boyunca peynirlerin yağ asitleri profili Bölüm 3.5.8’de açıklandığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar her bir peynir örneği için ayrı ayrı gösterilmiştir.

Linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynirin (LF) yağ asitleri profili Çizelge 4.18’ de gösterilmiştir. Bu peynirde bulunan majör yağ asitleri %32,5 ile palmitik asit (C:16) ve %28,7 ile oleik asit (C:18:1n9t) olarak belirlenmiştir. Miristik asit (C:14) ve stearik asit (C:18) ise sırasıyla %11,5 ve %12 oranlarıyla ikinci en yüksek orana sahip yağ asidi grubudur. Bu çalışma için önem arz eden linoleik asit (C:18:2n) miktarı ise ortalama %3,1 olarak belirlenmiştir. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde bütirik (C:4), kaproik (C:6) ve kaprilik (C:8) oranlarıyla sırasıyla %2,1; %1,6 ve %1,2 olarak belirlenmiştir.

Olgunlaşma süresince yağ asitlerinin oranlarında değişimler gözlenmiştir. Olgunlaşmanın başında tekli doymamış yağ asitleri %27,4 iken olgunlaşmanın 14, 30. ve 60. günlerinde atış göstererek %31 seviyelerine çıkmıştır. Olgunlaşmanın sonunda ise tekli doymamış yağ asitleri seviyesi tekrar %28 oranına düşmüştür. Çoklu doymamış yağ asitleri ise olgunlaşma başında %4 olarak belirlenmiş daha sonra 14. günde azalmış 30. günde tekrar artarak %4,1 seviyesine çıkmıştır. Olgunlaşma sonunda ise %3,8 seviyesine gerilemiştir. Olgunlaşma boyunca gözlemlenen bu dalgalanmalar mikrobiyal aktivite ile ilişkilendirilmiştir. Doymuş yağ asitleri olgunlaşma başında ve sonunda farklılık olmamasına rağmen özellikle olgunlaşmanın 14., 30. ve 60. günlerinde azalma göstermiş fakat olgunlaşmanın son döneminde başlangıç seviyesine ulaşmıştır. Doymuş yağ asitleri olgunlaşma boyunca ortalama %66,3 seviyesinde belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. Linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)										
Linoleik Asit (L)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	2,18	1,95	2,29	2,00	2,28	2,14	0,16	1,95	2,29
	C:6	1,75	1,58	1,87	1,62	0,96	1,56	0,35	0,96	1,87
	C:8	1,04	0,98	1,11	0,97	1,73	1,17	0,32	0,97	1,73
	C:10	2,53	2,40	2,63	2,34	1,24	2,23	0,57	1,24	2,63
	C:12	3,03	2,96	2,92	2,83	1,90	2,73	0,47	1,90	3,03
	C:14	11,93	11,41	11,22	11,16	11,53	11,45	0,30	11,16	11,93
	C:14:1	0,00	1,04	0,90	0,86	0,00	0,56	0,52	0,00	1,04
	C:15	0,00	0,90	0,74	0,79	0,00	0,48	0,45	0,00	0,90
	C:16	33,31	31,87	30,92	31,56	34,99	32,53	1,63	30,92	34,99
	C:16:1	0,00	1,79	0,00	1,53	0,00	0,66	0,91	0,00	1,79
	C:18	12,78	10,97	10,76	12,00	13,47	12,00	1,16	10,76	13,47
	C:18:1n9t	27,40	28,89	30,52	28,70	28,04	28,71	1,17	27,40	30,52
	C18:2n6c	3,10	2,44	3,12	2,75	3,87	3,06	0,53	2,44	3,87
	C:18:3n3	0,96	0,83	0,99	0,89	0,00	0,73	0,41	0,00	0,99
	ΣSFA	68,55	65,01	64,47	65,27	68,10	66,28	1,90	64,47	68,55
	ΣUFA	31,45	34,99	35,53	34,73	31,90	33,72	1,90	31,45	35,53
	ΣMUFA	27,40	31,72	31,42	31,09	28,04	29,93	2,05	27,40	31,72
	ΣPUFA	4,05	3,27	4,11	3,64	3,87	3,79	0,34	3,27	4,11

Linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin (LT) yağ asitleri profili Çizelge 4.19 da gösterilmiştir. Bu peynirin yağ asitleri incelendiğinde en yüksek orana sahip yağ asitlerinin palmitik (%32,7) ve oleik asit (%28,5) olduğu görülmektedir. Daha sonra %11,6 ve %12,3 oranlarıyla miristik ve stearik asit gelmektedir. Linoleik asit oranı ise ortalama %2,9 olarak belirlenmiştir. Kısa zincirli yağ asitlerine

bakıldığında bütirik asit %2,1, kaproik asit %1,7 ve kaprilik asit %0,74 oranlarında belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. thoenii</i> (T)										
Linoleik Asit (L)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	2,16	2,01	2,04	2,09	2,15	2,09	0,07	2,01	2,16
	C:6	1,73	1,60	1,66	1,65	1,73	1,67	0,05	1,60	1,73
	C:8	0,00	0,99	1,01	0,98	0,70	0,74	0,43	0,00	1,01
	C:10	2,49	2,43	2,36	2,32	2,35	2,39	0,07	2,32	2,49
	C:12	2,97	2,93	2,83	2,80	2,91	2,89	0,07	2,80	2,97
	C:14	11,94	11,54	11,05	11,01	12,20	11,55	0,53	11,01	12,20
	C:14:1	0,00	0,85	0,91	0,88	0,00	0,53	0,48	0,00	0,91
	C:15	0,00	0,83	0,80	0,78	0,00	0,48	0,44	0,00	0,83
	C:16	33,56	32,36	31,04	31,42	34,87	32,65	1,58	31,04	34,87
	C:16:1	0,00	0,00	1,62	1,51	0,00	0,63	0,86	0,00	1,62
	C:18	12,99	12,43	11,62	12,27	12,25	12,31	0,49	11,62	12,99
	C:18:1n9t	28,34	28,11	29,24	28,73	27,81	28,45	0,56	27,81	29,24
	C18:2n6c	3,84	2,96	2,84	2,68	2,29	2,92	0,57	2,29	3,84
	C:18:3n3	0,00	0,96	0,99	0,88	0,74	0,71	0,41	0,00	0,99
	ΣSFA	67,82	67,11	64,41	65,32	69,16	66,77	1,91	64,41	69,16
	ΣUFA	32,18	32,89	35,59	34,68	30,84	33,23	1,91	30,84	35,59
	ΣMUFA	28,34	28,96	31,77	31,12	27,81	29,60	1,75	27,81	31,77
	ΣPUFA	3,84	3,93	3,82	3,56	3,03	3,64	0,37	3,03	3,93

Olgunlaşma boyunca bu peynirin doymuş yağ oranı %64,4 ile %69,2 arasında değişmekle ortalama %66,8 olarak hesaplanmıştır. Doymamış yağ asitleri %33,2 olarak

belirlenmiş ve %29,6 tekli doymamış yağ asitleri iken %3,6'sı çoklu doymamış yağ asitleri olarak belirlenmiştir. Olgunlaşma başı ile sonu arasında yağ asitleri oranlarında değişimler gözlemlenmiştir. Doymuş yağ asitleri oranı artarken, doymamış yağ asitleri oranı azalmıştır. Bununla beraber tekli doymamış yağ asitleri artış gösterirken çoklu doymamış yağ asitleri ise azalmıştır.

Linoleik asit ilave edilmiş sütün *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* kültürlerinin beraber kullanılarak üretilen peynirin (LFT) yağ asitleri profili Çizelge 4.20' de gösterilmiştir. Bu peynirde en yüksek oranda %33,5 ile palmitik asit ve %27,4 oranında oleik asit belirlenmiştir. Miristik asit %11,4 oranında ve stearik asit %11,5 oranında bulunmuştur. Kısa zincirli yağ asitleri oranları bütirik %2,2, kaproik %1,8 ve kaprilik %1,1 şeklinde belirlenmiştir. Linoleik asit miktarı olgunlaşma başında %2,7 iken olgunlaşmanın 30. gününde önemli oranda artarak %3,4 e ulaşmış daha sonra azalma eğilimi göstererek olgunlaşma boyunca ortalama %2,8 oranında belirlenmiştir.

Doymuş yağ asitleri bu peynir örneğinde olgunlaşmanın başında %67,2 iken 30. günde önemli oranda azalarak %64,5 olmuştur. Olgunlaşmanın sonunda ise artış göstererek %69,4 oranına ulaşmıştır. Doymamış yağ asitleri ise olgunlaşmanın başında %32,8 iken olgunlaşmanın sonunda %30,6 oranına gerilemiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri olgunlaşmanın 30. gününde önemli oranda artarak %4,0 olmuş fakat olgunlaşmanın sonunda azalarak %3,5 olarak belirlenmiştir. Tekli doymamış yağ asitleri ise olgunlaşma boyunca ortalama %29,3 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.20. Linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)										
Linoleik Asit (L)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	2,09	1,92	2,57	2,12	2,24	2,19	0,24	1,92	2,57
	C:6	1,69	1,60	2,08	1,67	1,75	1,76	0,19	1,60	2,08
	C:8	1,00	0,99	1,23	0,99	1,02	1,05	0,10	0,99	1,23
	C:10	2,47	2,45	2,60	2,30	2,42	2,45	0,11	2,30	2,60
	C:12	2,94	2,96	2,78	2,81	3,02	2,90	0,10	2,78	3,02
	C:14	11,27	11,32	10,63	11,35	12,22	11,36	0,57	10,63	12,22
	C:14:1	0,94	0,95	0,86	0,83	0,00	0,72	0,40	0,00	0,95
	C:15	0,85	0,86	0,72	0,77	0,00	0,64	0,36	0,00	0,86
	C:16	33,43	33,58	31,57	34,24	34,52	33,47	1,15	31,57	34,52
	C:16:1	1,74	1,79	1,77	0,61	0,00	1,18	0,83	0,00	1,79
	C:18	11,48	11,47	10,27	11,79	12,22	11,44	0,73	10,27	12,22
	C:18:1n9t	26,73	26,74	28,89	27,28	27,25	27,38	0,89	26,73	28,89
	C18:2n6c	2,68	2,67	3,43	2,70	2,45	2,79	0,37	2,45	3,43
	C:18:3n3	0,70	0,70	0,59	0,56	0,88	0,69	0,13	0,56	0,88
	ΣSFA	67,21	67,15	64,46	68,03	69,42	67,25	1,81	64,46	69,42
	ΣUFA	32,79	32,85	35,54	31,97	30,58	32,75	1,81	30,58	35,54
ΣMUFA	29,41	29,48	31,52	28,71	27,25	29,27	1,54	27,25	31,52	
ΣPUFA	3,38	3,37	4,02	3,25	3,34	3,47	0,31	3,25	4,02	

Linoleik asit ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan kontrol olarak üretilen peynirin (LK) yağ asitleri profili Çizelge 4.21’de gösterilmiştir. Palmitik asit %33,5, oleik asit %27,5 ile en yüksek oranda bulunan yağ asitleridir. Miristik asit ve stearik asit sırasıyla %11,4 ve %11,5 oranlarında bulunmuştur. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde bütirik asit %2,0, kaproik asit %1,7 ve kaprilik asit %1,0 şeklinde

belirlenmiştir. Linoleik asit miktarı olgunlaşma başında %2,8 iken olgunlaşma sonunda %2,6 ya düşmüş ve olgunlaşma boyunca ortalama %2,7 oranında olmuştur.

Çizelge 4.21. Linoleik asit ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan Kontrol olarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

Kontrol (K)										
		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
Linoleik Asit (L)	C:4	1,99	1,93	1,96	1,93	2,34	2,03	0,18	1,93	2,34
	C:6	1,62	1,61	1,60	1,64	1,78	1,65	0,07	1,60	1,78
	C:8	0,98	0,99	0,99	0,98	1,18	1,03	0,09	0,98	1,18
	C:10	2,40	2,48	2,37	2,30	2,22	2,36	0,10	2,22	2,48
	C:12	2,93	3,04	2,96	2,71	2,70	2,87	0,16	2,70	3,04
	C:14	11,13	11,47	11,37	10,86	11,96	11,36	0,41	10,86	11,96
	C:14:1	0,94	1,48	1,01	0,86	0,00	0,86	0,54	0,00	1,48
	C:15	0,84	0,94	0,85	0,77	0,00	0,68	0,39	0,00	0,94
	C:16	32,81	32,62	32,02	32,92	36,93	33,46	1,97	32,02	36,93
	C:16:1	1,73	1,67	1,72	1,76	0,00	1,38	0,77	0,00	1,76
	C:18	11,20	11,14	11,34	11,23	12,42	11,47	0,54	11,14	12,42
	C:18:1n9t	27,91	27,20	28,28	28,61	25,23	27,45	1,35	25,23	28,61
	C18:2n6c	2,81	2,57	2,64	2,76	2,58	2,67	0,11	2,57	2,81
	C:18:3n3	0,73	0,85	0,88	0,66	0,67	0,76	0,10	0,66	0,88
	ΣSFA	65,89	66,23	65,46	65,35	71,53	66,89	2,62	65,35	71,53
	ΣUFA	34,11	33,77	34,54	34,65	28,47	33,11	2,62	28,47	34,65
	ΣMUFA	30,57	30,36	31,01	31,23	25,23	29,68	2,51	25,23	31,23
ΣPUFA	3,54	3,41	3,52	3,42	3,24	3,43	0,12	3,24	3,54	

Doymuş yağ asitleri oranı olgunlaşma boyunca değişmekle beraber olgunlaşma sonunda önemli bir artış göstermiştir. Başlangıçta %65,9 olan doymuş yağ asitleri oranı

olgunlaşmanın sonunda önemli oranda artarak %71,5'a yükselmiştir. Bu artışın sonucunda özellikle tekli doymamış yağ asitleri oranında %34,1 den %28,5'a doğru bir azalış gözlemlenmiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri oranında ise anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.

Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynirin (ÇF) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.22'de gösterilmiştir. Bu peynirlere ilave edilen çörek otu yağının yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 3.3.'te verilmiştir. Palmitik asit ve oleik asit sırasıyla ortalama %34 ve %26,9 oranlarıyla diğer peynirlerde olduğu gibi en baskın yağ asitleridir. Miristik asit (%11,5) ve stearik asit(%12,1) bunlardan sonra gelen en yüksek orana sahip yağ asitleridir. Linoleik asit oranları incelendiğinde olgunlaşmanın başında %2,6 olan oranın olgunlaşmanın 60. gününde %3,1'e yükselmiş fakat olgunlaşma sonunda yine %2,6 olarak belirlenmiştir. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde bütirik asit %2,0, kaproik asit %1,6 ve kaprilik asit %1,0 şeklinde belirlenmiştir.

Doymuş yağ asitleri oranlarına bakıldığında olgunlaşma başında %69,3 olan oranın olgunlaşmanın 14, 30. ve 60. günlerinde önemli oranda azaldığını fakat olgunlaşma sonunda yine artış göstererek %70,8 oranına ulaştığı görülmektedir. Doymamış yağ oranları ise olgunlaşma başında ve sonunda %30,7-29,2 oranlarında iken tekli doymamış yağ oranında önemli bir düşüş (%27,4-25,9) gözlemlenmiştir. Çoklu doymamış yağ oranları ise olgunlaşma boyunca anlamlı bir fark göstermemiştir.

Çizelge 4.22. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)										
Çörek Otu Yağı (Ç)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	2,07	1,97	2,06	1,97	2,14	2,04	0,07	1,97	2,14
	C:6	1,62	1,62	1,66	1,58	1,66	1,63	0,04	1,58	1,66
	C:8	0,95	0,98	1,01	0,94	0,85	0,95	0,06	0,85	1,01
	C:10	2,36	2,41	2,43	2,21	2,27	2,34	0,09	2,21	2,43
	C:12	2,89	2,89	2,99	2,68	2,76	2,84	0,12	2,68	2,99
	C:14	11,68	11,29	11,62	11,11	11,83	11,50	0,30	11,11	11,83
	C:14:1	0,83	0,94	0,96	0,78	0,00	0,70	0,40	0,00	0,96
	C:15	0,83	0,84	0,88	0,71	0,00	0,65	0,37	0,00	0,88
	C:16	34,63	32,94	32,57	33,50	36,10	33,95	1,43	32,57	36,10
	C:16:1	0,77	1,72	0,71	1,65	0,00	0,97	0,72	0,00	1,72
	C:18	12,32	11,46	11,57	12,04	13,16	12,11	0,68	11,46	13,16
	C:18:1n9t	25,75	27,63	28,43	26,99	25,88	26,94	1,14	25,75	28,43
	C18:2n6c	2,57	2,53	2,30	3,07	2,58	2,61	0,28	2,30	3,07
	C:18:3n3	0,74	0,77	0,80	0,78	0,77	0,77	0,02	0,74	0,80
	ΣSFA	69,34	66,40	66,80	66,73	70,76	68,01	1,94	66,40	70,76
	ΣUFA	30,66	33,60	33,20	33,27	29,24	31,99	1,94	29,24	33,60
	ΣMUFA	27,35	30,29	30,10	29,41	25,88	28,61	1,92	25,88	30,29
	ΣPUFA	3,31	3,31	3,10	3,85	3,35	3,38	0,28	3,10	3,85

Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin (ÇT) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu çizelge 4.23'te gösterilmiştir. Diğer peynir örneklerine benzer şekilde palmitik asit (%33,8) ve oleik asit (%27,3) en yüksek orana sahip yağ asitleridir. Daha sonra %11,4 oranı ile miristik asit ve %11,9 oranıyla oleik asit gelmektedir. Olgunlaşma boyunca linoleik asidin değişimi %2,4-3,0 arasında olmuştur.

Kısa zincirli yağ asitleri bütirik asit %2,0, kaproik asit %1,7 ve kaprilik asit %1,0 oranlarında belirlenmiştir.

Çizelge 4.23. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. thoenii</i> (T)										
Çörek Otu Yağı (Ç)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	2,06	1,96	1,83	2,04	2,11	2,00	0,11	1,83	2,11
	C:6	1,67	1,61	1,63	1,64	1,69	1,65	0,03	1,61	1,69
	C:8	0,99	0,95	0,98	0,95	0,94	0,96	0,02	0,94	0,99
	C:10	2,39	2,35	2,33	2,29	2,22	2,31	0,06	2,22	2,39
	C:12	2,91	2,84	2,74	2,76	2,68	2,79	0,09	2,68	2,91
	C:14	11,48	11,66	11,08	11,21	11,60	11,41	0,25	11,08	11,66
	C:14:1	0,87	0,85	0,88	0,84	0,00	0,69	0,38	0,00	0,88
	C:15	0,82	0,83	0,75	0,76	0,00	0,63	0,36	0,00	0,83
	C:16	33,81	34,59	32,57	33,32	34,81	33,82	0,92	32,57	34,81
	C:16:1	1,13	0,80	1,75	1,68	0,00	1,07	0,72	0,00	1,75
	C:18	12,02	12,37	11,22	11,60	12,36	11,91	0,50	11,22	12,37
	C:18:1n9t	26,66	25,88	29,01	27,86	27,10	27,30	1,19	25,88	29,01
	C18:2n6c	2,44	2,51	2,50	2,35	2,97	2,55	0,24	2,35	2,97
	C:18:3n3	0,75	0,80	0,74	0,69	0,67	0,73	0,05	0,67	0,80
	ΣSFA	68,15	69,16	65,13	66,57	68,41	67,49	1,62	65,13	69,16
	ΣUFA	31,85	30,84	34,87	33,43	30,74	32,35	1,78	30,74	34,87
	ΣMUFA	28,66	27,53	31,63	30,38	27,10	29,06	1,92	27,10	31,63
	ΣPUFA	3,19	3,31	3,24	3,04	3,64	3,28	0,22	3,04	3,64

Doymuş yağ oranları olgunlaşmanın başında ve sonunda %68,2-68,4 arasında değişmiştir. En önemli değişiklik olgunlaşmanın 30. gününde gözlemlenmiş doymuş yağ

asitleri oranı %65,1 olarak hesaplanmıştır. Doymamış yağ asitleri incelendiğinde olgunlaşma boyunca ortalama oranın %32,5 olduğu görülürken tekli doymamış yağ asitleri olgunlaşmanın 60. gününde %30,4 seviyesine ulaşmıştır. Çoklu doymamış yağ asitleri ise en yüksek değerine (%3,64) olgunlaşmanın sonunda ulaşmıştır.

Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin (ÇFT) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.24'te gösterilmiştir. Palmitik asit %34,7, oleik asit %26,5 oranlarında bulunurken miristik asit %11,6 ve stearik asit %12,1 oranlarında bulunmuştur. Linoleik asit oranı olgunlaşma başında %2,5 oranındayken olgunlaşma sonunda %2,16 oranına düşmüştür. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde bütirik asit %2,1, kaproik asit %1,6 ve kaprilik asit %1,0 olarak belirlenmiştir.

Doymuş yağ asitleri incelendiğinde olgunlaşma başında %69,4 olan oran 30. günde (%65,9) önemli oranda azalsa da olgunlaşmanın sonunda %72,3 oranına yükselmiştir. Doymamış yağ asitleri ise %30,6 dan %27,7 ye gerilemiştir. Tekli doymamış yağ asitleri olgunlaşma sonunda %24,9'a çoklu doymamış yağ asitleri %2,8'e düşmüştür. Olgunlaşmanın 30. gününe kadar artış gözlemlenirken sonrasında oranlar azalma eğilimi göstermiştir.

Çizelge 4.24. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)										
Çörek Otu Yağı (Ç)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	2,00	2,15	2,17	2,13	2,27	2,14	0,10	2,00	2,27
	C:6	1,58	1,72	1,76	1,69	1,15	1,58	0,25	1,15	1,76
	C:8	0,96	0,99	1,04	0,99	1,02	1,00	0,03	0,96	1,04
	C:10	2,41	2,34	2,36	2,30	2,13	2,31	0,11	2,13	2,41
	C:12	2,92	2,81	2,81	2,80	2,71	2,81	0,08	2,71	2,92
	C:14	11,78	11,58	11,13	11,44	12,22	11,63	0,40	11,13	12,22
	C:14:1	0,84	0,86	0,83	0,83	0,00	0,67	0,38	0,00	0,86
	C:15	0,83	0,77	0,71	0,75	0,00	0,61	0,35	0,00	0,83
	C:16	34,63	34,20	32,91	34,25	37,50	34,70	1,69	32,91	37,50
	C:16:1	0,78	0,72	1,78	0,59	0,00	0,77	0,64	0,00	1,78
	C:18	12,27	11,92	10,97	12,11	13,32	12,12	0,84	10,97	13,32
	C:18:1n9t	25,76	26,69	28,20	26,86	24,93	26,49	1,23	24,93	28,20
	C18:2n6c	2,48	2,44	2,57	2,59	2,16	2,45	0,17	2,16	2,59
	C:18:3n3	0,76	0,79	0,75	0,67	0,60	0,71	0,07	0,60	0,79
	ΣSFA	69,38	68,49	65,87	68,46	72,31	68,90	2,31	65,87	72,31
	ΣUFA	30,62	31,51	34,13	31,54	27,69	31,10	2,31	27,69	34,13
	ΣMUFA	27,38	28,28	30,81	28,28	24,93	27,94	2,11	24,93	30,81
	ΣPUFA	3,24	3,23	3,32	3,26	2,76	3,16	0,23	2,76	3,32

Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan kontrol olarak üretilen peynirin (ÇK) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.25'te verilmiştir. Bu peynirde en yüksek %33,8 oranında palmitik asit sonra %26,4 oranında oleik asit belirlenmiştir. Miristik asit ve stearik asit sırasıyla %11,7 ve %11,8

oranında bulunmuştur. Kısa zincirli yağ asitleri bütirik asit %2,0, kaproik asit %1,7 ve kaprilik asit %1,0 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.25. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan Kontrol olarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

Kontrol (K)										
		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
Çörek Otu Yağı (C)	C:4	2,00	1,93	1,96	2,03	2,14	2,01	0,08	1,93	2,14
	C:6	1,66	1,63	1,68	1,65	1,71	1,67	0,03	1,63	1,71
	C:8	0,99	0,95	1,03	0,98	0,86	0,96	0,06	0,86	1,03
	C:10	2,49	2,33	2,45	2,38	2,35	2,40	0,07	2,33	2,49
	C:12	2,89	2,85	2,93	2,90	2,84	2,88	0,04	2,84	2,93
	C:14	11,91	11,46	11,56	11,59	12,17	11,74	0,29	11,46	12,17
	C:14:1	0,93	0,90	0,97	0,95	0,00	0,75	0,42	0,00	0,97
	C:15	0,94	0,86	0,87	0,89	0,87	0,88	0,03	0,86	0,94
	C:16	34,04	33,70	32,87	33,14	35,40	33,83	0,99	32,87	35,40
	C:16:1	1,77	0,67	1,64	1,59	1,79	1,49	0,47	0,67	1,79
	C:18	11,97	11,94	11,31	11,40	12,39	11,80	0,45	11,31	12,39
	C:18:1n9t	25,13	27,63	27,60	27,26	24,22	26,37	1,59	24,22	27,63
	C18:2n6c	2,48	2,39	2,34	2,50	2,51	2,44	0,07	2,34	2,51
	C:18:3n3	0,83	0,77	0,78	0,74	0,74	0,77	0,04	0,74	0,83
	ΣSFA	68,87	67,64	66,66	66,97	70,74	68,17	1,67	66,66	70,74
	ΣUFA	31,13	32,36	33,34	33,03	29,26	31,83	1,67	29,26	33,34
	ΣMUFA	27,82	29,19	30,22	29,80	26,01	28,61	1,71	26,01	30,22
ΣPUFA	3,31	3,17	3,12	3,24	3,25	3,22	0,07	3,12	3,31	

Doymuş yağ asitleri olgunlaşmanın başında %68,9 iken sonunda %70,7 olarak belirlenmiştir. Doymamış yağ asitleri olgunlaşma boyunca %31,1'den %29,3'e gerilemiştir. Tekli doymamış yağ asitleri başlangıçta %27,8 iken 30. günde önemli oranda artmış (%30,2) ve olgunlaşmanın sonunda tekrar %26 oranına düşmüştür. Çoklu doymamış yağ asitleri olgunlaşma boyunca önemli oranda değişmemiştir.

Kontrol sütü olarak kullanılan linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmayan süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynirin (KF) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.26'da verilmiştir. Bu peynirlerin palmitik asit oranı olgunlaşmanın başında %31,5'ten olgunlaşma sonunda %40'a yükselmiştir. Oleik asit miktarı ise %27,8 den %30,3 ye yükselmiştir. Miristik asit %11,5-13 arasında değişirken, stearik asit oranları %11'den %14,1'e yükselmiştir. Linoleik asit oranları ise çok fazla değişmemekle beraber ortalama %2,5 oranında belirlenmiştir. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde ise olgunlaşma sonunda bütirik, kaproik ve kaprilik asit oranlarının sıfır olduğu görülmektedir. Olgunlaşmanın 60. gününde sırasıyla %2, %1,6 %1 olarak belirlenen oranlar 90. günde belirlenememiştir,

Doymuş yağ asitleri olgunlaşma boyunca %65,1'den %67,1'e yükselirken doymuş yağ asitleri ise aynı oranda azalmıştır. Tekli doymamış yağ asitleri %31,5 ten %30,2 ye azalırken, çoklu doymamış yağ asitleri de %3,35'ten %2,70 e önemli oranda azalmıştır.

Çizelge 4.26. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)										
		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
Kontrol (K)	C:4	1,96	1,72	2,24	2,05	0,00	1,59	0,91	0,00	2,24
	C:6	1,61	1,52	1,77	1,63	0,00	1,31	0,74	0,00	1,77
	C:8	1,00	0,93	1,05	0,99	0,00	0,79	0,44	0,00	1,05
	C:10	2,54	2,26	2,64	2,35	0,00	1,96	1,11	0,00	2,64
	C:12	3,08	2,76	3,26	2,89	0,00	2,40	1,35	0,00	3,26
	C:14	11,49	11,24	12,75	11,44	12,99	11,98	0,82	11,24	12,99
	C:14:1	1,51	0,92	0,00	0,93	0,00	0,67	0,66	0,00	1,51
	C:15	0,94	0,80	0,00	0,84	0,00	0,52	0,48	0,00	0,94
	C:16	31,53	33,55	35,45	32,23	39,97	34,54	3,38	31,53	39,97
	C:16:1	2,24	1,73	0,00	1,70	0,00	1,13	1,06	0,00	2,24
	C:18	10,96	11,82	12,58	11,39	14,11	12,17	1,24	10,96	14,11
	C:18n9t	27,79	27,62	25,66	28,56	30,22	27,97	1,65	25,66	30,22
	C18:2n6c	2,53	2,40	2,61	2,26	2,70	2,50	0,17	2,26	2,70
	C:18:3n3	0,82	0,75	0,00	0,73	0,00	0,46	0,42	0,00	0,82
	ΣSFA	65,10	66,59	71,73	65,81	67,07	67,26	2,61	65,10	71,73
	ΣUFA	34,90	33,41	28,27	34,19	32,93	32,74	2,61	28,27	34,90
	ΣMUFA	31,55	30,26	25,66	31,19	30,22	29,78	2,37	25,66	31,55
ΣPUFA	3,35	3,15	2,61	3,00	2,70	2,96	0,31	2,61	3,35	

Kontrol sütü olarak kullanılan linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmayan süttten *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin (KT) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.27’de verilmiştir. Palmitik asit oranı olgunlaşma boyunca ortalama %32,6 olurken oleik asit oranı da %28,2 olarak belirlenmiştir. Miristik asit ve

stearik asit oranları ise %11,7 ve %11,5 olarak hesaplanmıştır. Kısa zincirli yağ asitleri bütirik asit %2,1, kaproik asit %1,7 ve kaprilik asit %1,0 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.27. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. thoenii</i> (T)										
Kontrol (K)		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
	C:4	1,92	1,95	2,06	2,02	2,32	2,05	0,16	1,92	2,32
	C:6	1,60	1,64	1,67	1,63	1,80	1,67	0,08	1,60	1,80
	C:8	1,00	0,99	1,02	0,99	-	1,00	0,01	0,99	1,02
	C:10	2,50	2,39	2,45	2,38	2,59	2,46	0,09	2,38	2,59
	C:12	3,05	2,88	2,93	2,91	3,08	2,97	0,09	2,88	3,08
	C:14	11,47	11,19	11,45	11,43	12,93	11,69	0,70	11,19	12,93
	C:14:1	1,48	0,92	0,99	0,95	0,00	0,87	0,54	0,00	1,48
	C:15	0,95	0,82	0,84	0,85	0,00	0,69	0,39	0,00	0,95
	C:16	31,87	31,25	31,51	31,97	36,40	32,60	2,14	31,25	36,40
	C:16:1	1,81	1,58	1,74	1,74	0,00	1,38	0,77	0,00	1,81
	C:18	11,11	11,60	10,90	11,19	12,89	11,54	0,80	10,90	12,89
	C:18:1n9t	28,00	29,01	29,28	28,85	25,64	28,16	1,48	25,64	29,28
	C18:2n6c	2,40	2,82	2,37	2,35	2,35	2,45	0,20	2,35	2,82
	C:18:3n3	0,83	0,97	0,79	0,75	0,00	0,67	0,38	0,00	0,97
	ΣSFA	65,47	64,71	64,82	65,37	72,01	66,48	3,11	64,71	72,01
	ΣUFA	34,53	35,29	35,18	34,63	27,99	33,52	3,11	27,99	35,29
	ΣMUFA	31,30	31,51	32,02	31,54	25,64	30,40	2,67	25,64	32,02
	ΣPUFA	3,23	3,78	3,16	3,09	2,35	3,12	0,51	2,35	3,78

Kontrol sütü olarak kullanılan linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmayan süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin (KFT) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.28'de gösterilmiştir. Palmitik asit %32,9 oleik asit %27,7 ile en yüksek oranda bulunan yağ asitleridir. Miristik asit ve stearik asit sırasıyla %11,7 ve 11,8 oranlarında bulunmuştur. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde bütirik asit %2,1, kaproik asit %1,7 ve kaprilik asit %1,0 şeklinde belirlenmiştir. Linoleik asit miktarı olgunlaşma başında %2,5 iken olgunlaşma sonunda %2,7 ye yükselmiş ve olgunlaşma boyunca ortalama %2,6 oranında olmuştur.

Olgunlaşma boyunca bu peynirin doymuş yağ oranı %67,1 ile %68,5 arasında değişmekle ortalama %67,05 olarak hesaplanmıştır. Doymamış yağ asitleri %32,9 olarak belirlenmiş ve %29,7 oranında tekli doymamış yağ asitleri iken %3,3'ü çoklu doymamış yağ asitleri olarak belirlenmiştir. Olgunlaşma boyunca çoklu doymamış yağ asitleri oranları %3 ün üzerindeyken olgunlaşma sonunda önemli bir azalma gözlenmiş ve %2,74 oranında belirlenmiştir.

Çizelge 4.28. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* kullanılarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)										
		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
Kontrol (K)	C:4	1,88	2,03	1,95	2,11	2,31	2,05	0,17	1,88	2,31
	C:6	1,62	1,65	1,61	1,70	1,77	1,67	0,07	1,61	1,77
	C:8	1,00	1,01	1,00	1,02		1,01	0,01	1,00	1,02
	C:10	2,46	2,51	2,45	2,40	2,40	2,44	0,05	2,40	2,51
	C:12	3,05	3,11	2,98	2,90	2,82	2,97	0,12	2,82	3,11
	C:14	11,73	12,05	11,48	11,33	11,98	11,71	0,31	11,33	12,05
	C:14:1	0,99	0,94	0,99	0,92	0,00	0,77	0,43	0,00	0,99
	C:15	0,89	0,91	0,83	0,80	0,00	0,68	0,39	0,00	0,91
	C:16	32,80	33,43	31,94	32,01	34,19	32,87	0,96	31,94	34,19
	C:16:1	1,69	0,84	1,68	1,67	0,00	1,18	0,75	0,00	1,69
	C:18	11,66	11,97	11,20	11,23	13,07	11,83	0,76	11,20	13,07
	C:18:1n9t	26,86	26,09	28,45	28,58	28,72	27,74	1,19	26,09	28,72
	C18:2n6c	2,51	2,59	2,58	2,50	2,74	2,58	0,10	2,50	2,74
	C:18:3n3	0,87	0,87	0,86	0,84	0,00	0,69	0,38	0,00	0,87
	ΣSFA	67,08	68,69	65,43	65,49	68,54	67,05	1,58	65,43	68,69
	ΣUFA	32,92	31,31	34,57	34,51	31,46	32,95	1,58	31,31	34,57
	ΣMUFA	29,54	27,86	31,13	31,17	28,72	29,68	1,47	27,86	31,17
ΣPUFA	3,38	3,45	3,44	3,34	2,74	3,27	0,30	2,74	3,45	

Kontrol sütü olarak kullanılan linoleik asit ve çörek otu yağı ilavesi olmayan sütten herhangi bir kültür ilavesi olmadan kontrol olarak üretilen peynirin (KK) olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu izelge 4.29'da verilmiştir. Bu peynirde bulunan majör yağ asitleri diğer tüm peynirlerde olduğu gibi %32,7 ile palmitik asit ve %29,4 ile oleik asit olarak belirlenmiştir. Miristik asit ve stearik asit %11,6 oranıyla ikinci en yüksek orana sahip yağ asidi grubudur. Bu alışma için önem arz eden linoleik asit miktarı ise ortalama herhangi bir ilave olmamasına rağmen %2,1 olarak belirlenmiştir. Kısa zincirli yağ asitleri incelendiğinde bütirik, kaproik ve kaprilik asit oranlarıyla sırasıyla %2,1; %1,5 ve %0,8 olarak belirlenmiştir.

Olgunlaşma boyunca tekli doymamış yağ asitleri oranlarında önemli bir değişim gözlemlenmezken çoklu doymamış yağ asitleri olgunlaşma başında %3,5 olan oranı olgunlaşma sonunda sıfırlanmıştır. Doymuş yağ asitleri oranları ise olgunlaşma başında %65,4'ten olgunlaşma sonunda %68,8 oranına yükselmiştir.

Çizelge 4.29. Herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan süttten herhangi bir kültür ilavesi olmadan Kontrol olarak üretilen peynirin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu % değişimi

Kontrol (K)										
		3	14	30	60	90	Ortalama	±sd	min	max
Kontrol (K)	C:4	2,00	2,04	2,20	0,00	2,31	2,14	0,14	2,00	2,31
	C:6	1,65	1,65	1,81	0,64	1,77	1,51	0,49	0,64	1,81
	C:8	1,01	1,00	1,08	0,92	0,00	0,80	0,45	0,00	1,08
	C:10	2,45	2,33	2,46	2,44	2,40	2,42	0,05	2,33	2,46
	C:12	2,99	2,95	2,90	3,06	2,82	2,94	0,09	2,82	3,06
	C:14	11,31	11,55	11,15	11,92	11,98	11,58	0,36	11,15	11,98
	C:14:1	1,00	0,97	0,96	0,96	0,00	0,78	0,44	0,00	1,00
	C:15	0,84	0,84	0,76	0,81	0,00	0,65	0,37	0,00	0,84
	C:16	31,88	32,67	31,54	33,28	34,19	32,71	1,07	31,54	34,19
	C:16:1	1,67	0,67	1,66	1,70	0,00	1,14	0,77	0,00	1,70
	C:18	11,25	11,56	10,63	11,58	13,07	11,62	0,90	10,63	13,07
	C:18:1n9t	28,48	28,37	29,22	29,26	31,46	29,36	1,24	28,37	31,46
	C18:2n6c	2,59	2,54	2,76	2,60	0,00	2,10	1,18	0,00	2,76
	C:18:3n3	0,86	0,87	0,88	0,83	0,00	0,69	0,38	0,00	0,88
	ΣSFA	65,39	66,58	64,52	64,65	68,54	65,94	1,67	64,52	68,54
	ΣUFA	34,61	33,42	35,48	35,35	31,46	34,06	1,67	31,46	35,48
	ΣMUFA	31,16	30,01	31,84	31,92	31,46	31,28	0,77	30,01	31,92
	ΣPUFA	3,45	3,41	3,64	3,43	0,00	2,79	1,56	0,00	3,64

Yukarıda Çizelge 4.18-29' de verilen veriler her bir peynir örneğinin olgunlaşma periyotlarında yağ asitleri kompozisyonunu ayrı ayrı göstermektedir. Örnekleri karşılıklı karşılaştırmalarını yapabilmek için ortalama yağ asitleri alınıp karşılaştırma tablosu yapıp sonuçları Çizelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Peynir örneklerine ait ortalama yağ asitleri kompozisyonu (%)

Yağ Asitleri	Linoleik Asit (L)				Çörek otu yağı (Ç)				Kontrol (K)				
	Kültür	F	T	F+T	K	F	T	F+T	K	F	T	F+T	K
C:4	2,14	2,09	2,19	2,03	2,04	2,00	2,14	2,01	2,01	1,59	2,05	2,05	2,14
C:6	1,56	1,67	1,76	1,65	1,63	1,65	1,58	1,64	1,64	1,31	1,67	1,67	1,51
C:8	1,17	0,74	1,05	1,03	0,95	0,96	1,00	0,96	0,96	0,79	1,00	1,01	0,80
C:10	2,23	2,39	2,45	2,36	2,34	2,31	2,31	2,40	2,40	1,96	2,46	2,44	2,42
C:12	2,73	2,89	2,90	2,87	2,84	2,79	2,81	2,88	2,88	2,40	2,97	2,97	2,94
C:14	11,45	11,55	11,36	11,36	11,50	11,41	11,63	11,74	11,74	11,98	11,69	11,71	11,58
C:14:1	0,56	0,53	0,72	0,86	0,70	0,69	0,67	0,75	0,75	0,67	0,87	0,77	0,78
C:15	0,48	0,48	0,64	0,68	0,65	0,63	0,61	0,88	0,88	0,52	0,69	0,68	0,65
C:16	32,53	32,65	33,47	33,46	33,95	33,82	34,70	33,63	33,63	34,54	32,60	32,87	32,71
C:16:1	0,66	0,63	1,18	1,38	0,97	1,07	0,77	1,49	1,49	1,13	1,38	1,18	1,14
C:18	12,00	12,31	11,44	11,47	12,11	11,91	12,12	11,80	11,80	12,17	11,54	11,83	11,62
C:18:1	28,71ab	28,45ab	27,38ab	27,45ab	26,94ab	27,30ab	26,49b	26,37b	26,37b	27,97ab	28,16ab	27,74ab	29,36a
C:18:2	3,06	2,92	2,79	2,67	2,61	2,65	2,55	2,64	2,64	2,50	2,45	2,58	2,10
C:18:3	0,73	0,71	0,69	0,76	0,81	0,78	0,79	0,77	0,77	0,46	0,67	0,69	0,69
ΣSFA	66,28	66,77	67,25	66,89	68,01	67,49	68,90	67,98	67,98	67,26	66,48	67,05	65,94
ΣUFA	33,72	33,23	32,75	33,11	31,99	32,35	31,10	32,02	32,02	32,74	33,52	32,95	34,06
ΣMUFA	29,93	29,60	29,27	29,68	28,61	29,06	27,94	28,61	28,61	29,78	30,40	29,68	31,28
ΣPUFA	3,79	3,64	3,47	3,43	3,38	3,28	3,16	3,41	3,41	2,96	3,12	3,27	2,79

a,b (→)aynı satırda örnekler arasındaki farkı göstermektedir (p<0.05).

F: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, T: *P. thoenii*, F+T: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*+ *P. thoenii*, K: Kontrol-kültür ilavesi yok

Peynir örneklerinin hepsinde palmitik asit (C16) en yüksek oranda bulunmuştur. Çörek otu yağı ilaveli süttten her iki kültürün beraber kullanılmasıyla üretilen peynir (ÇFT) örneği %34,7 oranıyla en yüksek, linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) ise %32,5 oranıyla en düşük palmitik asit değerlerine sahiptirler. Linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmiş süttlerden her iki kültürün beraber kullanılarak üretildiği peynirler (LFT ve ÇFT) diğerlerinden daha yüksek palmitik asit oranına sahiptir. Diğer uzun zincirli yağ asitlerinin aksine palmitik asidin de kısa ve orta zincirli yağ asitleri gibi peynirde gerçekleşen lipoliz seviyesini belirlemeye yardımcı olabileceği ve oksidasyon kaynaklı kötü tat ve koku gibi problemlere neden olabileceği bildirilmiştir (Guler ve Uraz, 2003).

Palmitik asitten sonra en yüksek oranda bulunan yağ asidi oleik asittir. Oleik asit (C18:1) oranının en yüksek olduğu peynir kontrol süttünden herhangi bir kültür ilavesi olmayan peynirken (KK) (%29,4), en düşük olduğu peynir çörek otu yağı ilaveli süttten herhangi kültür ilavesi olamadan üretilen peynirdir (ÇK) (%26,4). Hayaloğlu ve Karabulut (2013) içlerinde Mihaliç peynirinin de bulunduğu 11 farklı Türk peynirinin yağ asitlerini inceledikleri çalışmada baskın yağ asitlerini palmitik ve oleik asit olarak bildirmişler. Türk peynirlerinin yağ asitleri ve kolesterol seviyelerini inceleyen başka bir çalışmada da tüm peynir çeşitlerinde en baskın yağ asitleri palmitik ve oleik asit olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Mihaliç peynirinde %29,5 oranında palmitik asit ve %22,7 oranında oleik asit belirlenmiştir (Donmez vd., 2005).

Orta zincirli yağ asitlerinden olan miristik asit (C14) palmitik ve oleik asitten sonra peynirlerde en çok bulunan yağ asididir. Peynirlerde miristik yağ asitleri oranı %11,4 ile 12 arasında değişmektedir. En yüksek miristik asit oranı kontrol süttünden *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (KF) belirlenirken en düşük oran linoleik asit ilave edilen süttten her iki kültürün beraber kullanılmasıyla yapılan peynire (LFT) aittir. Tüm peynirlerin miristik asit seviyeleri birbirine çok yakın ve aralarında anlamlı bir fark belirlenememiştir ($p>0,05$). Özer (2015) farklı starter kültürler ile ürettiği Mihaliç peynirlerinde miristik asit oranlarını %10,98-12,91 arasında belirlemiştir. Bizim çalışmamızda belirlenen değerler ile paralel sonuçlar bulmuşlardır. Miristik asit diğer orta zincirli yağ asitleri arasında bu araştırma kapsamındaki bütün peynirlerde en yüksek orana sahip orta zincirli yağ asididir.

Orta zincirli yağ asitlerinden kaprik asit (C10) ve laurik asit(C12) tüm peynirlerde sırasıyla %1,96-2,46 ve %2,4-2,97 aralığında değişmektedir. Kontrol sütünden yapılan peynirler (*P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan hariç) (KT, KFT ve KK) en yüksek kaprik ve laurik asit oranlarına sahiptir. En düşük oranlar ise yine aynı sütte *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) örneğindedir. Olgunlaşma boyunca örnekler arası farklılık önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Mihaliç peyniri ile yapılan diğer çalışmalarda kaprik asit ve laurik asit oranları benzer bulunmuştur (Hayaloglu ve Karabulut, 2013)

Uzun zincirli yağ asitlerinden stearik asit (C18) miristik asitle benzer oranlarda peynirlerde bulunmaktadır. Bütün peynirlerdeki stearik asit oranları %11,4-12,3 arasında değişmektedir. En yüksek stearik asit oranı linoleik asit ilave edilmiş sütte *P. thoenii* ile yapılan peynir (LT) örneğinde belirlenmiştir. En düşük oran ise yine aynı sütte her iki kültürün beraber kullanımıyla üretilen peynir (LFT) örneğine aittir. Kontrol olarak yapılan kültürsüz peynirler ile karşılaştırma yapıldığında kullanılan her süt çeşidinde de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirler daha yüksek stearik asit oranına sahiptir. PAB ilave edilerek üretilen Emmental peynirleri inceleyen bir çalışmada PAB'ların peynirde gerçekleşen lipolitik aktiviteden birincil sorumlu olduklarını ve LAB ile aralarındaki interaksiyonun da lipolizi etkilediği belirtilmiştir. Lipolitik aktivitesi yüksek olan suşlarla yapılan Emmental peynirlerinde uzun zincirli yağ asitleri miktarının daha fazla olduğu görülmüştür (Chamba ve Perreard, 2002). Farklı starter kültürler ile üretilen Mihaliç peynirlerinin yağ asitlerini inceleyen bir çalışmada ise kültür kullanımı stearik asit oranının azalmasına neden olmuştur. Bizim çalışmamızın aksine kontrol grubunda %11,3 olarak belirlenen stearik asit oranları starter kültür kullanılan ve farklı haşlama sıcaklıkları uygulanan peynirlerde %9'a kadar düşmüştür (Özer ve Kesenkaş, 2019). Kullanılan starter kültürünün çeşidi ve uygulanan proses parametreleri özellikle ısıl işlem uygulamaları yağ asidi kompozisyonunu etkilemektedir.

Tekli doymamış yağ asitlerinden miritoleik asit (C14:1) ve palmitoleik asit (C16:1) ile doymuş yağ asidi pentadekonoik asit (C15:0) tüm peynir örneklerinde miktarı en az bulunan yağ asitleridir. Miritoleik asit oranları %0,53-0,87 arasında, palmitoleik asit oranları %0,63-1,49 arasında değişirken pentadekonoik asit ise %0,48-0,88 aralığında belirlenmiştir.

Çoklu doymamış yağ asitlerinden linoleik asit (C18:2) KLA üretim metabolizmasında substrat olarak kullanıldığı için bu çalışmada önem arz etmektedir. Peynir yapımı için kullanılacak sütler bu nedenle saf linoleik asit ve linoleik asitçe zengin çörek otu yağı ilavesi yapılmıştır. Fakat linoleik asidin inhibe edici etkisi Bölüm 4.4'te değerlendirilmiş ve toksik etki göstermeyecek seviyede linoleik asit ilavesi yapılmıştır. İstatiksel olarak peynir örneklerinin linoleik asit oranları arasında anlamlı bir fark olmasa da en yüksek linoleik asit oranı %3,1 ile saf linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (LF) aittir. En düşük linoleik asit oranı ise herhangi bir linoleik asit ilavesi olmayan kontrol sütünden yapılan peynirlerde görülmüştür. En düşük oran ise %2,1 ile kontrol sütünden yapılan kültür ilavesiz peynire (KK) aittir. Mihaliç peynirlerinin linoleik asit oranlarını inceleyen diğer çalışmalarda %1-3 aralığında linoleik asit olduğu bildirilmiştir (Donmez vd., 2005; Hayaloglu ve Karabulut, 2013; Özer ve Kesenkaş, 2019). Kullanılan sütün türü, hayvan beslenmesi ve peynir üretim prosesi bu farklılıklara neden olabilmektedir. Olgunlaşma zamanının linoleik asit miktarında önemli bir etkisi belirlenememiştir ($p>0,05$). Daha önce yapılan çalışmalarda da olgunlaşma boyunca peynirlerde linoleik asit miktarının sabit kaldığı bildirilmiştir (Buccioni vd., 2010; Zlatanov, Laskaridis, Feist ve Sagredos, 2002).

Bir diğer çoklu doymamış yağ asidi linolenik asit (C18:3) %1'in altında olmakla beraber bütün peynir örneklerinde belirlenmiştir. En yüksek linolenik asit oranı %0,81 ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (ÇF) aittir. Peynirlerin linolenik asit içerikleri arasında önemli bir fark belirlenememiştir ($p>0,05$).

Peynirlerin genel olarak doymuş yağ asitleri miktarı değerlendirildiğinde %65,9 ile %68,9 arasında değiştiği görülmektedir. En yüksek doymuş yağ oranı çörek otu yağı ilaveli her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirdir (ÇFT). En düşük oran ise aynı süttten kültür ilavesi yapılmadan üretilen peynirdir (ÇK). Peynirlerin doymuş yağ oranları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da çörek otu yağı ilave edilen süttten yapılan peynirlerin (*P. thoenii* ile yapılan hariç) diğerlerine göre az miktarda daha fazla doymuş yağ asidi içerdiği görülmektedir.

Doymamış yağ asitleri incelendiğinde %31,1-34,1 aralığında değiştiği görülmektedir. Kontrol sütünden yapılan kültür ilavesiz peynirin (KK) en yüksek oranda doymamış yağ asitlerine sahip olduğu görülürken tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri

dikkate alındığında bu peynirin en düşük oranda çoklu doymamış yağ asidine sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) %3,79 çoklu doymamış yağ asit oranıyla en yüksek seviyeye sahiptir. Aynı kültür ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten yapılan peynirde (ÇF) bu oran %3,28 dir. Linoleik asit ilavesi çoklu doymamış yağ asit miktarını olumlu yönde etkilemiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirler kontrol sütü haricinde diğer kültür ilavelerine göre daha yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidine sahip olmuştur. Bütün bu bilgilerin ışığında süte linoleik asit ilavesinin çoklu doymamış yağ asitlerini arttırmada etkisi olduğu görülmüştür.

Peynirle farklı laktik asit bakterilerinin ilave edilmesiyle hazırlanan peynirleri inceleyen bir çalışmada yağ asitleri değişimi incelendiğinde olgunlaşma zamanının yağ asitleri içeriğini değiştirmedini fakat kullanılan kültür tipine göre doymuş yağ asitlerinde azalma, doymamış yağ asitlerinde artma gözlemlendiği raporlanmıştır (Renes vd., 2019). Bizim çalışmamızda da olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu anlamı oranda değişmemiş fakat çoklu doymamış yağ asitleri uygulanan linoleik asit ve kültür türüne göre artış göstermiştir.

4.10.8. Konjuge Linoleik Asit Kompozisyonu

İnsan sağlığı açısından KLA içeren gıdaların tüketimi çok önemlidir. KLA doğal olarak hayvansal gıdalarda ve özellikle süt ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Süt ürünlerinde KLA miktarı 2-37mg/g yağ olarak değişmektedir (Bauman vd., 1999). Farklı sütler ile üretilen Türk peynirlerinde bu oranlar 4,4-10,4 mg/g yağ arasında değişmektedir (Donmez vd., 2005) Bu miktarlar çevresel ve fiziksel faktörlere göre değişmekle birlikte KLA'nın bahsi geçen sağlık etkilerinden fayda sağlayacak oranlarda değildir. Sağlıklı 70 kg olan bir bireyin sağlık üzerinde olumlu etkilerini görebilmek için günde 3g KLA tüketimi tavsiye edilmektedir (Ip vd., 1994). Bu çalışmanın amacı olan yüksek KLA içeren peynir üretimi bu nedenlerle ortaya çıkmıştır. Bu çalışma kapsamında üretilen peynirlerin KLA analizi Bölüm 3.5.9'da belirtildiği gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.31'de gösterilmiştir.

Peynirlerin KLA oranları olgunlaşma sonunda 3,93-6,28 mg/g yağ arasında değişmektedir. En yüksek KLA miktarı linoleik asit ilave edilmiş süttten her iki kültürün beraber kullanımıyla üretilen peynir örneğine (LFT) aittir. Olgunlaşmanın peynirlerin KLA

miktarı üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır ($p>0,05$). Fakat kullanılan linoleik asit kaynağı ve kültür türü KLA oranını anlamlı seviyede etkilemiştir ($p<0,05$). Varyans analizlerinin sonucu Çizelge 4.31 ve Şekil 4,11’de gösterilmiştir.

Linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirler incelendiğinde olgunlaşmanın başında bütün peynirlerdeki KLA oranı anlamlı olarak birbirinden farklı değildir. Fakat olgunlaşmanın 14. günü sonrası herhangi kültür ilavesi olmayan peynirdeki (LK) KLA miktarı diğerlerinden önemli derecede düşüktür ($p>0,05$). Buradan ilave edilen kültürlerin KLA üretimini olumlu etkilediği sonucuna varılmaktadır. Kültürler arası farka bakıldığında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirin (LF) ve her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirin (LFT) KLA miktarları bütün olgunlaşma boyunca aynı grupta yer alırken *P. thoenii* ile yapılan peynirin (LT) KLA oranı 30. gün haricinde istatistiksel olarak anlamlı derecede diğerlerinden ayrılmaktadır ($p<0,05$). Linoleik asit varlığında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*’nin KLA üretimi *P. thoenii*’den daha fazladır. İki kültürün beraber kullanımı ile *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına kullanımı arasında KLA üretimi için anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.31. Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma süresince toplam KLA miktarlarının (mg/g) değişimi

LA kaynağı: Linoleik Asit (L)						
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (K)	
Zaman	3. Gün	5,65±0,19 A b	5,55±0,29 A a	5,68±0,16 A b	5,23±0,19 A a	
	14. Gün	5,98±0,13 AB ab	5,75±0,07 B a	6,13±0,15 A a	5,21±0,05 C a	
	30. Gün	6,09±0,14 A a	5,72±0,20 AB a	6,15±0,17 A a	5,30±0,19 B a	
	60. Gün	6,27±0,12 A a	5,67±0,37 BC a	6,23±0,12 AB a	5,31±0,16 C a	
	90. Gün	6,24±0,05 A a	5,69±0,15 B a	6,28±0,21 A a	5,33±0,22 B a	
LA kaynağı: Çörek Otu Yağı (Ç)						
Kültür türü		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (K)	
Zaman	3. Gün	5,05±0,07 AB a	4,85±0,16 B a	5,21±0,17 A a	4,95±0,07 AB a	
	14. Gün	5,18±0,09 A a	5,08±0,03 B a	5,35±0,07 A a	5,02±0,07 B a	
	30. Gün	5,15±0,20 A a	5,14±0,22 A a	5,30±0,17 A a	5,13±0,19 A a	
	60. Gün	5,24±0,16 A a	5,07±0,12 A a	5,33±0,17 A a	5,04±0,10 A a	

	90. Gün	5,27±0,24 A a	5,09±0,17 A a	5,34±0,14 A a	5,06±0,06 A a
LA kaynağı: Kontrol (K)					
	Kültür türü	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (K)
Zaman	3. Gün	4,75±0,10 A a	4,38±0,10 B a	4,73±0,16 A a	4,03±0,11 C a
	14. Gün	4,74±0,07 A a	4,40±0,19 B a	4,90±0,12 A a	4,04±0,05 C a
	30. Gün	4,96±0,12 A a	4,42±0,24 B a	4,93±0,23 A a	4,07±0,03 B a
	60. Gün	4,94±0,11 A a	4,54±0,17 B a	5,06±0,18 A a	4,05±0,09 C a
	90. Gün	4,92±0,17 A a	4,56±0,26 A a	5,03±0,23 A a	3,93±0,10 B a

A,B,C (→) aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı göstermektedir (p<0,05)
a,b,c, (↓) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir (p<0,05).

Çörek otu yağı yüksek linoleik asit içermesi nedeniyle bu çalışmada konjuge linoleik asit üretimi için alternatif linoleik asit kaynağı olarak kullanılmış ve süte ilave edilmiştir. Çörek otu yağı içerdiği yağ asitlerinin yanında önemli fenolik bileşenlere de sahiptir. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten yapılan peynirler incelendiğinde, olgunlaşma periyotları arasında KLA oranlarında anlamlı bir fark belirlenemezken (p>0,05) linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirlerden anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür (p<0,05) Olgunlaşma sonunda en yüksek KLA miktarı 5,34 mg/g ile iki kültürün beraber kullanıldığı peynire (ÇFT) aittir. Olgunlaşma başında linoleik asit ilaveli peynirlerde olduğu gibi iki kültürün beraber kullanıldığı peynir (ÇFT) en yüksek KLA miktarına (5,21 mg/g) sahiptir. *P. thoenii* ile bu süttten yapılan peynir (ÇT), linoleik asit ilaveli süttten yapılanın (LT) aksine olgunlaşma boyunca hep daha düşük KLA içermiştir. Peynirlerin toplam PAB sayısı incelendiğinde bu peynirin diğerlerinden daha düşük toplam PAB sayısına sahip olduğu görülmüştür. Buradan çörek otu yağında bulunan diğer yağ asitleri ve fenolik bileşenlerin *P. thoenii* kültürünü olumsuz etkilediği sonucuna varılabilir.

Olgunlaşmanın 30. gününden sonra farklı kültür ilave edilen peynirlerin hepsi kontrol peyniri (ÇK) ile aynı grupta yer almış ve anlamlı bir farklılık göstermemiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kültürü de olgunlaşma ilerledikçe çörek otu yağından etkilenmiş ve KLA üretimi linoleik asit içeren süttten daha az olmuştur. Kontrol grubu olarak üretilen kültürsüz peynir (ÇK) de diğerleriyle aynı miktarda KLA üretebilmiştir (5,06 mg/g). Çörekotunun yüksek fenolik içeriği mikrobiyotada bulunan refakatçi mikroorganizmaları etkileyerek KLA üretimini etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

Süte yapılan çörek otu yağı ilavesi saf linoleik asit ilavesi kadar KLA üretimine katkı sağlamamıştır.

Süte herhangi bir linoleik asit ilavesi olmadan yapılan peynirlerde KLA miktarı olgunlaşma sonunda 3,93-5,03 mg/g arasında değişmektedir. Bu değerler linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmiş süttten hazırlanan peynirlerin değerlerinden daha düşüktür. Açıkça görülmektedir ki KLA üretimi için linoleik asit ilavesi gerekmektedir. Olgunlaşma süresi bu sütle yapılmış peynirlerin KLA oranlarına anlamlı bir etki göstermemiştir ($p<0,05$). Kültürler arası farka bakıldığında olgunlaşma başında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (KF) ve iki kültürün beraber kullanıldığı (KFT) peynirlerin KLA miktarı aynı grupta yer almıştır. *P. thoenii* ile yapılan peynir (KT) onlardan daha düşük ve hiç kültür ilave edilmeyen örnek (KK) ise en düşük miktarda KLA'ya sahiptir. Olgunlaşma sonunda ise *P.thoenii* ile yapılan peynirin (KT) KLA içeriği de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve iki kültürün beraber kullanıldığı peynirlerdeki ile aynı grupta yer almıştır. Sütte herhangi bir linoleik asit ilavesi olmadığı için kültürler benzer oranlarda KLA üretebilmiştir.

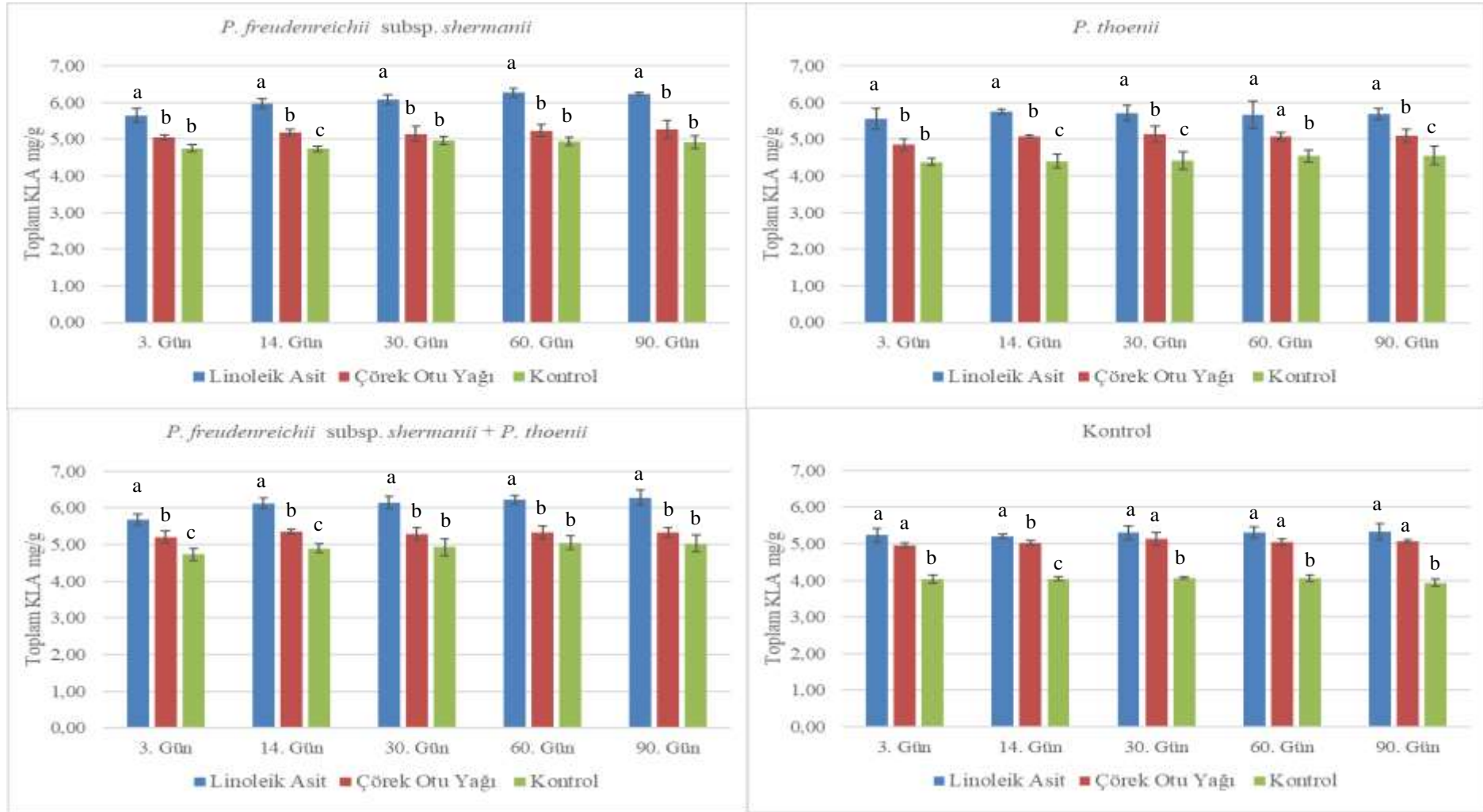
Süte ilave edilen linoleik asit KLA üretimini kesinlikle arttırmaktadır. Alternatif linoleik asit kaynağı olan çörek otu yağı içeriğinde bulunan fenolik maddeler nedeniyle saf linoleik asit kadar KLA üretimini desteklemese de kontrol süttüne göre daha fazla KLA üretimine neden olmuştur. Arttırılmış KLA üretimi için süte yapılacak linoleik asit ilavesi elzemdir. Kültürler arası farkı gözlemek için kültürlerin hangi sütte ne kadar KLA üretebildiği Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Olgunlaşma boyunca *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* en çok saf linoleik asit ilave edilen süttten yapılan peynirde (LF) KLA üretebilmiştir. Olgunlaşmanın başında ve sonunda çörek otu yağı ilaveli (ÇF) ve kontrol süttünden yapılan (KF) peynirlerin KLA miktarları aynı grupta yer alıp linoleik asit ilaveli peynirin (LF) KLA miktarından anlamlı olarak farklılık göstermişlerdir ($p<0,05$). Olgunlaşmanın sadece 14. gününde kontrol süttünden yapılan peynirin (KF) KLA oranı çörek otu yağı ilave edilmiş süttten anlamlı oranda daha düşüktür ($p<0,05$).

P. thoenii ile yapılan peynirlerde de olgunlaşma boyunca en yüksek KLA miktarı saf linoleik asit ilave edilen süttten yapılan peynirde (LT) gözlemlenmiştir. Linoleik asit ilavesi yapılmayan kontrol süttünden yapılan peynirler (KT) ise olgunlaşma boyunca hep en düşük KLA içeriğine sahiptir. Olgunlaşmanın 60. günü dışında, çörek otu yağı ilaveli

sütten yapılan peynirin (ÇT) KLA miktarı kontrolden yüksek fakat linoleik asit ilaveli peynirden düşük olmuştur.

Kültürler beraber kullanıldığında en yüksek KLA oranlarına ulaşılmıştır. Yine en yüksek değerler saf linoleik asit ilave edilmiş sütten üretilen peynirlerde gözlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına veya beraber kullanıldığında en yüksek KLA üretimini gerçekleştirmektedir. Çörek otu yağı içeren sütte her iki kültür olgunlaşmanın 3.ve 14. günlerinde kontrol sütünden üretilen peynirdeki KLA dan daha fazla olmasına karşın olgunlaşmanın 30. gününden sonra kontrol örneği ile arasında anlamlı bir fark kalmamıştır ($p>0,05$). Şekil 4.11’de Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam konjuge linoleik asit miktarı verilmiştir.



a,b,c: farklı harfler ile gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.

Şekil 4.11. Mihaliç peynirlerinin ilave edilen kültür türüne göre olgunlaşma boyunca toplam konjuge linoleik asit miktarı

Kültür ilavesi olmadan üretilen peynirler incelendiğinde KLA miktarları diğer peynir örneklerinden önemli derecede daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Sütün doğal mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmalar saf linoleik asit ve çörek otu yağını tolere ederek KLA üretimine katkı sağlamışlardır. Özellikle sütte bulunan laktik asit bakterileri KLA üretebilme potansiyeline sahiptirler.

KLA açısından en zengin peynirler linoleik asit ilave edilmiş süttten sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (LF) ve her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirlere (LFT) aittir. Kontrol peynirine (LK) göre %17,1 (LF) ve %17,8 (LFT) daha fazla KLA içermektedirler. Linoleik asit ilavesinin KLA üzerindeki etkisi ise kontrol süttünden yapılan peynirlere göre (KF VE KFT) %26,8 ve %24,5 oranındadır. Herhangi bir linoleik asit ve kültür kullanılmadan üretilen peynirle (KK) karşılaştırıldığında ise KLA miktarları %58,8 (LF) ve %59,8 (LFT) oranlarında artmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki tek başına kültür ilavesi ya da tek başına linoleik asit ilavesi KLA üretimini artırırken, her iki uygulamanın beraber yapılması sinerjistik etki yaratarak KLA üretimini daha fazla arttırmaktadır.

Çalışma kapsamında toplam KLA miktarının yanı sıra KLA izomerlerinin oluşumu olgunlaşma boyunca incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.32’de gösterilmiştir. KLA izomerlerinden rumenik asit (*c9-t11*) bütün peynir örneklerinde en çok bulunan izomerdir. Rumenik asit süt ve süt ürünlerinde bulunan baskın KLA izomeridir (Kramer vd., 1998). Rumenik asit ile beraber *t10-c12*, *c11-t13* ve diğer tüm *cc* ve *tt* izomerleri de çalışma kapsamında incelenmiştir.

Olgunlaşma süresince tüm peynirlerdeki rumenik asit değişimi istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Olgunlaşmanın başında linoleik asit ilave edilen süttten yapılan peynirlerde (LF, LT, LFT ve LK) *c9-t11* oranı %88,3-79,8 arasında yer almaktadır. Kültürsüz hazırlanan peynir (LK) en düşük *c9-t11* oranına sahiptir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) ve iki kültürün beraber kullanıldığı peynir (LFT) aynı grupta yer alırken, *P. thoenii* ile yapılan peynir (LT) anlamlı olarak farklı olduğundan onlardan ayrılmıştır ($p<0,05$). Olgunlaşma sonunda ise *c9-t11* oranı %88,4 ile %81,6 arasında değişmektedir. En yüksek rumenik asit oranı *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (LF) gözlemlenirken her iki kültürün beraber kullanıldığı (LFT) ve sadece *P. thoenii* ile yapılan (LT) peynirler de aynı grupta yer almıştır. Kültürsüz yapılan peynir (LK) diğer peynirlerden anlamlı şekilde ayrılmıştır ($p<0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilen süttten yapılan peynirlerde olgunlaşma başında *c9-t11* izomer oranları %82,8 ile %87,9 arasında değişmektedir. En düşük oran linoleik asit ilave edilmiş sütlerden hazırlanan peynirlerde olduğu gibi kültürsüz hazırlanan peynirde (ÇK) iken en yüksek oran her iki kültürle beraber ile yapılan peynire (ÇFT) aittir. Olgunlaşma sonunda *c9-t11* izomer oranları istatistiksel olarak önemli derecede değişmemiştir ($p>0,05$). Fakat iki kültürün beraber kullanıldığı peynir (ÇFT) %87 oranı ile diğer peynir örneklerinden ayrılmıştır ($p<0,05$). Diğer peynirlerin (ÇF, ÇT ve ÇK) *c9-t11* izomerleri oranları arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). Çizelge 4.32'de Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma boyunca % KLA izomerlerinin değişimleri verilmiştir.

Çizelge 4.32. Mihaliç peynirlerinin olgunlaşma boyunca % KLA izomerlerinin değişimleri

LA kaynağı	Zaman (gün)	Linoleik Asit (L)				
		İzomer	Kültür türü	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)
c9-t11	3		87,48±0,47 a A	84,67±0,54 a B	88,32±0,98 a A	79,81±0,56 b C
	14		87,26±1,75 a A	84,12±0,80 a B	88,16±0,47 a A	80,94±0,64 ab C
	30		87,82±1,99 a A	86,21±1,01 a A	87,54±0,76 a A	81,16±0,43 ab B
	60		88,01±0,63 a A	84,69±0,52 a B	88,40±2,00 a A	81,49±0,75 a C
	90		88,20±1,60 a A	85,30±1,69 a A	88,40±1,19 a A	81,58±0,60 a B
t10-c12	3		0,41±0,04 b B	0,24±0,06 a BC	0,74±0,09 a A	0,07±0,13 a C
	14		0,55±0,06 ab A	0,34±0,05 a AB	0,49±0,07 a A	0,09±0,16 a B
	30		0,55±0,06 ab AB	0,30±0,04 a BC	0,67±0,18 a A	0,20±0,18 a C
	60		0,66±0,07 a AB	0,36±0,07 a B	0,82±0,17 a A	0,40±0,20 a B
	90		0,63±0,06 a A	0,36±0,04 a B	0,51±0,13 a AB	0,47±0,09 a AB
c11-t13	3		3,51±0,22 a A	2,94±0,13 a B	2,80±0,16 c B	3,05±0,20a AB

	14	3,52±0,24 a A	3,13±0,09 a A	3,53±0,30 b A	3,06±0,09 a A
	30	3,44±0,37 a AB	3,00±0,26 a B	3,72±0,13 ab A	3,18±0,26 a AB
	60	3,66±0,08 a AB	3,07±0,07 a C	3,91±0,16 ab A	3,33±0,18 a BC
	90	4,00±0,17 a AB	3,28±0,32 a C	4,12±0,09 a A	3,44±0,29 a BC
Σcc ve tt	3	8,65±0,36 a C	12,09±0,56 a B	8,18±1,09 a C	17,39±0,50 a A
	14	8,65±1,62 a C	12,43±0,85 a B	7,82±0,83 a C	15,93±0,88 ab A
	30	8,23±2,20 a B	10,58±1,14 a B	8,31±0,72 aB	15,21±0,50 b A
	60	7,65±0,47 a C	11,84±0,44 a B	7,06±1,51 a C	14,83±0,55 b A
	90	7,16±1,51 a C	11,01±1,54 a B	7,07±1,28 a C	14,61±0,50 b A
LA kaynağı	Zaman (gün)	Çörek Otu Yağı (Ç)			
İzomer	Kültür türü	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> +<i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (K)
c9-t11	3	83,06±1,00 a B	84,43±0,97 a B	87,88±0,35 a A	82,84±0,25 a B
	14	83,89±0,77 a AB	84,39±1,96 a AB	86,57±1,75 a A	82,61±0,38 a B
	30	83,33±1,75 a AB	83,90±1,77 a AB	87,68±1,55 a A	82,30±2,18 a B

	60	81,59±0,92 a B	85,01±0,57 a AB	87,84±0,72 a A	83,00±2,41 a B
	90	81,56±1,61 a B	83,36±1,20 a B	86,98±1,21 a A	82,86±0,57 a B
t10-c12	3	0,12±0,20 a A	0,30±0,10 a A	0,24±0,21 a A	0,21±0,19 b A
	14	0,38±0,03 a A	0,21±0,19 a A	0,47±0,05 a A	0,33±0,05 ab A
	30	0,20±0,18 a AB	0,36±0,06 a AB	0,10±0,17 a B	0,51±0,12 ab A
	60	0,31±0,02 a B	0,29±0,08 a B	0,21±0,19 a B	0,61±0,08 a A
	90	0,33±0,08 a A	0,41±0,18 a A	0,41±0,19 a A	0,25±0,22 ab A
c11-t13	3	1,74±0,21 b C	2,96±0,25 a B	3,50±0,23 ab A	2,80±0,08 b B
	14	2,16±0,19 b C	3,29±0,20 a AB	3,72±0,40 ab A	2,96±0,06 ab B
	30	2,18±0,15 b B	3,11±0,05 a A	3,04±0,16 b A	3,22±0,06 ab A
	60	2,89±0,18 a A	3,10±0,16 a A	3,66±0,50 ab A	3,29±0,23 a A
	90	3,13±0,20 a B	3,37±0,31 a B	4,14±0,10 a A	3,37±0,25 a B
Σcc ve tt	3	15,07±0,84 a A	12,29±1,25 a B	8,30±0,30 a C	14,45±0,31 a A
	14	13,56±0,96 a A	12,09±2,19 a AB	9,25±2,01 a B	14,11±0,37 a A
	30	14,39±1,84 a A	12,58±1,78 a AB	9,28±1,38 a B	14,05±2,03 a A

	60	15,27±0,88 a A	11,67±0,76 a AB	8,22±0,92 a B	13,12±2,32a A
	90	14,98±1,72 a A	12,88±1,43 a A	8,80±0,49 a B	13,490±,46 a A
LA kaynağı	Zaman (gün)	Kontrol (K)			
İzomer	Kültür türü	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> (F)	<i>P. thoenii</i> (T)	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i> (FT)	Kontrol (K)
c9-t11	3	86,16±1,77 a A	83,37±0,70 a AB	82,56±1,02 a B	81,82±0,54 a B
	14	85,44±1,90 a A	82,78±1,31 a A	82,96±1,25 a A	82,36±0,78 a A
	30	86,24±1,78 a A	82,15±0,59a A	82,83±2,13 a A	83,31±1,80 a A
	60	84,88±0,53 a A	82,11±1,31 a B	82,80±0,49 a AB	81,24±0,80 a B
	90	85,17±1,42 a A	83,79±2,36 a A	83,37±0,35 a A	81,50±0,69 a A
t10-c12	3	0,42±0,04 a A	0,20±0,18 a A	0,32±0,19 a A	0,10±0,18 a A
	14	0,41±0,07a A	0,35±0,10 a A	0,40±0,03 a A	0,07±0,13 a B
	30	0,36±0,07 a A	0,37±0,13 a A	0,38±0,03 a A	0,19±0,17 a A
	60	0,41±0,04 a A	0,46±0,18 a A	0,36±0,10 a A	0,21±0,20 a A
	90	0,50±0,14 a A	0,35±0,11 a A	0,43±0,09 a A	0,26±0,23 a A

c11-t13	3	2,360,45 b B	3,11±0,19 ab AB	3,76±0,66 a A	3,62±0,16 a A
	14	3,14±0,13 a A	2,81±0,15 b B	3,41±0,12 a A	3,16±0,10 a A
	30	3,40±0,14 a A	2,97±0,07 ab B	3,69±0,10 a A	3,51±0,20 a A
	60	3,57±0,39 a A	3,46±0,43 a A	3,78±0,27 a A	3,15±0,15 a A
	90	3,78±0,16 a AB	3,49±0,18 a B	3,99±0,14 a A	3,37±0,24 a B
Σcc ve tt	3	11,06±2,11 a B	13,28±0,79 a AB	13,30±1,02 a AB	14,41±0,61 a A
	14	10,98±1,69 a B	14,04±1,22 a AB	13,24±1,34 a AB	14,46±0,84 a A
	30	9,96±1,61 a B	14,520±,47 a A	13,26±2,15 a AB	13,01±1,63 a AB
	60	11,14±0,77 a B	14,00±0,80 a A	13,11±0,75 a AB	15,30±1,21 a A
	90	10,69±1,47 a B	12,29±2,09 a AB	12,26±0,46 aAB	14,89±0,56 a A

A,B,C (→) aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı göstermektedir (p<0,05)
a,b,c, (↓) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir (p<0,05).

Linoleik asit ilave edilmeden hazırlanan peynir örneklerinde olgunlaşma başında *c9-t11* oranı %81,8 ile %86,2 arasında değişmektedir. Olgunlaşma başında en yüksek *c9-t11*). *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (KF) gözlemlenmiştir. Kontrol olarak üretilen kültürsüz peynirin (KK) *c9-t11* oranı en düşük olmasına rağmen diğer kontrol sütünden üretilen peynirler (KF; KT ve KFT) ile arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p>0,05$). Olgunlaşmanın başında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirdeki (KF) *c9-t11* %86,2 oranı sadece *P. thoenii* ile yapılan peynirin (KT) oranı ile aynı grupta olmasına rağmen diğer örneklerden (KFT Ve KK) anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$). Olgunlaşma boyunca tüm peynirlerin rumenik asit oranlarında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Olgunlaşmanın sonunda ise en yüksek *c9-t11* oranı %85,2 ile yine *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (KF) aittir. Olgunlaşma başında olduğu gibi olgunlaşmanın sonunda da *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) en yüksek *c9-t11* oranına sahip fakat diğer örneklerden anlamlı olarak farklılığa sahip değildir ($p>0,05$).

KLA'nın diğer izomerlerinden biri olan *t10-c12* anti obezite etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. Süt ürünlerinde bu izomer ne yazık ki çok az miktarda bulunmaktadır (Luna, Juárez ve de la Fuente, 2007). Bu çalışma kapsamında üretilen tüm peynirlerde de bu izomer en düşük oranda bulunmuştur. Olgunlaşma süresinin bu izomerin üretilmesinde önemli bir etkisi belirlenememiştir ($p>0,05$).

Linoleik asit ilave edilen sütlerden üretilen peynirlerde *t10-c12* izomerinin oranı olgunlaşma başında ve sonunda %0,07-0,74 ve %0,36-0,63 arasında değişmektedir. Olgunlaşmanın başında her iki kültürün beraber kullanıldığı peynir (LFT) en yüksek *t10-c12* izomerine sahipken olgunlaşmanın sonunda %0,63 oranı ile *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) en yüksek orana sahiptir. Fakat *P.thoenii* ile yapılan peynir (LT) haricinde diğer peynir örnekleri arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir ($p>0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilen süttten yapılan örnekler incelendiğinde olgunlaşmanın başında *t10-c12* oranları 0,12 ile 0,30 arasında değişirken olgunlaşma sonunda %0,25 ile %0,41 arasında değişmektedir. Bu süttten yapılan peynirlerde ne olgunlaşma süresi ne de kullanılan kültür tipi *t10-c12* izomeri üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir ($p>0,05$).

Kontrol sütünden yapılan peynirlerde olgunlaşma süresi *t10-c12* izomeri üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir ($p>0,05$) Olgunlaşma başında en yüksek oran %0,42 ile *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (KF) aittir. Fakat diğer kültürler ile yapılan peynirlerin *t10-c12* izomer oranı da anlamlı olarak farklı değildir ($p>0,05$). Çörek otu yağı ilave edilen süttten üretilen peynirlerde olduğu gibi kullanılan kültür türü ve olgunlaşma süresi bu izomere önemli oranda etki etmemiştir ($p>0,05$).

KLA izomerlerinden *c11-t13* tüm peynirlerde yaklaşık %3 oranlarında belirlenmiştir. Olgunlaşma süresi bazı örneklerde anlamlı etkiye sahipken örneklerin büyük çoğunluğunda önemli bir etki belirlenememiştir ($p>0,05$). Kullanılan kültür türü bazı örneklerin *c11-t13* düzeyini önemli oranda etkilemiştir ($p<0,05$).

Linoleik asit ilave edilmiş süttten hazırlanan peynirlerin *c11-t13* izomeri oranı olgunlaşma başında %2,8-3,5 arasında değişirken olgunlaşma sonunda %3,3-4,1 arasında değişmiştir. Olgunlaşma başında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (LF) en yüksek orana sahip ve diğer örneklerin *c11-t13* düzeyinden önemli derecede yüksektir. Olgunlaşma sonunda ise *P. thoenii* (LT) ve kültürsüz (LK) hazırlanan peynirlerin *c11-t13* oranı (%3,3 ve %3,4) diğer iki peynirden anlamlı olarak düşüktür. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (LF) ve iki kültürün beraber kullanıldığı (LFT) örneklerdeki *c11-t13* oranı aynı grupta yer alarak birbirinden anlamlı olarak farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilmiş sütlerden hazırlanan örneklerde olgunlaşmanın başında ve sonunda sırasıyla *c11-t13* izomeri seviyesi %1,7-3,5 ve %3,1-4,1 arasında değiştiği görülmüştür. Olgunlaşma süresi *P. thoenii* ile yapılan peynirin (ÇT) *c11-t13* düzeyini anlamlı olarak etkilemezken ($p>0,05$) diğer örneklerinkinde 30. günde önemli değişiklikler görülmüştür. Olgunlaşmanın başında her iki kültürle beraber hazırlanan peynirin (ÇFT) *c11-t13* seviyesi en yüksek iken kültürsüz (ÇK) ve sadece *P. thoenii* ile hazırlanan (ÇT) peynirlerin izomer oranı daha düşük ve aynı grupta yer almıştır. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile hazırlanan peynir (ÇF) ise en düşük orana sahiptir (%1,7). Olgunlaşmanın sonunda ise iki kültür ile hazırlanan peynirin (ÇFT) *c11-t13* seviyesi diğer peynirlerden anlamlı olarak yüksek iken diğer peynirlerin bu izomer oranı aynı grupta yer almış ve önemli bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Linoleik asit ve çörek otu yağı ilave etmeden hazırlanan kontrol sütünden yapılan peynirlerde olgunlaşma başında *c11-t13* düzeyi %2,4-3,8 arasında değişirken olgunlaşma

sonunda %3,4-4,0 arasında değişmiştir. Olgunlaşma süresi sadece *P. thoenii* ile üretilen peynirlerin (KT) izomer seviyesini etkilerken diğerlerine anlamlı olarak etki etmemiştir ($p>0,05$). Olgunlaşmanın başında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile hazırlanan peynirin (KF) *c11-t13* oranı hariç tüm peynirlerin bu izomer oranı aynı grupta yer alırken, olgunlaşmanın sonunda her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirin (KFT) *c11-t13* izomer oranı en yüksek değere çıkararak diğerlerinden anlamlı olarak ayrılmıştır ($p<0,05$).

KLA'nın yukarıda bahsi geçen izomerleri dışında bilinen başka izomerleri de mevcuttur. Fakat bu çalışmada kullanılan KLA standardı ile bu izomerlere ilaveten toplam *cis-cis* ve *trans-trans* izomerleri belirlenebilmiştir. Olgunlaşma süresi genel olarak birçok peynirin toplam *cc* ve *tt* izomer oranını etkilemezken bazı örneklerde anlamlı etkiye neden olduğu görülmüştür. Peynirlerde kullanılan kültür türü ise kullanılan tüm süt türlerinde anlamlı değişikliklere neden olmuştur.

Linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirlerde olgunlaşma başında toplam *cc* ve *tt* izomer oranı en yüksek %17,4 ile kültürsüz hazırlanan peynirde (LK), en düşük ise %8,2 ile iki kültürün beraber kullanılmasıyla üretilen peynir örneğinde (LFT) gözlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile hazırlanan peynirin (LF) toplam *cc* ve *tt* izomerleri iki kültürün beraber kullanıldığı peynirdeki (LFT) ile aynı grupta yer alırken, *P. thoenii* ile hazırlanan peynirin (LT) izomer oranından anlamlı şekilde ayrılmıştır ($p>0,05$) Olgunlaşmanın sonunda ise benzer eğilim gözlemlenirken en yüksek *cc* ve *tt* izomer oranı kültürsüz peynirde (LK) en düşük ise iki kültürle hazırlanan peynirde (LFT) gözlemlenmiştir.

Çörek otu yağı ilaveli sütlerden hazırlanan örneklerde olgunlaşma süresi hiçbir peynirde anlamlı etki göstermemiştir ($p>0,05$). Kùltürler arası fark incelendiğinde olgunlaşmanın başında en yüksek toplam *cc* ve *tt* izomer oranı %15,1 olarak *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile hazırlanan peynirde (ÇF) belirlenmiştir. En düşük oran ise %8,3 olarak iki kültürle hazırlanan peynirde (ÇFT) görülmüştür. Olgunlaşma sonunda ise iki kültürle hazırlanan peynirin (ÇFT) haricinde tüm peynirlerin toplam *cc* ve *tt* izomer seviyesi aynı grupta yer alırken iki kültürle hazırlanan peynirin *cc* ve *tt* izomerleri diğerlerinden önemli oranda daha düşük seviyede belirlenmiştir ($p<0,05$).

Kontrol süttünden hazırlanan peynirler incelendiğinde ise olgunlaşma zamanının hiçbir peynir türünde önemli etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Kùltürler arası

farka bakıldığında ise bütün olgunlaşma dönemlerinde *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile hazırlanan peynirin (KF) toplam *cc* ve *tt* oranı en düşük olduğu görülmektedir. Olgunlaşma sonunda *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile hazırlanan peynir dışındaki bütün peynirlerin (KT, KFT ve KK) toplam *cc* ve *tt* izomer seviyesi aynı grupta yer almış ve aralarında önemli bir farka rastlanmamıştır ($p>0,05$). Kültürsüz hazırlanan peynir (KK) %14,9 oranı ile en yüksek toplam *cc* ve *tt* oranına sahiptir.

Olgunlaşma boyunca gerçekleşen oksidatif reaksiyonlar çift bağların yıkılarak KLA seviyesinin azalmasına neden olabilmektedir. KLA'nın yapısında bulunan konjuge çift bağlar, oksidasyon ve izomerizasyon reaksiyonlarına karşı linoleik ve linolenik asitten daha duyarlı olmalarına neden olmaktadır. Uzun olgunlaşma prosesleri hava teması, fermentasyon süresi gibi etkenlerden dolayı gerçekleşen oksidasyonlar KLA seviyesinin azalmasına neden olabilmektedir (Yang, Cao, Chen ve Chen, 2009). Bunun aksine bu çalışmada olgunlaşma süresi, genel olarak hiçbir yağ asidine anlamlı olarak etki etmemiştir. Süt ve peynirde yağ asitlerini ve özellikle KLA içeriğini inceleyen bir çalışmada bu çalışmadakine paralel olarak olgunlaşma sürecinin KLA içeriğini anlamlı şekilde etkilemediği göstermiştir (Luna, Fontecha, Juárez ve De La Fuente, 2005). Feta peynirlerinde KLA seviyesini inceleyen başka bir çalışmada daha uzun olgunlaştırma süresine sahip sert peynirlerin kısa olgunlaştırma süresine sahip peynirlere göre daha fazla KLA içeriğine sebep olduğunu belirtmektedir (Zlatanov vd., 2002) Salamurada olgunlaştırma oksidatif reaksiyonları engellemiş olabileceğinden KLA seviyesinde değişim gözlenmemiştir.

Fransız Emmental tipi peynirlerin incelendiği bir çalışmada iki farklı propiyonik asit bakterisi ilave edilmiş peynirlerin ortalama KLA seviyeleri 8,6 ve 8,4 mg/g yağ olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada olgunlaşma boyunca takip edilen peynirlerin hem toplam KLA seviyesi hem de izomer kompozisyonu anlamlı şekilde değişmemiştir. Kullanılan PAB kültürleri düşük lipolitik aktiviteye sahip olduğu için KLA üretimi üzerinde anlamlı bir etki gösterememişlerdir. Emmental peynirdeki KLA seviyesi direk olarak sütte bulunan KLA seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (Silke Gnädig vd., 2004) Bizim çalışmamızda ise hem ilave edilen kültürün hem de linoleik asidin KLA oranını arttırdığı görülmüştür.

Olgunlaşma zamanının aksine peynir yapımında kullanılan kültür türü ve süte ilave edilen linoleik asit kaynağı KLA seviyesini anlamlı derecede etkilemiştir ($p>0,05$). Rumenik asit izomeri dikkate alındığında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına ya

da *P. thoenii* ile beraber kullanıldığında en yüksek verimi sağlamışlardır. Saf linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirler ise her zaman kontrol sütünden daha fazla rumenik asit içermiştir. *P. thoenii* kültürü tek başına kullanıldığında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 'den daha düşük üretime sebep olmuştur.

Werner, Luedecke ve Shultz (1992) 3 farklı Çedar tipi peynirle yaptıkları çalışmada kullanılan kültür türünün, proses şartlarının ve olgunlaştırma süresinin KLA miktarı üzerinde önemsiz olduğunu fakat KLA izomer dağılımını önemli derecede etkilediğini belirtmişlerdir. Buccioni vd. (2010) yaptıkları çalışmada KLA miktarının aynı kalsa da izomer kompozisyonunun uygulanan proses türüne göre değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca starter kültür ilavesi yapımından hemen sonra rumenik asit miktarında artış olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da peynir üretimi için kullanılan kültür türü izomer dağılımını anlamlı oranda etkilemiştir ($p < 0,05$):

Süte yapılan linoleik asit ilavesinin KLA üretimini arttırdığı bu çalışmada belirlenmiştir. Linoleik asit ilavesi kullanılan kültür türüne göre kontrol sütüne göre %25-40 daha fazla KLA üretime neden olmuştur. Bazı çalışmalarda linoleik asit miktarı ile KLA miktarı arasında direkt ilişki bulunamadığı bildirilmiştir (Buccioni vd., 2010; Zlatanov vd., 2002). Fakat peynirde linoleik asitten KLA üretimi, peynir proteinlerinden hidrojen atomları ile reaksiyona giren konjuge dienil radikalleri oluşturmak üzere linoleik asit alil radikalleri üzerinde hidrojen göçüne dayanmaktadır (Rainio vd., 2001). Serbest halde bulunan linoleik asit KLA üretimi için substrat olarak kullanılmaktadır. Lin vd. (2002), *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (CCRC11076)'den elde ettikleri enzim ekstralarında linoleik asit izomeraz enzim aktivitesi gözlemlemişler ve çeşitli KLA izomerlerinin üretilbildiğini bildirmişlerdir.

Süte yapılan çörek otu yağı ilavesi saf linoleik asit kadar KLA üretimini arttıramamıştır. Hem bu yağda bulunan linoleik asidin serbest halde olmaması hem de yağda bulunan fenolik bileşenler bakterilerin gelişimini etkileyerek daha düşük verimle KLA üretimi sağlanmasına neden olmuş olabilir.

Emmental peynirlerde yapılan bir çalışmada 106-109 µg serbest linoleik asit içeren peynirlerde 6 ay süren olgunlaştırma sonucu ekstra 90-170 µg KLA/g peynir oluştuğu bildirilmiştir (Sieber vd., 2004). Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler de

göstermektedir ki peynir üretiminde serbest halde bulunan linoleik asit, propiyonik asit bakterilerin lipolitik faaliyetleri sonucu KLA üretimini arttırmaktadır.

KLA seviyesinin arttırılması, sütün propiyonik asit bakterileri ile fermentasyonu ve linoleik asit ilavesi ile mümkün kılınmaktadır. Yüksek KLA üretme kabiliyetine sahip propiyonik asit bakterilerinin kullanılması, peynir çeşitlerinde fazladan KLA içeriğinin oluşması olasılığını daha da arttırmaktadır.

4.10.9. Renk Tayini

Peynirlerin kalitesinin belirlenmesinde renk özellikleri önem arz etmektedir. Parlaklığı gösteren L değeri ile sarılığı gösteren b değeri peynir kalitesi için değerlendirilmesi gereken iki önemli parametredir. Bu çalışmada peynirlerin renk analizi Bölüm 3.5.8.'de belirtildiği gibi olgunlaşma süresince iç yüzeyinden alınan kesitte ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.33'te gösterilmiştir.

Peynir örneklerinin L^* değerleri incelendiğinde bütün peynirle için en yüksek değerlerin olgunlaşmanın başında olduğu görülmektedir. En yüksek L^* değeri 89,5 olarak çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir örneğinde (ÇF) belirlenmiştir. Olgunlaşma boyunca farklılıklar gözlenmekle beraber olgunlaşma boyunca L^* değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. En düşük L^* değeri (71,86) olgunlaşmanın sonunda linoleik süt ilave edilmiş süttten *P. thoenii* (LT) ile yapılan peynirde belirlenmiştir. L^* değerlerindeki değişim peynirdeki tuz oranıyla ilişkilidir. Tuz oranı yükseldikçe L^* değeri düşme eğilimindedir (Kaya, 2002).

Linoleik asit ilave edilen süt ile yapılan peynirlerde olgunlaşma başında en yüksek L^* değeri herhangi bir kültür ilavesi olmayan örnekte (LK) gözlenmiştir. Varyans analizine göre sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile (LF) ve her iki kültürle yapılan (LFT) peynirler aynı grupta yer alırken, sadece *P. thoenii* ile yapılan örnek (LT) önemli derecede farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Olgunlaşmanın sonunda ise hiç kültür ilave edilmeyen peynir (LK), kültür ilavesi olan tüm peynirlerden istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek L^* değerine sahip olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Çörek otu yağı ilave edilmiş sütle yapılan peynirlerde olgunlaşma süresince L^* değerinde anlamlı değişiklikler olmakla beraber genel eğilim olgunlaşmanın sonuna doğru azalma şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek L^* değeri (89,5) *P. freudenreichii*

subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (ÇF) aittir. Olgunlaşma sonunda da en yüksek değer aynı peynire aittir. Kontrol olarak yapılan herhangi kültür ilavesi olmayan peynir (ÇK) ise olgunlaşma sonunda en düşük L^* değerine (75,59) sahip olmuştur. Olgunlaşma sonunda bütün peynirlerin L^* değerleri önemli derecede farklıdır ($p<0,05$).

Linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmeyen kontrol sütünden yapılan peynirlerde ise olgunlaşma başında *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile (KF) ve kültür ilavesiz (KK) olanlar aynı grupta yer alırken en yüksek L^* değerlerine (88,94-88,99) sahip oldukları belirlenmiştir. Her iki kültür ile yapılan peynir (KFT) ise 86,97 olan L^* değeri ile diğerlerinde anlamlı şekilde ayrılmıştır ($p<0,05$). Olgunlaşmanın sonunda ise *P. thoenii* (KT) ve iki kültürün beraber kullanıldığı (KFT) peynirler aynı grupta yer alarak diğer iki peynirden ayrılmışlardır.

Sarı renk göstergesi olan b^* değeri peynirlerde ikincil metabolit olan karotenoid varlığını göstermektedir. Karotenoidler içerdikleri konjuge bağlar nedeniyle ışığı absorblayarak sarıdan kırmızıya doğru renk verebilmektedirler (Nigam ve Luke, 2016). Bitkilerin fotosentezi sonucu üretilen karotenoidler hayvansal dokularda üretilmemesine rağmen hayvan yemleri ile süte geçebilmekte peynirde sarımtırak rengin oluşmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca mikrobiyal pigment üretimi peynirlerin rengini etkileyen faktörlerden biridir.

Peynirlerin b^* değerleri incelendiğinde en yüksek değerlerin tüm peynirler için olgunlaşmanın sonunda gerçekleştiği gözlenmiştir. b^* değerleri 11,49 ile 18,59 arasında değişmektedir.

Linoleik asi ilave edilen süttten *P. thoenii* ile yapılan peynir (LT) olgunlaşmanın başında en yüksek b^* değerine sahiptir. Bu peynir kontrol (LK) ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirden (LF) anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$). Bu farklılık olgunlaşma sonunda da devam etmiş fakat her iki kültürün kullanıldığı peynirle (LFT) aynı grupta yer almıştır. *P. thoenii* ilave edilen peynirlerin daha yüksek b^* değerine sahip olması bu mikroorganizmanın pigment üretebilme yeteneğiyle ilişkilendirilebilir (Britz ve Riedel, 1994).

Çizelge 4.33. Mihaliç Peynir örneklerinin olgunlaşma süresince L^* , a^* , b^* değerleri

Renk	Zaman (gün)	Linoleik Asit				Çörekotu Yağı				Kontrol			
		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i>	Kontrol	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i>	Kontrol	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i>	Kontrol
L^*	3	87,72±0,5BCa	87,17±0,0Ca	88,07±0,3Ba	89,35±0,0Aa	89,5±0,1Aa	82,06±0,9Ca	87,28±0,1Ba	88,24±0,0Ba	88,94±0,0Aa	87,49±0,2Ba	86,97±0,1Ca	88,99±0,0Aa
	14	79,63±0,1Bb	71,37±1,9Cc	76,8±0,3Bc	84,19±0,1Ab	77,7±0,1Ad	75,32±0,2Bd	75,63±0,7Bc	70,08±0,3Cd	76,02±0,2Bc	80,06±0,3Ab	72,48±0,2Dc	73,61±0,1Cc
	30	76,7±0,4Bc	75,41±0,3Bb	79,92±0,3Ab	76,41±0,9Bd	80,9±0,2Abc	78,16±0,3Bb	71,31±0,1Dd	73,92±0,1Cc	75,14±0,0Ad	73,92±0,4cBd	69,10±0,0Cd	75,49±0,6Ab
	60	78,78±1,4Ac	72,42±0,2Cc	76,09±0,5Bc	73,83±0,3Ce	79,8±1,3Ac	75,8±0,8Bcd	72,14±0,2Cd	75,53±0,4Bb	77,73±0,5Ab	77,22±2,6ABbc	73,90±0,1BCb	72,16±1,0Cc
	90	73,06±0,5Bd	71,86±0,1Bc	73,3±1,3Bd	78,21±0,3Ac	81,7±0,4Ab	77,26±0,1Cbc	79,70±0,1Bb	75,59±0,2Db	77,04±0,4Ab	73,78±1,1Bd	73,14±0,6Bc	75,63±0,4Ab
a^*	3	0,65±0,1Da	1,7±0,0Aa	1,47±0,0Ba	1,3±0,0Ca	0,75±0,0Ca	1,18±0,1Ba	1,83±0,0Aa	1,25±0,0Ba	1,08±0,0Ca	1,75±0,0Aa	1,55±0,0Ba	0,89±0,0Da
	14	-0,2±0,0Cc	0,49±0,0Ab	0,47±0,0Ac	0,05±0,0Be	0,05±0,0Acd	0,68±0,9Aa	0,76±0,0Ac	0,06±0,0Ab	0,46±0,0Bb	0,70±0,0Abc	0,06±0,0Cd	-0,65±0,0Dd
	30	-0,00±0,0Cbc	0,42±0,0Ab	0,42±0,0Ac	0,21±0,0Bd	-0,02±0,0Cd	0,42±0,0Ba	0,85±0,0Ab	-0,08±0,0Dc	0,02±0,0Cd	0,78±0,1Ab	0,20±0,0Bc	-0,53±0,0Dc
	60	-0,14±0,1Cbc	0,17±0,1Bc	0,6±0,1Ab	0,32±0,0Bc	0,23±0,1Bb	0,49±0,1Aa	0,25±0,0Be	-0,26±0,0Cd	0,39±0,1ABb	0,47±0,1Ac	0,25±0,0Bb	-0,69±0,0Cd
	90	0,03±0,0Bb	0,09±0,07Bc	0,48±0,1Abc	0,46±0,0Ab	0,12±0,0Ca	0,48±0,0Ba	0,67±0,0Ad	0,05±0,0Db	0,19±0,0Bc	0,72±0,2Abc	0,09±0,0Bd	0,56±0,1Ab
b^*	3	11,53±0,9Cb	14,08±0,6Ab	13,25±0,2ABc	12,59±0,1BCd	11,57±0,1Bd	14,97±2,2Aa	16,3±0,2Aa	14,12±0,1ABd	11,65±0,1Dd	15,02±0,22Ab	13,93±0,1Bc	13,48±0,0Cb
	14	11,49±0,1Cb	14,35±0,0Ab	14,18±0,1Ab	13,31±0,3Bc	14,37±0,0Cb	16,17±0,0Aa	15,2±0,1Bb	15,20±0,1Bc	14,11±0,0Bb	14,96±0,2Ab	14,98±0,0Ab	14,01±0,4Bab
	30	12,36±1,2Cab	13,78±0,1BCb	15,39±0,2ABa	15,56±0,3Aa	13,44±0,1Cc	15,02±0,1ABa	15,36±0,0Ab	14,88±0,3Bc	13,01±0,2Bc	13,16±0,1Bd	14,62±0,0Ab	12,64±0,4Bc
	60	13,42±0,0Ba	12,63±0,1Cc	13,29±0,0Bc	14,61±0,1Ab	13,62±0,1Cc	14,85±0,1Ba	13,75±0,1Cc	15,59±0,0Ad	11,06±0,7Bd	14,16±0,1Ac	13,25±0,4Ad	13,92±0,3Aab
	90	13,69±0,2Ca	15,85±0,1Aa	15,73±0,1Aa	15,14±0,0Bab	14,90±0,1Ca	14,60±0,4Ca	16,13±0,0Ba	17,79±0,0Aa	15,24±0,1Ca	18,59±0,2Aa	16,25±0,0Ba	14,55±0,12Da

A,B,C,D (→) aynı günde kültürler arası istatistiksel farkı her linoleik asit kaynağı kendi içinde değerlendirilerek gösterilmiştir.
a,b,c,d,e (↓) aynı kültürde olgunlaşma sürecindeki farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

Çörek otu yağı ilaveli süttten sadece *P. thoenii* (ÇF)ve her iki kültürün beraber kullanılarak yapıldığı (ÇFT) peyinler olgunlaşmanın başında en yüksek b^* değerine sahiptirler. Olgunlaşma süresince değerlerde değişiklikler olmasına rağmen genel eğilim artma yönündedir. Linoleik asit ilave edilen süttten farklı olarak bu süttten yapılan peynirlerde olgunlaşma sonunda en yüksek b^* değeri (17,79) herhangi bir kültür ilavesi olmayan kontrol örneğinde saptanmıştır. Çörek otu yağının antimikrobiyal etkileri mikrobiyal pigment oluşumunu engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

Kontrol süttünden yapılan peynirlerde ise b^* değerleri 11,06-18,59 aralığında değişmektedir. Sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) anlamlı olarak diğerlerinden daha düşük b^* değerine sahiptir ($p<0,05$). Olgunlaşmanın başında ve sonunda, *P. thoenii* ile yapılan peynirler (KT) önemli derecede en yüksek b^* değerine (15,02-18,59) sahiptirler. Bu süttten yapılan peynir örneklerinde olgunlaşma başında ve sonunda ölçülen b^* değerleri arasında anlamlı farklılıklar vardır ($p<0,05$). Tüm peynirlerin zamanla sarılık değerleri artmıştır.

Renk analizi yapılırken peynirlerin a^* değerleri (kırmızı-yeşil) de ölçülmüştür. Peynirlerde kırmızılık oluşumu bu renk pigmentini üreten mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu çalışma kapsamında üretilen peynirlerin a^* değerleri -0,69-1,83 aralığında değişmiştir. a^* değerinin kırmızılık yeşillik (-60: Yeşil, +60: Kırmızı) arasında belirlendiğini göz önüne alındığında örneklerimizdeki a^* değeri değişimi çok dar bir aralıkta gerçekleşmiştir. Varyans analizine göre örnekler arasında önemli farklar belirlense de bu değişim çok kısıtlı bir aralıkta olmuştur. Olgunlaşma başında bütün peynir örneklerinde en yüksek değerindedir. Olgunlaşma süresince minimal oranda değişimler gözlemlenmiştir.

Olgunlaşma başında linoleik asit ve çörek otu ilave edilmemiş süttten *P. thoenii* ile yapılmış peynir (KT) en yüksek a^* değerine (1,75) sahiptir. Aynı şekilde linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. thoenii* ile yapılmış peynir (LT) bu süttten yapılan peynirler arasında en yüksek a^* değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Çörek otu yağı ilave edilmiş süttten yapılan peynirlerde ise *P. thoenii*'nin tek başına kullanıldığı peynirin (ÇT) a^* değeri 1,18 iken, iki kültürün beraber kullanıldığında (ÇFT) a^* değeri 1,83 olarak belirlenmiştir. Olgunlaşma sonunda ise linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmiş süttten her iki kültürün beraber kullanılmasıyla üretilen peynirler (LFT ve ÇFT) en yüksek a^* değerine sahipken, kontrol süttünden sadece *P. thoenii* ile yapılan peynir (KT) en yüksek a^* değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Mihaliç peynirini renk özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada L^* ve b^* değerleri iç ve dış yüzeylerde ölçülmüş, sırasıyla 88,40-75,92 ve 18,26-9,37 arasında belirlenmiştir (Aday ve Karagul Yuceer, 2014). Bu değerler bu çalışmada belirlenenler ile paralellik göstermektedir.

4.11. Mihaliç Peynirlerinin Tekstür Profil Analizleri

Tekstür özellikleri peynirin kalitesinde tüketici kabul edilebilirliğini etkileyen en önemli kriterlerden biridir (Bryant, 1995). Peynirin tekstürel özellikleri büyük ölçüde mikro yapısı tarafından belirlenir. Aynı zamanda pH ve peynir kompozisyonu da tekstürel özelliklere etki etmektedir. Bu çalışma kapsamında üretilen peynirlerin Tekstürel özellikleri bölüm 3.6 da anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.34'te gösterilmiştir.

Peynirlerin sertlik değerlerine bakıldığında en sert peynirin (31,71 N) linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (LF) ait olduğu görülmektedir. Bu peynir aynı zamanda pH değeri en yüksek olan peynirdir. Yüksek pH değeri ve protein oranı peynirlerde sertliğin artmasına neden olmaktadır (Chen, Larkin, Clark ve Irwin, 1979). Sertliği en düşük olan peynir ise her iki kültürün beraber kullanıldığı ve linoleik asit ilave edilmiş sütle yapılan peynir olduğu görülmüştür. Linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan peynirler arasında bu örnek istatistiksel olarak anlamlı derecede diğerlerinden farklıdır ($p < 0,05$). Bunun nedeni her iki kültür beraber ilave edildiğinde artan proteolitik aktivite kazeinlerin parçalanmasına neden olması ve hidrolizin peynirin sertlik değerini düşürmesidir (Chen ve diğerleri, 1979).

Peynir bileşenlerinden protein oranı peynirin sertliğini en çok etkileyen bileşendir. Daha sonra sırasıyla tuz oranı, nem miktarı, pH değeri, yağ oranı peynirlerin tekstürel özelliklerini etkilemektedirler. Peynirde protein ve pH değerinin artması sertliği artırırken, nem, yağ ve tuz oranının artması ise sertliği azaltmaktadır (Chen vd., 1979). Peynirlerin nem oranı, peynirde bulunan proteinlerin plastikleştirici özelliğini etkilemekte ve sonucunda peynirin elastikiyet özelliğini arttırmaktadır (Jack ve Paterson, 1992).

Süte yapılan çörek otu yağı ilavesi peynirlerin sertlik değerine anlamlı bir etki göstermemiştir ($p > 0,05$). Kontrol sütünden yapılan peynirlerin arasında ise hiç kültür ilave edilmeyen (KK) ve *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan (KF) örnekler aynı grupta yer almıştır. *P. thoenii* ile yapılan peynir (KT) ise 18,72 N sertlik değeri ile bu grupta yer alan en düşük sertlik derecesine sahiptir. Literatürde yapılan diğer çalışmalarda Mihaliç peynirinin

tekstürel özellikleri araştırılmış ve sertlik değerleri 129,93-24,44 N arasında belirlenmiştir (Aday, 2010).

Çizelge 4. 34. Mihaliç peynirlerinin ortalama tekstür özellikleri

Tekstür Özellikleri	Kültür	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> + <i>P. thoenii</i>	Kontrol
	LA kaynak				
Sertlik (N)	Linoleik asit	31,71Aa	20,36ABa	11,98Bb	17,09Ba
	Çörek otu Yağı	16,33Ab	15,05Aa	20,08Aa	20,40Aa
	Kontrol	19,77ABb	18,72Ba	25,15Aa	19,33ABa
Dış Yapışkanlık (g.sn)	Linoleik asit	-113,46ABa	-145,96Bb	-71,73ABa	-36,32Aa
	Çörek otu Yağı	-135,13Aa	-40,29Aa	-82,36Aa	-131,12Aa
	Kontrol	-48,27ABa	-32,31Aa	-107,05ABa	-133,58Ba
Elastikiyet	Linoleik asit	0,98Aa	1,00Aa	0,96Aa	1,95Aa
	Çörek otu Yağı	0,97Aa	1,60Aa	1,29Aa	1,79Aa
	Kontrol	0,96Aa	1,40Aa	1,00Aa	1,13Aa
İç Yapışkanlık	Linoleik asit	0,58ABa	0,53ABa	0,49Ba	0,60Aa
	Çörek otu Yağı	0,51Aa	0,52Aa	0,49Aa	0,50Ab
	Kontrol	0,53Aa	0,52Aa	0,53Aa	0,51Ab
Sakızimsılık (N)	Linoleik asit	18,31Aa	10,86ABa	5,92Bb	10,23Ba
	Çörek otu Yağı	8,36Ab	7,848Aa	9,85Aab	10,26Aa
	Kontrol	10,43Ab	9,78Aa	13,23Aa	9,86Aa
Çiğnenebilirlik (N)	Linoleik asit	17,92Aa	10,81Aa	5,69Aa	18,61Aa
	Çörek otu Yağı	8,10Ab	11,74Aa	12,39Aa	18,88Aa
	Kontrol	9,99Ab	14,26Aa	13,16Aa	11,14Aa
Esneme	Linoleik asit	0,12Aa	0,11Aa	0,09Ab	0,14Aa
	Çörek otu Yağı	0,08Ba	0,11Aa	0,10ABab	0,09ABb
	Kontrol	0,12Aa	0,14Aa	0,11Aa	0,08Ab

A,B (→) aynı satırda kültürler arası farkı göstermektedir (p<0,05).

a,b, (↓) aynı sütunda linoleik asit kaynaklarına arasındaki farkı göstermektedir

Dış yapışkanlık peynir ile tekstür cihazının temas yüzeyi arasındaki çekim gücüne karşı uygulanan kuvvet olarak tanımlanır. Yapışkanlık ürünün tüketimi esnasında ağızda damağa yapışmasını engellemek için uygulanan kuvvettir (Szczeniak, 2002). Peynirlerin dış yapışkanlık tekstürel özelliği incelendiğinde linoleik asit ilaveli süttten farklı kültürler ile yapılanlar arasında anlamlı farklılıklar (p<0,05) varken, çörek otu yağı ilave edilmiş sütte kültürler arasında bir farka rastlanmamıştır (p>0,05). Kontrol sütünde ise hiç kültür ilave

edilmeyen örnek en düşük dış yapışıklık değeriyle diğerlerinden önemli derecede ayrılmıştır ($p<0,05$).

Elastikiyet peynire uygulanan ilk kuvvetten sonra orijinal şekline geri dönme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Jack ve Paterson, 1992). Peynirlerin elastikiyet özelliklerine bakıldığında, test edilen bütün faktörlerin, peynirlerin bu özelliğinin üzerinde hiçbirinin anlamlı bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. Süte ilave edilen linoleik asit ve çörek otu yağı kontrol örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Aynı şekilde peynir üretiminde kullanılan kültürler arasında da anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$).

İç yapışkanlık özelliği ikinci sıkıştırma sonrasındaki alanın birinci sıkıştırma sonrasında oluşan alana oranı olarak hesaplanmaktadır. Peynirin kırılmadan deforme olmasının ve aynı zamanda ağızda dişler arasında parçalanmadan ne kadar sıkıştırılabileceğinin göstergesidir (Jack ve Paterson, 1992). Çizelge 4.34 te gösterilen değerlere bakıldığında herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan peynirler dışında süte ilave edilen linoleik asitin iç yapışkanlık üzerinde anlamlı bir etkisi belirlenmemiştir ($p>0,05$). Kültürsüz yapılan peynirlerde ise linoleik asit ilave edilerek yapılan örnek diğerlerinden önemli derecede daha yüksek iç yapışıklık değerine sahiptir ($p<0,05$). Kültürler arası fark değerlendirildiğinde ise yine kontrol sütü ve çörek otu yağı ilave edilmiş sütlerden yapılan peynirler arası anlamlı fark yok iken linoleik asit ilave edilmiş süttten yapılan örnekler arasında anlamlı fark mevcuttur ($p<0,05$). İki kültürün beraber kullanıldığı peynir en düşük iç yapışkanlık değerine sahiptir. Herhangi bir kültür ilavesi olmayan süt ise en yüksek değere sahiptir.

Sakızimsılık değeri gıdanın ağızda parçalanması ve yutulmaya hazır hale getirilmesi için gereken kuvvet olarak tanımlanmaktadır (Szczesniak, 2002). Çizelge 4.34'te görüldüğü gibi en düşük sakızimsılık değeri linoleik asit ilaveli sütte her iki kültürün beraber kullanıldığı peynirde 5,92 (N) olarak, en yüksek değer ise 18,31(N) olarak linoleik asit ilaveli süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan örnekte ölçülmüştür. Yapılan istatistiksel analizlere göre linoleik asit ilaveli süttten yapılan Mihaliç peynirlerinin sakızimsılık değeri üzerine farklı kültür kullanımının önemli düzeyde etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Çörek otu yağı ilave edilmiş süt ve kontrol süttünden yapılan örneklerde ise kültürler arası anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Çiğnenebilirlik özelliği gıdanın yutulması için gerekli çiğneme enerjisi olarak tanımlanmaktadır (Szczesniak, 2002). Çiğnenebilirlik elastikiyet ile sakızimsılığın çarpımı ile

hesaplanmaktadır. Çiğnenebilirlik değerlerine bakıldığında en yüksek çiğnenebilirliğin 18,88 olarak çörek otu yağı ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan peynire ait olduğu, en düşük çiğnenebilirliğin ise 5,69 olarak linoleik asit ilaveli süttten her iki kültürün beraber kullanımı ile üretilen peynire ait olduğu görülmüştür. Peynir yapımında kullanılan süte ilave edilen linoleik asit ve çörek otu yağının peynirlerinin çiğnenebilirlik değeri üzerine önemli düzeyde etkisi olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Kùltürler arası farklılık değerlendirildiğinde ise sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirler önemli düzeyde farklılık göstermiştir ($p<0,05$).

Esneme özelliği kuvvet uygulaması sonrası örneğin kendi haline geri dönebilme oranı olarak tanımlanmaktadır(Szczesniak, 2002). Duyusal olarak dişler arasında sıkıştırılan peynirin eski haline geri dönebilme yeteneğidir. Mihaliç peynirlerinin esneklik değerlerinin varyans analizi sonuçlarına göre linoleik asit ilave edilmiş süt ve kontrol sütü ile yapılan peynirlerde kùltürler arası anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Fakat çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir en düşük esneme değerine (0,08) sahiptir.

Peynirlerin tekstürel özellikleri, kazein-kazein, kazein-su ve kazein-yağ etkileşimleri, suyun durumu (serbest veya bağlı su olması), pH ve kalsiyum durumu (iyonik veya kazein matrisine bağlı), sıcaklık, sodyum klorür içeriği ve proteoliz derecesi gibi özelliklerinden etkilenmektedir (Everett ve Auty, 2008).

5. SONUÇ

Mihaliç peyniri Türkiye’de üretilen önemli geleneksel peynirlerden biridir. Bu peynire karakteristik özelliklerini veren propiyonik asit bakterilerinin olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. PAB’ların probiyotik olarak kullanılma potansiyellerinin yüksek olması, sahip olduğu propiyonik asit ve bakteriyosin üretimi gibi diğer organizmalar üzerindeki antagonistik etkilerinin bulunması, Mihaliç gibi özel fermente ürünlerin oluşmasındaki rolleri nedeniyle teknolojik açıdan oldukça önemli olmaları ve sağlığa yararlı etkileri kanıtlanmış KLA üretim potansiyellerinin de bulunması, bu mikroorganizma grubunu araştırmaya değer kılmaktadır. Bu çalışmada Mihaliç peynirlerinden PAB’ların izole edilip tanımlanması, yüksek KLA üretim potansiyeline sahip olanların seçilmesi, daha sonra bu kültürler ile geleneksel üretim şartlarında KLA kaynağı olarak linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmiş süttten KLA seviyesi arttırılmış fonksiyonel bir ürün elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda bahsedilen faktörlerin Mihaliç peynirinin KLA içeriği ve izomer kompozisyonuna katkılarının yanında fizikokimyasal, mikrobiyal ve tekstürel özelliklerine etkileri de olgunlaşma boyunca incelenmiştir.

Çalışma kapsamında yerel üreticilerden temin edilen 25 adet Mihaliç peynirinden 95 adet izolat elde edilmiştir. İzolatların tanımlanması çeşitli çalışmalarla PCR bazlı metotlardan daha hızlı, ekonomik ve güvenilir bir yöntem olduğu kanıtlanan MALDI-TOF-MS ile yapılmıştır. 95 izolattan 21 tanesi *Propionibacterium* spp. olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatların %20’si *Propionibacterium freudenreichii* sspp. iken, sadece %2’si *Propionibacterium thoenii* olarak belirlenmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin yanında %23,2 *Lactobacillus paracasei* sspp. %13,7 oranında *Lactobacillus plantarum* sp. ve %10,5 oranında *Lactobacillus fermentum* sp. belirlenmiştir. Laktobasillerin haricinde MALDI-TOF-MS analizine göre izolatların %11,6’sı *Enterococcus* olarak belirlenmiştir. Tanımlanan propiyonik asit bakterilerinin %57’si *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, %33’ü *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ve %10’u *Propionibacterium thoenii* olarak tanımlanmıştır.

Propiyonik asit bakterisi olarak tanımlanan bakterilerin linoleik asite karşı duyarlılıklarını değerlendirmek için 25, 50, 100 µg/mL LA içeren sıvı YEL besi yerine ekimi yapılarak tarama yapılmıştır. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* olarak tanımlanan bütün izolatların (K11, K22, K24, T11, OC4, Ü11, Ü14, KY2, Ö22, KZ1, Kİ2, ÜÇ2) test edilen en düşük linoleik asit konsantrasyonuna (25 µg/mL) karşı duyarlı olduğu

gözlenmiştir. Ayıca bütün izolatlar 100 µg/mL linoleik asit konsantrasyonuna karşı direnç gösterememiş ve herhangi bir gelişmeye rastlanmamıştır. Yüksek linoleik asit konsantrasyonun KLA üretimini doğrudan etkilediği bu çalışmada da gözlemlenmiştir. Linoleik asit duyarlılığı düşük olan *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (T21, K13, Ü23, S11, D12, K32, GS4) ve *Propionibacterium thoenii* (ÜP1 ve S14) izolatlarının 50, 40, 25 ve 10 µg/mL linoleik asit içeren besi yeri ortamında KLA üretim miktarları incelenmiştir. Test edilen 40 ve 50 µg/mL LA içeren besi yeri ortamında bakteri gelişimi gözlenmesine rağmen hiç KLA sentezi gerçekleşmemiştir. Linoleik asit konsantrasyonu 10 µg/mL olduğunda en yüksek KLA üretimini gerçekleştiren izolatlar *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (8,85-9,08 µg/mL) ve *Propionibacterium thoenii* (3,28-3,93 µg/mL) olarak belirlenmiştir.

KLA verimliliği yüksek olduğu belirlenen *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (K32 ve GS4) ve *P. thoenii* (ÜP1 ve S14) olarak tanımlanan izolatların farklı pH değerlerine (pH 7,0; 6,5; 6,0; 5,5 ve 5,0) ve farklı tuz oranlarına (%0,5; 1,0; 2,5; 5,0 ve 10) karşı duyarlılıkları peynir prosesinde önem arz ettiği için incelenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (K32 ve GS4) ve *P. thoenii* (ÜP1 ve S14)'ün optimum gelişim pH'ları (pH 7) dışında bütün pH seviyelerinde birbirlerinden farklı gelişim göstermişlerdir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (K32 ve GS4) pH 6 seviyesi haricinde bütün pH seviyelerinde daha yüksek sayılara ulaşmış fakat *P. thoenii* (ÜP1 ve S14) pH 6'da 8,7-8,8 log kob/mL sayılarına ulaşırken, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (K32 ve GS4) 6,9-7,0 log kob/mL olarak belirlenmiştir.

P. freudenreichii subsp. *shermanii* (K32 ve GS4) ve *P. thoenii* (ÜP1 ve S14) bakterilerinin %0,5 ve %1'lik tuz konsantrasyonuna toleransı önemli oranda farklıdır (p<0,05). *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* olarak tanımlanan K32 ve GS4 kodlu izolatlar %0,5 tuz içeren besi yeri ortamında sırasıyla 8,22 ve 8,35 log kob/mL sayısına ulaşırken, tuz oranı %1 olduğunda bu değer 8,4 ve 7,9 log kob/mL olarak belirlenmiştir. *P. thoenii* olarak tanımlanan ÜP1 ve S14 izolatları ise %0,5 ve %1 tuz oranlarında sırasıyla 9,1/9,2 ve 9,5/9,6 log kob/mL değerlerine ulaşmıştır. Tuz konsantrasyonu %2,5 olduğunda ise S14 kodlu *P. thoenii* izolatı diğer bakterilerden daha fazla hassasiyet göstererek istatistiksel olarak anlamlı derecede sayısı azalmıştır (p<0,05). Tuz konsantrasyonlarına farklı duyarlılık gösteren bakteriler %10 tuz konsantrasyonunda tamamen inhibe olmuştur. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (K32, GS4) ve *P. thoenii* (ÜP1 ve S14) izolatları %5 tuz konsantrasyonuna benzer direnç göstermiştir.

PAB'ların uygun konsantrasyonda saf linoleik asidi KLA'ya çevirdiği tespit edilmiştir. Saf linoleik asidin yüksek maliyeti nedeniyle KLA üretimi için substrat olarak kullanılacak

alternatif linoleik asit kaynağı araştırılmıştır. Linoleik asit içeriği %60 olan çörek otu yağının alternatif linoleik asit kaynağı olup olamayacağını belirlemek amacıyla tuz ve pH direnci en iyi olan iki izolatin bu yağı içeren besi yeri ortamında KLA üretim kabiliyeti değerlendirilmiştir. Çörek otu yağı içeren besi yerinde 2,10-4,24 µg/mL seviyesinde KLA üretilebildiği belirlenmiştir. GS4 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* en yüksek miktarda (4,24 µg/mL) KLA üretebilmiştir. K32 ve ÜP1 kodlu izolatlar benzer miktarlarda KLA üretebilmişlerdir. En az oranda KLA üretimi S14 kodlu *P. thoenii* ile gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda GS4 kodlu *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve ÜP1 kodlu *P. thoenii* kullanılmıştır.

Çalışmanın takip eden evresinde KLA miktarı yükseltilmiş Mihaliç peyniri üretmek için hem seçilen iki izolatin hem de farklı LA kaynaklarının etkilerini ortaya koyacak çalışmalara geçilmiştir. Bu amaçla KLA üretim potansiyelleri yüksek olan *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii* izolatları tek tek ve birlikte kullanılarak, saf linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmiş süttten her iki parametre için kontrol üretimleri de yapılarak toplamda 12 adet Mihaliç peynir örneği üretilip incelenmiştir.

Üretilen peynirlerin mikrobiyolojik analizleri kapsamında TMAB, toplam PAB ve toplam LAB sayımları yapılmıştır. Olgunlaşma süresi tüm bakteri sayıları üzerinde anlamlı etki sağlamıştır ($p<0,05$). Olgunlaşma sonunda TMAB sayısı bütün örneklerde azalmıştır. Linoleik asit ilavesi TMAB sayısını anlamlı şekilde etkilemezken ($p>0,05$), kültür ilavesi TMAB sayısını önemli derecede etkilemiştir ($p<0,05$). Kültür ilavesi olmayan kontrol peynirinin (KK) daha düşük toplam mezofilik bakteri sayısına sahip olduğu görülmüştür. Toplam PAB sayısında olgunlaşma süresinin etkisi tüm örneklerde olgunlaşma boyunca önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca ilave edilen kültür türünün önemli bir etkisi yokken ($p>0,05$), kültür ilave edilmeyen kontrol örneklerine (LK, ÇK ve KK) göre anlamlı oranda daha yüksek sayıya ulaşmıştır ($p<0,05$). Peynirlerin olgunlaşma süresinin toplam LAB sayısı üzerinde de anlamlı etkisi olduğu yapılan varyans analizi ile gösterilmiştir ($p<0,05$). Olgunlaşmanın sonuna doğru genel olarak peynirlerin toplam LAB sayısında azalma gözlenmiştir. Hem linoleik asidin hem de çörek otu yağının peynirde bulunan laktik asit bakterileri üzerinde inhibisyona neden olduğu sonucuna varılmıştır. Olgunlaşmanın başında tüm örneklerdeki toplam LAB sayısı çok yakın olmakla beraber her iki kültürün beraber kullanıldığı peynir örneği (KFT) 8,15 log kob/g sayısı ile en yüksek değerdedir. Diğer örneklerde olduğu gibi otoliz kaynaklı olgunlaşmanın sonuna doğru toplam LAB sayısı, tüm örneklerde azalmıştır.

Mihaliç peynirlerinin fizikokimyasal analizleri kapsamında pH, titrasyon asitliği, kuru madde, yağ, protein, tuz ve kül oranları belirlenmiştir. Ayrıca peynirlerin olgunlaşma boyunca yağ asitleri kompozisyonu ve KLA içerikleri incelenmiştir.

Peynirlerin titrasyon asitliği değerleri %0,85-2,12 arasında değişmekle beraber bütün peynir örneklerinde en yüksek asitlik olgunlaşma periyodunun sonunda (90.gün) gözlemlenmiştir. En yüksek asitlik kontrol sütünden *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ve *P. thoenii*'nin beraber kullanılarak üretildiği peynirde (KFT) %2,21 olarak belirlenmiştir.

Peynirlerin pH değerleri 5,31-5,82 arasında değişmektedir. Olgunlaşma periyodunun sonunda en düşük pH değeri çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (ÇF) aittir. En yüksek pH ise yine çörek otu yağı ilave edilmiş süttten herhangi bir kültür ilave edilmeden yapılan peynir (ÇK) örneğine aittir.

Peynirlerin kuru madde oranları %54,4-66,3 arasında değişmektedir. Örnekler arasında en yüksek kuru madde oranı %66,3 ile linoleik asit ve çörek otu yağı ilave edilmemiş süttten iki kültürün beraber kullanımı ile yapılan peynirdir (KFT). Peynirlerin kuru madde oranları olgunlaşma süresince artma eğilimindedir. 90 gün süren olgunlaşma periyodu bütün örneklerin kuru madde oranlarını önemli seviyede arttırmıştır ($p < 0,05$).

Peynirlerin olgunlaşma süresi boyunca yağ oranlarında değişim olmakla beraber olgunlaşma periyodunun yağ oranlarına etkisi anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). İlave edilen kültürlerin lipolitik aktivitesi nedeniyle kültürsüz yapılan peynirlerin yağ oranları kültürlü yapılan peynirlerden daha düşüktür.

Peynirlerin protein oranları olgunlaşmanın başında %21,39-23,76 arasında değişirken, olgunlaşmanın 90. gününde %18,18-20,29 arasında değişmektedir. Olgunlaşma süresince en yüksek protein oranı (%23,76) herhangi bir linoleik asit ilavesi yapılmayan ve sadece *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (KF) örneğinde gözlenmiştir. Olgunlaşma süresi boyunca protein oranlarında istatistiki olarak önemli derecede değişim gözlenmiştir ($p < 0,05$). Peynir olgunlaşmasında önemli bir rol oynayan proteoliz reaksiyonları bakteriler arasında gerçekleşen interaksiyondan önemli düzeyde etkilenmiştir.

Peynirlerde bulunan tuz oranı ile kül oranı arasında doğrusal bir ilişki olması beklenmektedir. Peynirlerin kül oranları olgunlaşma boyunca değişirken olgunlaşmanın sonuna doğru artma eğilimi göstermiştir. Olgunlaşmanın başında en düşük kül oranı %4,63 olarak

kontrol sütünle ile kültür ilavesi yapılmadan üretilen peynirde (KK) belirlenmiştir. En yüksek oran ise %8,09 ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. thoenii* ile yapılan peynir (ÇT) örneğinde belirlenmiştir. Peynirlerin kül oranları %4,63 ile %10,10 arasında değişmiştir.

Olgunlaşmanın başında en düşük tuz oranı %4,42 ile kontrol sütünle her hangi kültür ilavesi yapılmadan üretilen peynir (KK) örneğinde görülürken, en yüksek tuz oranı %6,16 ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten her iki kültürün beraber kullanılarak yapılan peynir (ÇFT) örneğinde belirlenmiştir. Olgunlaşma sonunda ise en düşük tuz oranı %8 ile kontrol sütünle kültürsüz yapılan peynire (KK) aitken en yüksek tuz oranı da %10,18 ile çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirde (ÇFT) belirlenmiştir. Peynirlerin tuz oranları kül miktarları ile paralellik içindedir.

Peynirlerin yağ asitleri kompozisyonu incelendiğinde tüm peynir örneklerinde en baskın olan yağ asidinin palmitik asit olduğu görülmüştür. Kısa zincirli ve orta zincirli yağ asitleri açısından kültürler arası fark gözlemlenmemiştir. Peynirlerin doymuş yağ oranları %65,9 ile %68 arasında değişmektedir. En yüksek doymamış yağ asidi oranı %34 ile kontrol sütünle kültür kullanılmadan hazırlanan peynirde (KK) gözlemlenmiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri incelendiğinde ise linoleik asit ilavesi olan süttte *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynirin (LF) %3,79 ile en yüksek orana sahip olduğu gözlemlenmiştir. En düşük çoklu doymamış yağ asidi oranı (%2,79) ise kontrol sütünle kültürsüz yapılan peynire (KK) aittir. Hem kültür ilavesinin hem de linoleik asit ilavesini çoklu doymamış yağ asitleri miktarını olumlu etkilediği anlaşılmaktadır.

Peynirlerin KLA miktarları incelendiğinde ise yağ asitleri kompozisyonuna paralel olarak en yüksek KLA saf linoleik asit ilave edilmiş peynirlerde gözlemlenmiştir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına ya da *P. thoenii* ile beraber kullanıldığında yüksek KLA üretimine neden olmuştur. Peynirlerin KLA oranları olgunlaşma sonunda 3,93-6,28 mg/g yağ arasında değişmiştir. En yüksek KLA miktarı linoleik asit ilave edilmiş süttten her iki kültürün beraber kullanımıyla üretilen peynir (LFT) örneğine aittir. Kontrol peynirine (LK) göre %17,8 (LFT) daha fazla KLA içermektedirler. Linoleik asit ilavesinin KLA üzerindeki olumlu etkisi ise %26,8'dir (KFT'ye göre). Her hangi bir linoleik asit ve kültür kullanılmadan üretilen peynirle karşılaştırıldığında (KK) ise KLA miktarı %59,8 oranlarında artmıştır. Olgunlaşmanın peynirlerin KLA miktarı üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır ($p>0,05$). Fakat kullanılan linoleik asit kaynağı ve kültür türü KLA oranını anlamlı seviyede etkilemiştir ($p<0,05$). Sonuçlar göstermektedir ki tek başına kültür ilavesi ya da tek başına linoleik asit

ilavesi KLA üretimini artırırken, her iki uygulamanın beraber yapılması KLA üretimini daha fazla arttırmaktadır.

Peynirlerin KLA izomerlerinde baskın olan izomer tüm süt ürünlerinde en çok bulunan *c9-t11* (rumenik asit) izomeridir. Saf linoleik asit ilave edilmiş sütlerden üretilen peynirlerdeki rumenik asit oranı kontrol sütünden üretilenlerden daha yüksektir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* tek başına (LF) ya da *P. thoenii* ile beraber kullanıldığında (LFT) en yüksek *c9-t11* üretimine neden olmuştur. Çörek otu yağı ilavesi *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 'nin (ÇF) *c9-t11* izomeri oluşturmasını olumsuz etkilese de *P. thoenii* ile beraber kullanıldığında (ÇFT) yüksek rumenik asit üretim kapasitesine ulaşmışlardır.

Peynirlerin tekstürel ve renk özellikleri de incelenmiştir. En sert peynirin linoleik asit ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynire (LF) ait olduğu görülmektedir. Renk özellikleri değerlendirildiğinde ise peynir örneklerinin *L** değerleri bütün peynirler için en yüksek olarak olgunlaşmanın başında belirlendiği görülmektedir. En yüksek *L** değeri 89,5 olarak çörek otu yağı ilave edilmiş süttten *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ile yapılan peynir (ÇF) örneğinde belirlenmiştir. Olgunlaşma boyunca farklılıklar gözlenmekle beraber olgunlaşma boyunca *L** değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Peynirlerde sarılığın göstergesi olan *b** değerleri incelendiğinde en yüksek değerlerin tüm peynirler için olgunlaşmanın sonunda gerçekleştiği görülmüştür. *b** değerleri 11,49 ile 18,59 arasında değişmektedir. Tüm örnekler arasında en yüksek *b** değerleri *P. thoenii* ile yapılan peynirlere aittir.

Bu çalışma ile süte yapılacak linoleik asit ilavesi ile peynirin kalite özelliklerini olumsuz etkilemeden KLA içeriği arttırılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca yüksek KLA üretim kapasitesine sahip *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kültürünün tek başına ya da *P. thoenii* ile beraber kullanıldığında Mihaliç peynirinde KLA miktarını önemli oranda arttırdığı ($p<0,05$) ayrıca sağlığa yararlı etkileri olduğu bilinen rumenik asit izomeri miktarını olumlu yönde etkilediği görülmüştür.

Farklı suşların ve farklı kültür kombinasyonlarının yüksek KLA üretim yeteneği sergileyebileceğinden ileriki çalışmalarda PAB'lar ve LAB'ların beraber kullanılabileceği ve alternatif linoleik asit uygulamalarının değerlendirilebileceği çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Salam, M. H., Hippen, A. R., Assem, F. M., El-Shafei, K., Tawfik, N. F. ve El-Aassar, M. (2011). Preparation and properties of probiotic cheese high in conjugated linoleic acid content. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 64–74. doi:10.1111/j.1471-0307.2010.00642.x
- Aday, S. (2010). *Mihaliç Peynirinin Krakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Aday, S. ve Karagul Yuceer, Y. (2014). Physicochemical and sensory properties of mihalic cheese. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2207–2227. doi:10.1080/10942912.2013.790904
- Akbulut, N., Gönç, S., Kınık, Ö., Uysal, H., Akalın, S. ve Kavas, G. (1995). Bazı Tuzlama Yöntemlerinin Beyaz Peynir Üretiminde Uygulanabilirliği ve Peynir Kalitesine Etkileri Üzerinde Bir Araştırma. I. Duyusal ve Mikrobiyolojik Özelliklere Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(1), 9–15.
- Al-Lahham, S. H., Peppelenbosch, M. P., Roelofsen, H., Vonk, R. J. ve Venema, K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(11), 1175–1183. doi:10.1016/j.bbalip.2010.07.007
- Allen, S. H. , Kellermeyer, R. W., Stjernholm, R. L. ve Wood, H. G. (1964). Purification and Properties of Enzymes Involved in The Propionic Acid Fermentation. *Journal of Bactriology*, 87(1), 171–187.
- Altieri, C. (2016). Dairy propionibacteria as probiotics: recent evidences. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(172). doi:10.1007/s11274-016-2118-0
- Andrade, J. C., Ascensão, K., Gullón, P., Henriques, S. M. S., Pinto, J. M. S., Rocha-Santos, T. A. P., ... Gomes, A. M. (2012). Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 467–481. doi:10.1111/j.1471-0307.2012.00871.x
- Angeletti, S. ve Ciccozzi, M. (2019). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infection, Genetics and Evolution*. doi:10.1016/j.meegid.2019.104063

- Angelopoulou, A., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Manolopoulou, E., Tsakalidou, E. ve Papadimitriou, K. (2017). Production of probiotic Feta cheese using *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* as adjunct. *International Dairy Journal*. doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.011
- AOAC. (1990a). AOAC Official Methods 920.124, Acidity of Cheese Titrimetric Method. http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=211 adresinden erişildi.
- AOAC. (1990b). *Official Methods of Analysis* (15th bs.). Washington D.C., U.S.A.: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2000a). Fat in Cheese. <http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=18695> adresinden erişildi.
- AOAC. (2000b). AOAC Official Method 940.28 Fatty Acids (Free) in Crude and Refined Oils. *Aoac*, 252, 2000–2000.
- AOAC. (2002). AOAC Official Method 33.7.12A 2001.14 Determination of Nitrogen (Total) in Cheese. *Grana*.
- Baer, A. ve Ryba, I. (1992). Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples. *International Dairy Journal*, 2(5), 299–310. doi:10.1016/0958-6946(92)90034-J
- Ballıkaya, S. (2007). *Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Yapılardan Konjuge Linoleik Asit Üretimi* (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Barrett, E., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. ve Stanton, C. (2007). Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2333–2337. doi:10.1128/AEM.01855-06
- Bauman, D. L., Baumgard, L. H., Corl, B. A. ve Griinari, J. M. (1999). Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. *American Society of Animal Science*, 50, 179–217. doi:10.1016/S1043-4526(05)50006-8
- Boke, H., Aslım, B. ve Alp, G. (2010). The Role of Resistance to Bile Salts and Acid Tolerance of Exopolysaccharides (Eps) Produced by Yogurt Starter Bacteria. *Arch. Biol. Sci.*, 62(2), 323–328. doi:10.2298/ABS1002323B

- Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C. ve Roussel, E. (1995). Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait*, 75, 17–29.
- Britz, T. J. J. ve Riedel, K.-H. J. H. J. (1994). Propionibacterium species diversity in leerdammer cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 22(4), 257–267. doi:10.1016/0168-1605(94)90177-5
- Bryant, A. (1995). Texture of Cheddar Cheese as Influenced by Fat Reduction. *Journal of Food Science*, 60(6), 1216–1220.
- Buccioni, A., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., Minieri, S., Conte, G. ve Mele, M. (2010). Conjugated linoleic acid and C18:1 isomers content in milk fat of sheep and their transfer to Pecorino Toscano cheese. *International Dairy Journal*, 20(3), 190–194. doi:10.1016/j.idairyj.2009.10.001
- Bulut, B. (2006). *Çiğ ve Pastörize Sütten İşlenen Mihaliç Peynirlerinin Kimyasal Bileşimi ve Olgunlaşma Sırasındaki Mikrobiyal Florasındaki Değişimin Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y. ve Segre, J. A. (2018, 12 Şubat). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrmicro.2017.157
- Çağlar, A. (1990). *Kaşar Peynirinin Hızlı Olgunlaştırılmasında Proteaz ve Lipaz Enzimlerinin Kullanımı Üzerine Araştırmalar* (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Cain, T. C., Lubman, D. M., Weber, W. J. ve Vertes, A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(12), 1026–1030. doi:10.1002/rcm.1290081224
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M. ve Altieri, C. (2015). Screening of Propionibacterium spp. for potential probiotic properties. *Anaerobe*, 34, 169–173. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.06.003
- Campbell, W., Drake, M. a ve Larick, D. K. (2003). The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of fluid milk. *Journal of dairy science*, 86(1), 43–51. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73582-6

- Çayır, M. S. (2018). *İnek, Keçi Sütü ve Karışımlarından Üretilen Hatay Köy Peynirlerinin Depolama Süresince Bazı Kalite Kriterlerinin Belirlenmesi* (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Chamba, J. F. ve Perreard, É. (2002). Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait*, 82(1), 33–44. doi:10.1051/lait:2001003
- Chen, A. H., Larkin, J. W., Clark, C. J. ve Irwin, W. E. (1979). Textural Analysis of Cheese. *Journal of Dairy Science*, 62(6), 901–907. doi:10.3168/jds.S0022-0302(79)83346-9
- Chin, S. F., Liu, W., Albright, K. ve Pariza, M. W. (1992). Tissue levels of cis-9, trans-11 conjugated dienoic isomer of linoleic acid (CLA) in rats fed linoleic acid (LA). *The FASEB Journal*, 6, 1369.
- Clark, W. S., Brazis, A. R., Fowler, J. L., Johns, C. K. ve Nelson, F. E. (1978). Standard Plate Count Method. E. H. Marth (Ed.), *Standard methods for the examination of dairy products* içinde (14. bs., s. 77). Washington, DC: American Public Health Association. doi:10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004
- Coakley, M., Barrett, E., Murphy, J. J., Ross, R. P., Devery, R. ve Stanton, C. (2007). Cheese manufacture with milk with elevated conjugated linoleic acid levels caused by dietary manipulation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2919–2927. doi:10.3168/jds.2006-584
- Cossignani, L. ve Blasi, F. (2019). Fermentation as a strategy to increase conjugated linoleic acid in dairy products. *Large Animal Review*, 25, 101–104.
- Csapó, J. ve Varga-Visi, É. (2015). 4 – Conjugated linoleic acid production in fermented foods. W. Holzappel (Ed.), *Advances in Fermented Foods and Beverages* içinde (ss. 75–105). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 265. doi:10.1016/B978-1-78242-015-6.00004-9
- Cummins, C. S. ve Johnson, J. L. (2003). Genus I. Propionibacterium Orla-Jensen 1909. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* içinde (ss. 1346–1353).
- Dağdemir, E. (2001). *Salamura Beyaz Peynir Üretiminde Farklı Starter Kültür Kullanımının Peynir Kalitesi Üzerine Etkisi* (Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Demirci, M., Gündüz, H., Şimşek, O., Arıcı, M., Alpaslan, M., Kurultay, Ş. ve Bayramoğlu, F. (1994). Ülkemizde Yapılan Muhtelif Tip Peynirler. Her Yönüyle Peynir. 2. *Milli Süt ve*

- Ürünleri Sempozyumu* içinde (ss. 273–281). Tekirdağ: Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Demirci, Mehmet, Yüksel, A. N. ve Soysal, M. İ. (1992). *Memeden Mamül Maddeye Süt* (2. Baskı.). İstanbul: Hasad Yayıncılık Ltd. Sti.
- Domagała, J., Sady, M., Grega, T., Pustkowiak, H. ve Florkiewicz, A. (2010). The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 238–243. doi:10.1016/j.jfca.2009.11.002
- Donmez, M., Seckin, A. K., Sagdic, O. ve Simsek, B. (2005). Chemical characteristics, fatty acid compositions, conjugated linoleic acid contents and cholesterol levels of some traditional Turkish cheeses. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(3), 157–163. doi:10.1080/09637480500131137
- Duškóvá, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z. ve Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 107–114. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2016). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449. doi:10.2903/j.efsa.2013.3449
- Eralp, M. (1974). *Peynir Teknolojisi*. Ankara: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi.
- Everett, D. W. ve Auty, M. A. E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18, 759–773. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.012
- Folch, J., Lees, M. ve Sloan Stanley, G. . (1956). Floch_2007.pdf. *The Journal of biological chemistry*, 726, 497-. <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/05B01c03a.pdf> adresinden erişildi.
- Food and Agriculture Organizatin. (2019). *Dairy Market Review - Overview of global dairy market developments in 2018*. <http://www.fao.org/3/ca3879en/ca3879en.pdf> adresinden erişildi.
- Forouzanfar, F., Fazly Bazzaz, B. S. ve Hosseinzadeh, H. (2014). Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): A review on antimicrobial effects. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(12), 929–938. doi:10.22038/ijbms.2015.3849

- Fox, A. (2006). Mass Spectrometry for Species or Strain Identification after Culture or without Culture: Past, Present, and Future. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 44(8), 2677–2680. doi:10.1128/JCM.00971-06
- Freitas, R. de, Chuat, V., Madec, M.-N. N., Nero, L. A., Thierry, A., Valence, F., ... Carvalho, A. F. de. (2015). Biodiversity of dairy Propionibacterium isolated from dairy farms in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 70–77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.006
- Fritsche, J., Rickert, R., Steinhart, H., Yurawecz, M. P., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G. ve Ku, Y. (1999). Conjugated linoleic acid (CLA) isomers : formation , analysis , amounts in foods , and dietary intake [Review]. *Lipid - Fett*, 101(8), 272–276. doi:10.1002/(SICI)1521-4133(199908)101:8<272::AID-LIPI272>3.0.CO;2-W
- Fritsche, J. ve Steinhart, H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Eur. Food Res. Technol.*, 206, 77–82. doi:10.1007/s002170050218
- Fuke, G. ve Nornberg, J. L. (2017). Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 1–7. doi:10.1080/10408398.2012.716800
- Gnädig, S. (2002). *Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism*. University of Hamburg.
- Gnädig, Silke, Chamba, J. F., Perreard, E., Chappaz, S., Chardigny, J. M., Rickert, R., ... Sébédio, J. L. (2004). Influence of manufacturing conditions on the conjugated linoleic acid content and the isomer composition in ripened French Emmental chesse. *Journal of Dairy Research*, 71(3), 367–371. doi:10.1017/S0022029904000226
- Gölge, Ö ve Şahan, N. (2008). Geleneksel Yöntemle Üretilen Kelle Peynirlerinin Bazı Kalite Özellikleri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi* içinde (ss. 677–680). Erzurum.
- Gölge, Özgür. (2009). *Kelle Peynirlerinin Özellikleri Üzerine Starter Kültür Kullanımının Etkileri* (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Gong, M., Hu, Y., Wei, W., Jin, Q. ve Wang, X. (2019). Production of conjugated fatty acids : A review of recent advances. *Biotechnology Advances*, (September), 107454. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.107454

- Gorissen, L., Leroy, F., De Vuyst, L., De Smet, S. ve Raes, K. (2015). Bacterial Production of Conjugated Linoleic and Linolenic Acid in Foods: A Technological Challenge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1561–1574. doi:10.1080/10408398.2012.706243
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V. ve Bauman, D. E. (2000). Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by $\Delta 9$ -Desaturase. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2285–2291. doi:10.1093/jn/130.9.2285
- Guler, Z. ve Uraz, T. (2003). Proteolytic and lipolytic composition of Tulum cheeses. *MILCHWISSENSCHAFT-MILK SCIENCE INTERNATIONAL*, 58(9/10), 502–505. <https://www.researchgate.net/publication/286967298> adresinden erişildi.
- Gürsoy, O. ve Kesenkaş, H. (2011). Peynir mikrobiyolojisi. A. Hayaloğlu ve B. Özer (Ed.), *Peynir Biliminin Temelleri* içinde (s. 643). İzmir: Sidas.
- Ha, Y. L., Grimm, N. K. ve Parka, M. W. (1989). Newly Recognized Anticarcinogenic Fatty Acids: Identification and Quantification in Natural and Processed Cheeses. *J. Agric. Food Chem*, 37, 75–81. doi:10.1021/jf00085a018
- Halkman, A. K. ve Ayhan, H. (2000). *Gıdaların mikrobiyolojik analizi 2 mikroorganizma sayımı, Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Hayaloglu, A. A., Bansal, N. ve McSweeney, P. L. H. (2012). Influence of brine immersion and vacuum packaging on the chemistry, biochemistry, and microstructure of Mihalic cheese made using sheep's milk during ripening. *Dairy Science and Technology*, 92(6), 671–689. doi:10.1007/s13594-012-0083-4
- Hayaloğlu, A. A., Barbaros, H. O. ve Patrick, F. F. (2008). Cheeses of Turkey : 2 . Varieties ripened under brine. *Dairy Sci. Technol.*, 88, 225–244.
- Hayaloglu, Ali Adnan ve Karabulut, I. (2013). Characterization and Comparison of Free Fatty Acid Profiles of Eleven Varieties of Turkish Cheeses. *International Journal of Food Properties*, 16(6), 1407–1416. doi:10.1080/10942912.2011.587626
- Hennessy, A. A., Barrett, E., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. F., Devery, R. ve Stanton, C. (2012). The production of conjugated α -linolenic, γ -linolenic and stearidonic acids by strains of bifidobacteria and propionibacteria. *Lipids*, 47(3), 313–327. doi:10.1007/s11745-011-3636-z

- Hennessy, A. A., Eoin Barrett, B., Paul Ross, B. R., Gerald Fitzgerald, B. F., Rosaleen Devery, B. ve Catherine Stanton, B. (2011). The Production of Conjugated α -Linolenic, γ -Linolenic and Stearidonic Acids by Strains of Bifidobacteria and Propionibacteria. *Lipids*, 47, 313–327. doi:10.1007/s11745-011-3636-z
- Höll, L., Behr, J. ve Vogel, R. F. (2016). Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology*, 60, 84–91. doi:10.1016/j.fm.2016.07.003
- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J. ve Lay, Jr, J. O. (1996). Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10), 1227–1232. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6
- Houseknecht, L. K., Vanden Heuvel, J. P., Moya-Camarena, Silvia Y. Portocarrero, C. P., Peck, L. W., Nickel, K. P. ve Belury, M. A. (1998). Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun.*, 247(3), 911.
- Houwen, F. P., Dijkema, C., Stams, A. J. M. ve Zehnder, A. J. B. (1991). Propionate metabolism in anaerobic bacteria; determination of carboxylation reactions with ^{13}C -NMR spectroscopy. *BBA - Bioenergetics*, 1056(2), 126–132. doi:10.1016/S0005-2728(05)80278-6
- Huber, I., Pavlovic, M., Maggipinto, M., Konrad, R. ve Busch, U. (2018). Interlaboratory Proficiency Test Using MALDI-TOF MS for Identification of Food-Associated Bacteria. *Food Analytical Methods*, 11(4), 1068–1075. doi:10.1007/s12161-017-1084-y
- Hughenoltz, J., Hunik, J., Santos, H. ve Smid, E. (2002). Nutraceutical production by propionibacteria. *Le Lait*, 82(1), 103–112. doi:10.1051/lait:2001009
- Hur, S. J., Kim, H. S., Bahk, Y. Y. ve Park, Y. (2017). Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. *Livestock Science*. doi:10.1016/j.livsci.2016.11.016
- İnanç, N. (2006). Konjuge Linoleik Asit-Obezite Etkileri. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 15(2), 137–141.

- Ip, C., Singh, M., Thompson, H. J. ve Scimeca, J. A. (1994). Conjugated Linoleic Acid Suppresses Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity of the Mammary Gland in the Rat. *Cancer Research*, 54(5), 1212–1215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118808> adresinden erişildi.
- Jack, R. F. ve Paterson, A. (1992). Texture of hard cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 160–164.
- Jiang, J., Björck, L., Fondén, R., Björk, L. ve Fonden, R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol*, 85(1), 95–102. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00481.x
- Jones, S., Ma, D. W. L., Robinson, F. E., Field, C. J. ve Clandinin, M. T. (2000). Isomers of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Are Incorporated into Egg Yolk Lipids by CLA-Fed Laying Hens. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2002–2005. doi:10.1093/jn/130.8.2002
- Kamber, U. (2008). The traditional ceeses of Turkey: “Marmara Region”. *Food Reviews International*, 24(1), 175–192. doi:10.1080/87559120701764613
- Kanak, E. K. ve Yilmaz, S. Ö. (2018). Maldi-tof mass spectrometry for the identification and detection of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from local cheeses. *Food Science and Technology*, 39, 462–469.
- Kaya, S. (2002). Effect of salt on hardness and whiteness of Gaziantep cheese during short-term brining. *Journal of Food Engineering*, 52, 155–159.
- Kelly, G. S. (2001). Conjugated linoleic acid: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 6(4), 367–382.
- Kemp, M. Q., Jeffy, B. D. ve Romagnolo, D. F. (2003). Conjugated Linoleic Acid Inhibits Cell Proliferation through a p53-Dependent Mechanism: Effects on the Expression of G1-Restriction Points in Breast and Colon Cancer Cells. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3670–3677. doi:10.1093/jn/133.11.3670
- Kim, J. H., Kim, Y., Kim, Y. J. ve Park, Y. (2016). Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 221–244. doi:10.1146/annurev-food-041715-033028
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. ve Shimizu, S. (2002). Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria. *JAOCS*, 79(2), 159–163. doi:10.1007/s11746-002-0451-4

- Koussémon, M., Combet-Blanc, Y., Patel, B. K. C., Cayol, J. L., Thomas, P., Garcia, J. L. ve Ollivier, B. (2001). Propionibacterium microaerophilum sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1373–1382. doi:10.1099/00207713-51-4-1373
- Kramer, J. K. G., Parodi, P. W., Jensen, R. G., Mossoba, M. M., Yurawecz, M. P. ve Adlof, R. O. (1998). Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids*, 33(8), 835. doi:10.1007/s11745-998-0279-6
- Kurban, S. (2006). Konjuge Linoleik Asit Metabolizmas › ve Fizyolojik Etkileri Physiological Effects. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 4(2), 89–100.
- Kusano, K., Yamada, H., Niwa, M. ve Yamasato, K. (1997). Propionibacterium cyclohexanicum sp. nov., a new acid-tolerant ω - cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 825–831. doi:10.1099/00207713-47-3-825
- Langsrud, T. ve Reinbold, W. G. (1973). Flavor development and microbiology of swiss cheese. *Journal of Milk Food Technology*, 37, 26–40.
- Lavillonnière, F., Martin, J. C., Bougnoux, P. ve Sébédio, J.-L. (1998). Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in french cheeses. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(5), 343–352. doi:10.1007/s11746-998-0051-6
- Ledina, T., Golob, M., Djordjevic'1, J., Djordjevic'1, D., Magas, • Vladimir, Colovic, S. ve Snezana Bulajic, •. (2018). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of Serbian artisanal cheeses microbiota. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 13, 309–314. doi:10.1007/s00003-018-1164-y
- Lemée, R., Gagnaire, V. ve Maubois, J. (1998). Strain variability of the cell-free proteolytic activity of dairy propionibacteria towards ~ -casein peptides. *Lait*, 78, 227–240.
- Lin, H., Boylston, D., Chang, M. J., Luedecke, L. O. ve Shultz, T. D. (1995). Survey of the Conjugated Linoleic Acid Contents of Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2358–2365. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76863-1
- Lin, T. Y., Lin, C. W. ve Wang, Y. J. (2002). Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from Lactobacillus acidophilus and Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii. *Journal of Food Science*, 67(4), 1502–1505. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb10312.x

- Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M. ve De La Fuente, M. A. (2005). Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids*, 40(5), 445–454. doi:10.1007/s11745-005-1403-3
- Luna, P., Juárez, M. ve de la Fuente, M. A. (2007). Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Food Chemistry*, 103(4), 1465–1472. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.062
- Malik, A. C., Reinbold, G. W. ve Vedamuthu, E. R. (1968). An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 14(11), 1185–1191. doi:10.1139/m68-199
- Marshall, D. L. ve Odame-Darkwah, J. K. (1995). Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. *LWT - Food Science and Technology*, 28(2), 222–226. doi:10.1016/S0023-6438(95)91554-0
- Marshall, R. T. (1992). Standard methods for the examination of dairy products. 16th ed. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19950104912> adresinden erişildi.
- Martley, F. G. ve Michel, V. (2001). Pinkish colouration in Cheddar cheese--description and factors contributing to its formation. *The Journal of Dairy Research*, 68(2), 327–32. doi:10.1017/s0022029901004836
- McGuire, M. A. ve McGuire, M. K. (1999). Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 77(1985), 1–8. doi:10.2527/jas2000.00218812007700ES0033x
- Meile, Léo, Dasen, G., Miescher, S., Stierli, M. ve Teuber, M. (1999). Classification of propionic acid bacteria and approaches to applied genetics. *Le Lait*, 79(1), 71–78. doi:10.1051/lait:199915
- Meile, Leo, Le Blay, G. ve Thierry, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.019
- Moloney, F., Yeow, T. P., Mullen, A., Nolan, J. J. ve Roche, H. M. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2

- diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 887–895. doi:10.1093/ajcn/80.4.887
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S. ve Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 2–8. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.07.005
- Nagao, T., Shimada, Y., Yamauchi-Sato, Y., Yamamoto, T., Kasai, M., Tsutsumi, K., ... Tominaga, Y. (2002). Fractionation and enrichment of CLA isomers by selective esterification with *Candida rugosa* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(3), 303–308. doi:10.1007/s11746-002-0478-6
- Nigam, P. S. ve Luke, J. S. (2016). Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, 93–100. doi:10.1016/j.cofs.2016.02.004
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. ve Shimizu, S. (2005). Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 100(4), 355–364. doi:10.1263/jbb.100.355
- Onakpoya, I. J., Posadzki, P. P., Watson, L. K., Davies, L. A. ve Ernst, E. (2012). The efficacy of long-term conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on body composition in overweight and obese individuals: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Nutrition*, 51(2), 127–134. doi:10.1007/s00394-011-0253-9
- Önal-Darılmaz, D. (2010). *Geleneksel Türk peynirlerinde propiyonik asit bakteri türlerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması* (Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Oner, Z. ve Aloglu, H. (2004). Some characteristics of Mihalic, a traditional Turkish cheese. *MILCHWISSENSCHAFT-MILK SCIENCE INTERNATIONAL*, 59, 628–631. <https://avesis.sdu.edu.tr/yayin/f98d1e12-dbc5-49f4-a986-57bb0c7d4544/some-characteristics-of-mihalic-a-traditional-turkish-cheese> adresinden erişildi.
- Özcan, T. (2000). *Starter, Proteaz ve Lipaz Kullanımının Mihaliç Peynirinin Olgunlaşma Süresine Etkisi*. Uludağ University.

- Özdemir, C., Özdemir, S., Demirci, M., Çelik, Ş. ve Sönmez, İ. (2004). The Microbiological and Physicochemical Properties of Mihaliç Cheeses. *International Dairy Symposium*. içinde (s. 243 s).
- Özer, C. O., Kılıç, B. ve Kılıç, G. B. (2016). In-vitro microbial production of conjugated linoleic acid by probiotic *L. plantarum* strains: Utilization as a functional starter culture in sucuk fermentation. *Meat Science*, 114, 24–31. doi:10.1016/j.meatsci.2015.12.005
- Özer, E. (2015). *Mihaliç Peyniri Üretiminde Farklı Starter Kültür Kombinasyonları Kullanımı Üzerine Bir Araştırma* (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Özer, E. ve Kesenkaş, H. (2019). The effect of using different starter culture combinations on ripening parameters, microbiological and sensory properties of Mihaliç cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1202–1211. doi:10.1007/s13197-019-03583-2
- Özer, Z., Aloğlu, H. ve Şanlıdere, A. (2003). Keçi Sütü Kullanılarak Yapılan Mihaliç Peynirinin Özelliklerinin Belirlenmesi. *SEYES Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu* içinde (s. 141). İzmir.
- Pariza, M.W., Ashoor, S. H., Chu, F. S. ve Lund, D. B. (1979). Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters*, 7, 63–69.
- Pariza, Michael W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 1132S-1136S. doi:10.1093/ajcn/79.6.1132S
- Parodi, P. W. (1977). Conjugated Octadecadienoic Acids of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 60(10), 1550–1553. doi:10.3168/jds.S0022-0302(77)84068-X
- Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R. ve Busch, U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The open microbiology journal*, 7, 135–41. doi:10.2174/1874285801307010135
- Peng, Y., West, G. E. ve Wang, C. (2006). Consumer attitudes and acceptance of CLA-enriched dairy products. *Canadian Journal of Agricultural Economics*, 54(4), 663–684. doi:10.1111/j.1744-7976.2006.00072.x
- Poonam, Pophaly, S. D., Kumar, S. T., De, S. ve Singh, R. (2012). Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review. *World J Microbiol Biotechnol*, 28, 3081–3095. doi:10.1007/s11274-012-1117-z

- Rabah, H., Rosa do Carmo, F. ve Jan, G. (2017). Dairy Propionibacteria: Versatile Probiotics. *Microorganisms*, 5(2), 24. doi:10.3390/microorganisms5020024
- Rainio, A., Vahvaselkä, M., Suomalainen, T. ve Laakso, S. (2001). Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8), 735–740. doi:10.1139/cjm-47-8-735
- Rainio, Auli, Vahvaselkä, M., Suomalainen, T. ve Laakso, S. (2002). Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Lait*, 82, 91–101. doi:10.1051
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C. ve Baines, S. K. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. *Small Ruminant Research*, 123(1), 155–159. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.10.012
- Rehberger, J. L. ve Glatz, B. A. (1998). Response of cultures of *Propionibacterium* to acid and low pH: Tolerance and inhibition. *Journal of Food Protection*, 61(2), 211–216. doi:10.4315/0362-028X-61.2.211
- Reyes, E., Gómez-Cortés, P., de la Fuente, M. A., Linares, D. M., Tornadijo, M. E. ve Fresno, J. M. (2019). CLA-producing adjunct cultures improve the nutritional value of sheep cheese fat. *Food Research International*, 116. doi:10.1016/j.foodres.2018.09.016
- Richoux, R., Faivre, É. ve Kerjean, J. (1998). Effet de la teneur en NaCl sur la fermentation du lactate par *Propionibacterium freudenreichii* dans des minifromages à pâte cuite. *Lait*, 78, 319–331.
- Rosa do Carmo, F. L., Rabah, ; Houem, Cordeiro, B. F., Silva, S. H. Da, Jan, G., Azevedo, V. ve Carvalho, R. D. de O. (2017). Applications of Probiotic Bacteria and Dairy Foods in Health. *Current Research in Microbiology içinde* .
- Salsinha, A. S., Pimentel, L. L., Fontes, A. L., Gomes, A. M. ve Rodríguez-Alcalá, L. M. (2018). Microbial Production of Conjugated Linoleic Acid and Conjugated Linolenic Acid Relies on a Multienzymatic System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(4), 1–21. doi:10.1128/mmbr.00019-18
- Şen, M. K. C. (1991). *Mihaliç Peynirinin Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi Üzerine Araştırmalar* (Doktora Tezi), Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

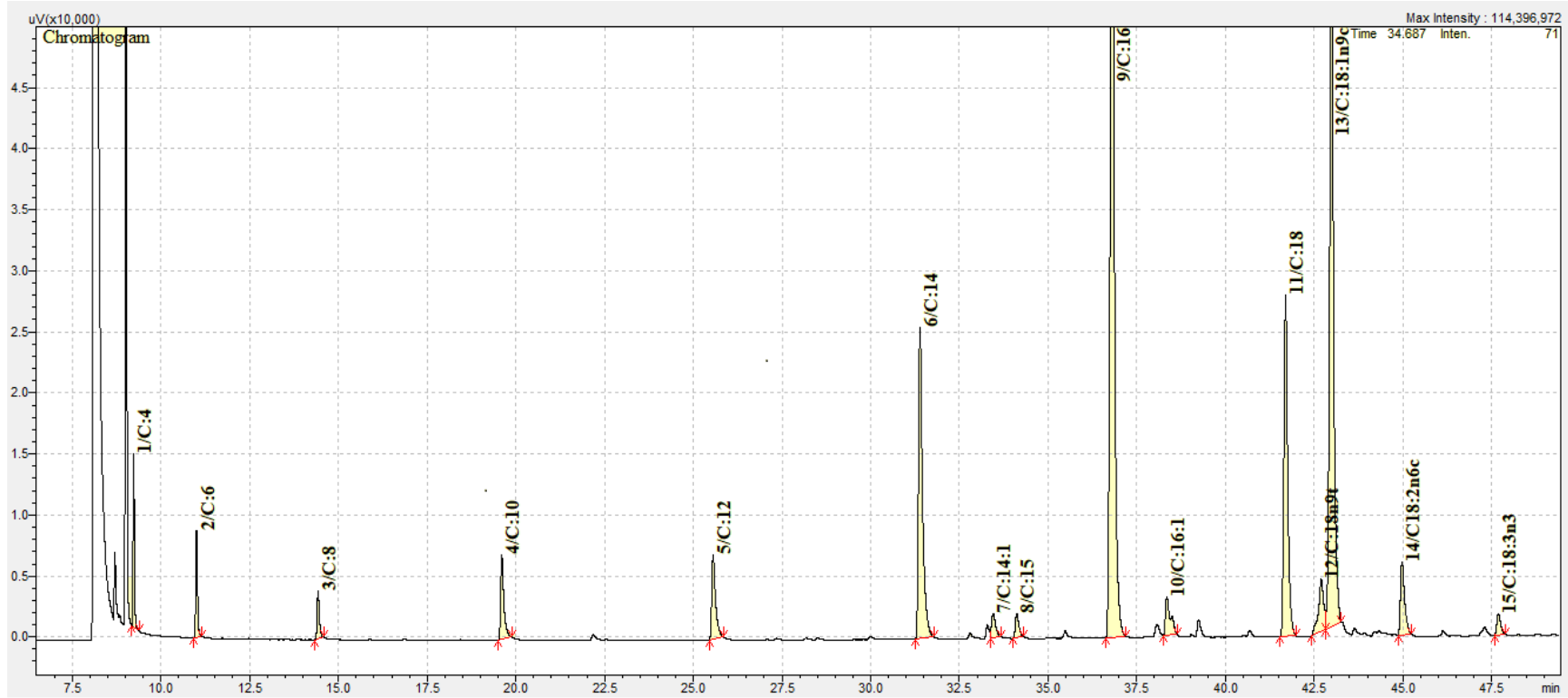
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J. M. ve Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543–551. doi:10.1086/600885
- Seuylemezian, A., Aronson, H. S., Tan, J., Lin, M., Schubert, W. ve Vaishampayan, P. (2018). Development of a Custom MALDI-TOF MS Database for Species-Level Identification of Bacterial Isolates Collected From Spacecraft and Associated Surfaces. *Frontiers in microbiology*, 9, 780. doi:10.3389/fmicb.2018.00780
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. ve Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - A review. *International Dairy Journal*, 14(1), 1–15. doi:10.1016/S0958-6946(03)00151-1
- Solak Bulut, B. ve Akın, N. (2013). Determination of Some Properties of Traditional Mihalic Cheese Made from Raw and Pasteurized Cow ' s Milk During Ripening Period. *Middle East Journal of Scientific Research*, 13(January), 1180–1185. doi:10.5829/idosi.mejsr.2013.13.9.824
- Stackebrandt, E., Cummins, C. S. ve Johnson, J. L. (2006). Family Propionibacteriaceae: The Genus Propionibacterium. E. S. Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer (Ed.), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria* içinde (3., ss. 400–418). New York, NY 10013, USA: Springer. doi:10.1007/978-3-642-38954-2
- Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M. ve Yamada, K. (1998). Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids*, 33(5), 521–527. doi:10.1007/s11745-998-0236-4
- Szczesniak, A. S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13, 215–225.
- Thierry.A, Falentin, H., Deutsch, S. M. ve Jan, G. (2011). Propionibacterium spp. *Encyclopedia of dairy sciences* içinde (2nd editio., ss. 403–411). San Diego: Academic Press.
- Thierry, A., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Dalmaso, M., Cousin, F. J. ve Jan, G. (2011). New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 19–27. <http://www.bacterio.cict.fr> adresinden erişildi.

- Tilsala-Timisjärvi, A. ve Alatossava, T. (2001). Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR. *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/S0168-1605(01)00462-7
- Üçüncü, M. (2004). *A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi*. İzmir: Meta Basım.
- Varga-Visi, E., Salamon, R. V, Lóki, K. ve Csapó, J. (2012). Gas chromatographic analysis of conjugated linoleic acid. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*, 5, 52–62. http://www.acta.sapientia.ro/acta-alim/C5/alim5_4.pdf adresinden erişildi.
- Verhulst, A., Janssen, G., Parmentier, G. ve Eyssen, H. (1987). Isomerization of polyunsaturated long chain fatty acids by propionibacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(1–2), 12–15. doi:10.1016/S0723-2020(87)80049-8
- Virsangbhai, C. K., Goyal, A., Tanwar, B. ve Sihag, M. K. (2020). Potential Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid : An Important Functional Dairy Ingredient. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 11(4), 200–213. doi:10.9734/EJNFS/2019/v11i430162
- Vorob'eva, L. I., Khasaeva, F. M., Vasilyuk, N. V. ve Trenquil, E. (2011). Characterization of propionic acid bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Microbiology*, 80(5), 664–671. doi:10.1134/S0026261711050183
- Wang, L.-M., Lv, J.-P., Chu, Z.-Q., Cui, Y.-Y. ve Ren, X.-H. (2007). Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chemistry*, 103(2), 313–318. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.065
- Wang, L. M., Lv, J. P., Chu, Z. Q., Cui, Y. Y. ve Ren, X. H. (2007). Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chemistry*, 103(2), 313–318. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.065
- Watkins, B. A., Li, Y. ve Seifert, M. F. (1999). Bone metabolism and dietary Conjugate Linoleic Acid. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza ve G. J. Nelson (Ed.), *Conjugated Linoleic Acid: The Early Years in Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* içinde (C. 1, ss. 253–255). Champaign IL: AOCS Press. doi:10.1201/9781439822166
- Werner, S. a., Luedecke, L. O. ve Shultz, T. D. (1992). Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: effects of cheese

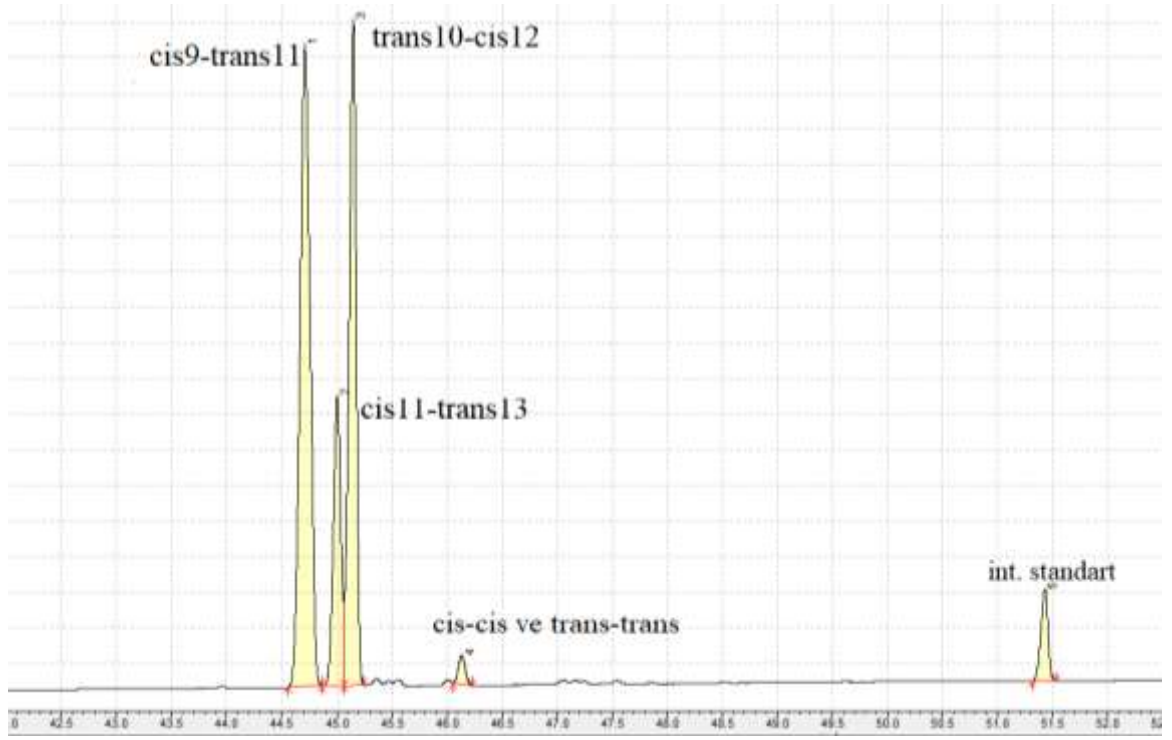
- cultures, processing, and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1817–1821. doi:10.1021/jf00022a017
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. ve Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, 965–974. doi:10.1007/s00253-011-3783-4
- Xu, S., Boylston, T. D. ve Glatz, B. A. (2004). Effect of Lipid Source on Probiotic Bacteria and Conjugated Linoleic Acid Formation in Milk Model Systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(6), 589–595. doi:10.1007/s11746-006-0946-z
- Yalınay Çırak, M. (2010). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi). *Environmental Science & Technology* içinde (ss. 0–3). doi:10.3969/j.issn.1003-6504.2010.10.032
- Yang, B., Gao, H., Stanton, C., Ross, R. P., Zhang, H., Chen, Y. Q., ... Chen, W. (2017). Bacterial conjugated linoleic acid production and their applications. *Progress in Lipid Research*, 68(August), 26–36. doi:10.1016/j.plipres.2017.09.002
- Yang, L., Cao, Y., Chen, J.-N. ve Chen, Z.-Y. (2009). Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4212–4217. doi:10.1021/jf900657f
- Yiğit Doğan, S. (2011). *Lactobacillus, Propionibacterium ve Bifidobacterium Cinslerine ait Farklı Türlerin Konjuge Linoleik Asit Üretimlerinin Probiyotik Açısından Önemi* (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yöney, Z. (1955). Mihaliç Peynirlerinin Yapılışları Terkipleri Üzerinde Araştırmalarla Bunların Diğer Nev'ileri ile Kıyaslanmaları. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 76(40).
- Yuksekdag, N. Z., Onal Darılmaz, D. ve Beyatli, Y. (2013). Dairy propionibacterium strains with potential as biopreservatives against foodborne pathogens and their tolerance-resistance properties. *Eur Food Res Technol*, 238, 17–26. doi:10.1007/s00217-013-2066-y
- Zárate, G., Chaia, A. P., González, S. ve Oliver, G. (2000). Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1214–1221. doi:10.4315/0362-028X-63.9.1214

Zlatanov, S., Laskaridis, K., Feist, C. ve Sagredos, A. (2002). CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 78(4), 471–477. doi:10.1016/S0308-8146(02)00159-0

EKLER



Ek 1: Toplam yağ asitleri kromotogramı



Ek2. KLA izomerleri kromotogramı

ÖZGEÇMİŞ

Göksel Tırpancı Sivri 1984 yılında Tekirdağ Şarköy ilçesinde doğdu. Bartın Köksal Toptan Lisesi'nden mezun olduktan sonra Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. 2007 yılında mezun olduktan sonra Süttaş Bursa Karacabey fabrikasında 2 yıl üretim mühendisi olarak çalıştı. 2010 yılında Milli Eğitim Bakanlığı'nın sağladığı yurt dışı eğitim bursuyla Ohio State Üniversitesinde yüksek lisans eğitimine başladı. Ozon-CIP sistemleri konusunda hazırladığı çalışma ile yüksek lisansını tamamladıktan sonra 2012 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Aynı yıl doktora eğitimine başlayan Göksel Tırpancı Sivri evli ve iki kız çocuğu annesidir.