

***Listeria monocytogenes*'in İnek ve Koyun Sütünden Yapılan Beyaz Peynirlerin İmalat, Olgunlaşma ve Depolama Aşamalarındaki Durumu**

Muhammet ARICI, Mehmet DEMİRCİ, H. Hüsnü GÜNDÜZ
Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 59100 Tekirdağ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 07.05.1998

Özet: İnek ve koyun sütlerinden beyaz peynir yapımı sırasında, olgunlaştırma ve depolama aşamalarında *Listeria monocytogenes*'in durumu araştırılmıştır. Pastörize inek ve koyun sütleri yaklaşık 10^3 adet/ml *L. monocytogenes* ile inoküle edilmiş ve beyaz peynire işlenmiştir. Starter kültür olarak %1 oranında yoğurt kültürü kullanılmıştır. Peynirler imal edilip ön olgunlaşması tamamlandıktan sonra salamura içinde PET kavanozlarda 20 hafta boyunca 4°C'de muhafaza edilip belirli aralıklarla incelenmiştir.

Bütün peynir örneklerinde *L. monocytogenes* sayısı oda sıcaklığında 5. gün sonunda 10^5 adet/g'a ulaşmış, pH da 5,0'e kadar gerilemiştir. Soğuk hava deposunda muhafaza edilen peynirlerde *L. monocytogenes* sayısı 8. hafta sonunda $>10^4$ adet/g olarak tesbit edilmiş, 20. hafta sonunda inek peynirinde >10 adet/g, koyun peynirinde >100 adet/g olarak bulunmuştur. pH değerleri 20. hafta sonunda inek peynirinde 4,18; koyun peynirinde 3,95 olarak ölçülmüştür.

Bütün peynir örneklerinde su aktivitesi (a_w) değerleri 1. hafta sonunda 0,97, 20. hafta sonunda 0,966 olarak hesaplanmıştır.

Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Turkish white cheese made from cow's and sheep's milk

Abstract: In this research survival *Listeria monocytogenes* has been investigated during manufacturing, ripening and storage of the turkish white cheese made from cow's milk and sheep's milk. Pasteurized cow's and sheep's milk were inoculated with 10^3 *L. monocytogenes* /ml and than processed into cheese. Cheese samples were stored in PET jars after pre-ripening during 20 weeks at 4°C and analysis were carried out at certain period.

In all samples after 5 days in room temperature *L. monocytogenes* count has reached to 10^5 /g and pH decreased to 5.0. *L. monocytogenes* count in the cold stored cheese samples was determined as $>10^4$ /g after 8 weeks; >10 /g in cheese samples made of cow's milk and >100 /g in cheese samples made of sheep' milk after 20 week of storage. pH values in the cheese samples of cow's milk and sheep's milk were found as 4.18 and 3.95 respectively after 20 week of storage.

Water activity (a_w) in all samples was calculated as 0.97 after 1 week and 0.966 after 20 week of storage.

Giriş

Özellikle 1980'li yıllarda süt ve ürünlerinin tüketimine bağlı olarak çeşitli ülkelerde *Listeria monocytogenes*'den kaynaklanan ölüm oranı yüksek gıda zehirlenmeleri görülmüştür (1, 2). Bundan dolayı süt ve ürünlerinde, özellikle yumuşak peynirlerde *L. monocytogenes* varlığı üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Pastörizasyon gıda maddesinin patojen mikroorganizmalardan arındırılması için en etkili metodlardan birisidir. Ancak pastörizasyon sonrası sekonder bir kontaminasyon veya işlem hatası *Listeria* veya diğer patojen mikroorganizmaların çoğalma, hastalık ve gıda zehirlenmesi riskini arttırmaktadır.

Sütte *L. monocytogenes* varlığı ve sütün bu bakteri ile sekonder bir kontaminasyonu durumunda çeşitli peynirlere işlenmesi, olgunlaşma ve depolama aşamalarında mikroorganizmanın durumu çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15).

Bu araştırmada inek ve koyun sütlerinden *L. monocytogenes* kontamine edildikten sonra peynir işletmesi şartlarında beyaz peynir yapılmış, *L. monocytogenes*'in imalat, olgunlaştırma ve depolama şartlarındaki durumu incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Listeria monocytogenes kültürü:

Bu araştırmada kullanılan *L. monocytogenes* kültürü İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalından temin edilmiştir. Yousef ve Marth (10)'ın bildirdiği şekilde Tryptose Soya Broth'da (Oxoid CM 129) 35°C'de 24 saat inkübe edilerek hazırlanan bakteri kültürü 200 ml steril yağsız süte inoküle edilmiş ve 35°C'de 48 saat inkübasyondan sonra %2'lik sodyum sitrat çözeltisinde seyreltilerek yaklaşık 10³ adet/ml olacak şekilde kazan sütüne ilave edilmiştir.

Starter kültür:

Ülkemizdeki küçük ölçekli bir çok süt işletmesinde beyaz peynir üretiminde starter olarak yoğurt kültürü tercih edilmektedir. Bu da işletmede hazır yoğurdun ilavesi şeklinde yapılmaktadır. Hijyenik durumları nisbeten kötü olan küçük ölçekli işletmelerdeki şartlar göz önüne alındığından, bu araştırmada laktik kültür yerine, beyaz peynir yapımında çok sık kullanılmayan termofilik starter kültür kullanılmıştır. (*Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. delbrückii* ssp. *bulgaricus*) (16) Ch. Hansen firmasından temin edilmiştir). Saf kültürler yağsız steril sütte ayrı ayrı 37°C'de 14-16 saat inkübe edilerek hazırlandıktan (1:1; v/v) sonra kazan sütüne ilave edilmiştir.

Beyaz peynirin üretilmesi ve örneklenmesi:

Araştırmada özellikleri Tablo 1'de verilen inek ve koyun sütleri kullanılmıştır. Süt 72°C'de 2 dakika süreyle pastörize edilip yaklaşık 10°C'ye soğutulurak buhar ceketli küçük bir kazana alınmış ve *L. monocytogenes* inoküle edilmiştir. *L. monocytogenes*'le kontamine edilmiş süt yaklaşık bir saat sonra 35°C'ye ısıtılmış ve %1 (v/v) oranında termofilik starter kültür ve %0,15 CaCl₂ ilave edilerek süt bu sıcaklıkta 30 dak. fermentasyona

birakılmıştır. Mikrobiyal rennet (Mayasan) ilave edilen süt 45 dakikada pıhtılaşmış ve pıhtı kesilerek preslenmiştir. Beş saatlik preslemeden sonra Peynir kalıpları (~ 10 x 10 x 10 cm) oda sıcaklığında 24 saat süreyle %12'lik salamurada (NaCl) bekletilmiştir. Salamuradan alınan kalıplar %6'lık salamura ile PET kavanozlara konulmuş, pH yaklaşık 5,0 oluncaya kadar oda sıcaklığında bırakılmıştır. Daha sonra toplam 20 hafta süreyle 4°C'de muhafaza edilmiştir. Denemeler iki tekerrürlü olarak yapılmış olup, laboratuvar analizlerinde en az iki örnekle çalışılmıştır. Tablo 2'de beyaz peynirin üretim akış şeması görülmektedir.

Tablo 1. Peynir üretiminde kullanılan inek ve koyun sütlerinin bileşimleri.

	İnek sütü	Koyun sütü
Yağsız kurumadde (%)	9,00	13,50
Yağ (%)	4,00	7,50
pH	6,50	6,40

L. monocytogenes, pH, tuz ve rutubet belirlenmesinde peynirin üretim, olgunlaşma ve depolama aşamalarında iki paralel olmak üzere örnek alınmıştır. Pastörize süt, peynir altı suyu, teleme ve olgunlaşma safhalarında aralıklarla 20 hafta boyunca örnek alınıp analiz edilmiştir.

L. monocytogenes ilave edilerek peynir imali sırasında Ryser ve Marth (9)'ın bildirdikleri "Biological Safety Comitee" kurallarına riayet edilmiştir.

L. monocytogenes sayısının belirlenmesi:

Pastörize süt ön zenginleştirmeden sonra (10 ml süt + 90 ml Tryptose Soya Broth (Oxoid CM 129); 30°C, 24 ve 48 saat) cycloheximide (Sigma C 6255) ve nalidixic

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre
Pastörizasyon	72	2 dak
<i>L. monocytogenes</i> ilavesi	10	60 dak
Starter kültür ve CaCl ₂ ilavesi	35	30 dak
Rennet ilavesi	35	45 dak
Pıhtının kesilip preslenmesi	oda sıcaklığı	5 saat
Peynir kalıplarının salamurada bekletilmesi (%12 NaCl)	"	24 saat
Ambalajlama (%6'lık salamura ile)	"	3 gün
Soğukta muhafaza	4	20 hafta

Tablo 2. Beyaz peynir üretim akış şeması

acide (Sigma N 4282) ile modifiye edilmiş McBride Agar (Hi Media M 386) (MMBA) üzerine sürme usulüyle ekim yapılmıştır. Peynir örneği (25 g) %2'lik steril sodyum sitrat çözeltisinde (225 ml, $42 \pm 2^\circ\text{C}$) homojenize edildikten sonra MMBA üzerine sürme metoduyla ekim yapılmıştır. Bütün MMBA plakları 30°C 'de 48 saat inkübe edilmişlerdir (17).

MMBA üzerinde gelişen tipik *L. monocytogenes* kolonileri sayılmış, her plaktan en az 3 koloni alınarak Tryptone Soya Agar'a (Oxoid CM 131) transfer edilmiş ve 30°C 'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu ortam üzerinde gelişen kolonilere gram boyama, katalaz ve Henry testleri, SIM Medium'da (Oxoid CM 435) hareketlilik, β -Hemoliz, CAMP (*Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* ile) ve bazı karbonhidratların (Xylose Sigma X 1500, Rhamnose Sigma R 3875 ve Mannitol Sigma M 4125) fermentasyonu ve nitrat reduksiyon (Nitrat Broth, Merck 10204) testleri uygulanmıştır.

Peynir analizleri:

pH belirlenmesinde Fisher Accumet Model 810 pH-metre kullanılmıştır. Yağ ve su oranının belirlenmesinde "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" da bildirilen metodlar kullanılmıştır (18). Su aktivitesi Marcos ve Esteban (19)'ın bildirdikleri metoda göre hesaplanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Peynir örneklerinin bazı kimyasal özellikleri:

İnek ve koyun sütünden imal edilen beyaz peynirlerin imalattan sonra ve olgunlaşma safhalarında olmak üzere su (%), yağ (%), tuz (%) ve su aktivitesi (a_w) değerleri Tablo 3 ve 4'de verilmiştir.

İnek sütünden yapılan beyaz peynirde (birinci deneme) olgunlaşma periyodunun başında (1. hafta) ve sonunda (20. hafta) su oranı sırasıyla %62,92 ve %58,10; yağ %19,75 ve %21,00; tuz %3,48 ve 3,60 olarak bulunmuş, su aktivitesi (a_w) 0,97 ve 0,966 hesaplanmıştır. İkinci denemede su oranı %63,10 ve %58,40; yağ %19,50 ve %20,30; tuz %3,35 ve 3,50 olarak tesbit edilmiş, su aktivitesi (a_w) birinci denemedeği gibi hesaplanmıştır.

Koyun sütü kullanılarak imal edilen beyaz peynirde olgunlaşmanın başında ve sonunda su oranı sırasıyla %59,04 ve %56,97; yağ % 23,50 ve 25; tuz % 3,30 ve %3,42 olarak bulunmuş, su aktivitesi inek peynirindeki

gibi hesaplanmıştır. İkinci denemedeği sonuçlar birinci denemedeğilerle benzerlik göstermektedir. Su oranları olgunlaşmanın başında ve sonunda olmak üzere sırasıyla %59,30 ve %57,20; yağ %23,50 ve 25,00; tuz %3,30 ve %3,40 olarak bulunmuş, su aktivitesi diğer denemelerdeki gibi hesaplanmıştır. Ryser ve Marth (9) laboratuvar şartlarında *L. monocytogenes*'in 0,932 su aktivitesinde gelişebildiğini tesbit etmişlerdir. Buna göre bu çalışmada hesaplanan su aktivitesi değerleri *L. monocytogenes*'in gelişmesi için uygunluk göstermektedir.

Tablo 3. İnek sütünden yapılan beyaz peynir örneklerinin bazı kimyasal özellikleri.

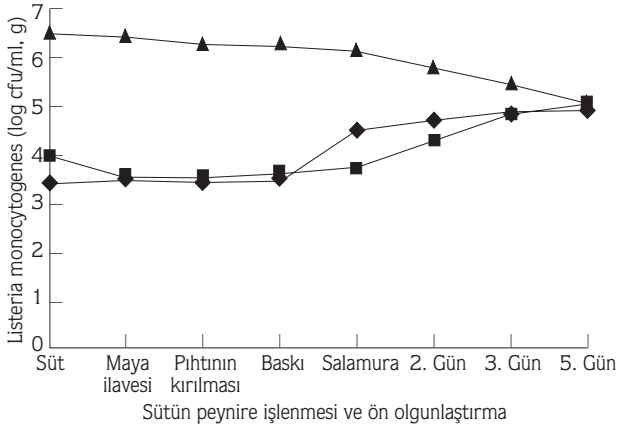
Deneme	1. hafta			a_w
	Su (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	
1. Deneme	62,92	19,75	3,48	0,97
2. Deneme	63,10	19,50	3,35	0,97
20. hafta				
1. Deneme	58,10	21,00	3,60	0,966
2. Deneme	58,40	20,30	3,50	0,966

Tablo 4. Koyun sütünden yapılan beyaz peynir örneklerinin bazı kimyasal özellikleri.

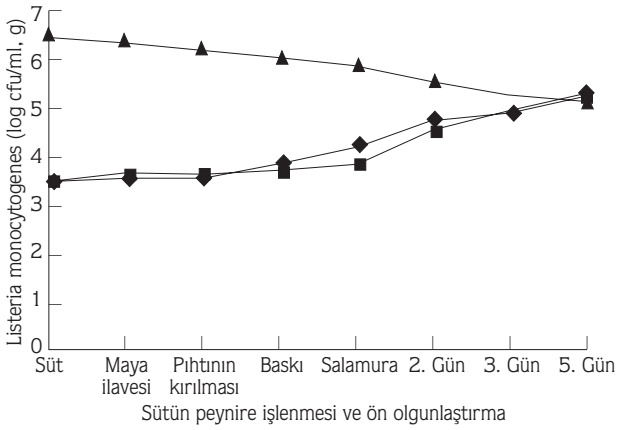
Deneme	1. hafta			a_w
	Su (%)	Yağ (%)	Tuz (%)	
1. Deneme	59,04	23,50	3,30	0,97
2. Deneme	59,30	23,50	3,30	0,97
20. hafta				
1. Deneme	56,97	25,00	3,42	0,966
2. Deneme	57,20	25,50	3,40	0,966

L. monocytogenes'in beyaz peynirin imalat, olgunlaşma ve depolama safhalarındaki durumu:

Termofilik starter kültür yanında pastörize süte yaklaşık 10^3 adet/ml *L. monocytogenes* ilavesiyle imal edilen inek ve koyun peynirleri imalat ve olgunlaşma safhaları ile depolama sırasında bu bakterinin durumu ve pH'sı bakımından da incelenmiştir. Telemde yapılan analizde önemli gelişme tesbit edilmiş, 5. gün sonunda bakteri sayısı hem inek sütünden yapılan hem de koyun sütünden yapılan peynirlerde 10^5 adet/g'a kadar ulaşmıştır. Bu zaman zarfında bütün peynir örneklerinde pH 5,0 civarına gerilemiştir. Şekil 1 ve 2'de peynirlerin imalatı boyunca *L. monocytogenes*'in durumu ve ortalama pH değerleri görülmektedir.

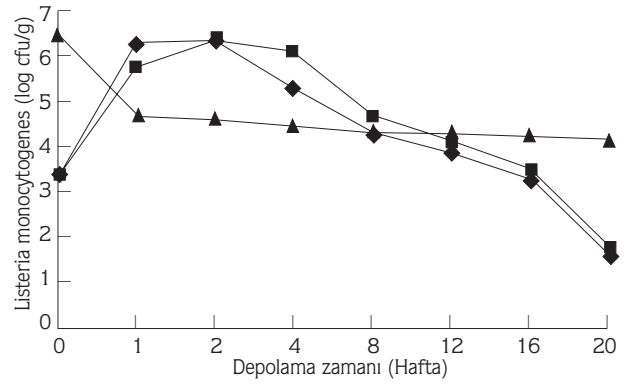


Şekil 1. İnek sütünden beyaz peynir imalatı süresince *L. monocytogenes*'in durumu ve ortalama pH değerleri. ◆1. Deneme ■2. Deneme ▲pH

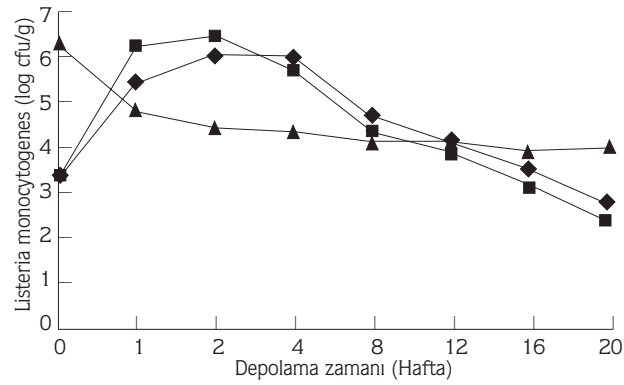


Şekil 2. Koyun sütünden beyaz peynir imalatı süresince *L. monocytogenes*'in durumu ve ortalama pH değerleri. ◆1. Deneme ■2. Deneme ▲pH

Oda sıcaklığında 5 günlük olgunlaştırmadan sonra soğuk hava deposuna (4°C) alınan peynir örneklerinde *L. monocytogenes*'in durumu 20. haftaya kadar incelenmiştir. Gerçi beyaz peynir 60 günlük (8 hafta) bir olgunlaştırmadan sonra tüketime sunulabilmektedir. *L. monocytogenes*'in bu süre sonunda 10^4 adet/g seviyesinde bulunmasından dolayı 20. haftaya kadar incelenmiştir. Bütün beyaz peynir örneklerinde 20. haftanın sonunda >10 adet ile >100 adet/g *L. monocytogenes* tespit edilmiştir. Şekil 3 ve 4'te peynir örneklerinin depolanmaları esnasında *L. monocytogenes*'in durumu ve ortalama pH değerleri görülmektedir.



Şekil 3. İnek sütünden beyaz peynirde depolama süresince *L. monocytogenes*'in durumu ve pH'daki değişimler. ◆1. Deneme ■2. Deneme ▲pH



Şekil 4. Koyun sütünden beyaz peynirde depolama süresince *L. monocytogenes*'in durumu ve pH'daki değişimler. ◆1. Deneme ■2. Deneme ▲pH

Daha önce bu konuda yapılan araştırmalarda beyaz salamura peynirde *L. monocytogenes*'in 60 günlük olgunlaşma periyodu sonunda canlı kaldığı (20) salamurada peynir kırıntıları bulunması durumunda ve %6'lık salamura ile dolmuş peynir ambalajlarında bu sürenin 90 günü geçtiği bulunmuştur (12).

Bu araştırmanın sonuçlarına göre; *L. monocytogenes* sütte bulunması ve peynire de geçmesi durumunda imalat ve olgunlaşma safhalarında gelişebilmektedir. Bakteri sayısı olgunlaşma sırasında 10^6 adet/g'a kadar ulaşabilmekte, 18. hafta sonunda 4°C'de hala insan sağlığı açısından tehlike oluşturabilecek seviyede bulunabilmekte ve 20 haftadan fazla canlı kalabilmektedir.

Çeşitli peynirlerde yapılan araştırmalarda peynirin yapım tekniği ve olgunlaştırma şartlarına bağlı olarak değişik sonuçlar ortaya çıkmıştır. Cemembert peynirinde

3 ay sonra 10^7 /g (8), Cheddar peynirinde bir yıl sonra, Blue peynirinde 4 ay sonra ve Colby peynirinde 5 ay sonra 10^2 /g (7,13,10), Brick peynirinde (21) 24 hafta sonra 10^5 /g *Listeria monocytogenes* tesbit edilmiştir. Bu araştırmalarda peynire işlenecek süte inoküle edilen *Listeria monocytogenes* 10^2 - 10^3 /ml düzeyindedir. Süte 10^4 - 10^5 /ml düzeyinde *Listeria monocytogenes* ilavesiyle yapılan Cottage peynirinde 28 gün olgunlaştırılmadan sonra *Listeria monocytogenes* tesbit edilmiş, ancak 70

gün sonra bulunamamıştır. Pastörizasyon bazen *Listeria monocytogenes* bertaraf etmek için kafi gelmemektedir. Bundan dolayı peynir yapımı esnasında hijyene azami dikkat etmeli, özellikle mikrobiyolojik olarak kaliteli su kullanılmalıdır. Her ne kadar bu araştırmada starter olarak yoğurt kültürü kullanılmışsa da *Listeria monocytogenes* 'i inhibe kabiliyeti olan nisin üreten *Lactococcus lactis* suşları (22, 23, 24) kültür olarak kullanılmalıdır.

Kaynaklar

- Fleming, D.W., Cochi, S.L., Macdonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 312, 404-407, 1985.
- Linnan, M., Mascola, L., Low, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D., Yonukera, L., Hayes, P., Weaver, R., Andurier, A., Plakaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A., Broome, C.V. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. N. Engl. J. Med. 319, 823-828, 1988.
- Ryser, E.T., Marth, E.H., Doyle, M.P. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Cottage cheese. J. Food Protec. 48, 746-750, 753, 1985
- FDA. Finds Listeria in Brie from French-certified plant. Food Chem. News Februar 17, 1986.
- Farber, J.M., Johnston, M.A., Purvis, U., Loit, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. Inter. J. Food Microbiol. 5, 157-163, 1987.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Malcolm, S.A. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. Can. J. Microbiol. 34, 95-100, 1988.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. J. Food Protec. 50, 7-13, 1987a.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. Fate of Listeria during the manufacture and ripening of Camembert cheese. J. Food Protec. 50, 372-378, 1987b.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Brick cheese. J. Dairy Sci. 72, 838-853, 1988.
- Yousef, A.E., Marth, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Colby cheese. J. Food Protec. 51, 12-15, 1988.
- Tümbay, E., Seeliger, H.P.R., İnci, R., Coşar, G., Langer, B. Isolation of Listeria from cheese in Turkey. Turkish J. Infec. 2, 593-598, 1988.
- Papageogiou, D., Marth, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. J. Food Protec. 52, 82-87, 1989a.
- Papageogiou, D., Marth, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Blue cheese. J. Food Protec. 52, 459-465, 1989b.
- Yousef, A.E., Marth, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Parmesan cheese. J. Dairy Sci. 73, 3351-3356, 1990.
- Çiftçioğlu, G., Uğur, M. An investigation upon *Listeria* spp. contamination of Turkish white cheese. II. International Food Symposium. 1-3 October, Bursa, 1991.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: The genera of lactic acid bacteria. Vol.: 2. (Eds.: Wood, B.J.B., Holzappel, W.H.), Blackie Academic Professional, pp. 19-55, 1995.
- Lovett, J., Hitchins, A.D. Listeria isolation. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Federal Register. Vol.: 43, No: 211, 44148-44153, 1988.
- Marth, E.H. (Ed.) Standart Methods for the Examination of Dairy Products. 14th Ed. APHA, Washington, 1978.
- Marcos, A., Esteban, M.A. Monograph for predicting water activity of soft cheeses. J. Dairy Sci. 65, 1795-1797, 1982.
- Ikonomou, L., Todorov, D. Studies on the viability of *Listeria monocytogenes* in ewe's milk and dairy products. Vet. Med. Nauki. Sofia 1, 23-29, 1964 (Dairy Sci. Abst. 27, 2, 1965).
- Ryser, E.T., Marth, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Brick cheese. J. Dairy Sci. 72, 838-853, 1989.
- Benkerroum, N., Sandine, W.E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. J. Dairy Sci. 71, 3237, 1988.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Protec. 52, 3784-3787, 1989.
- Ray, B. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives. An overview. In: Food Biopreservatives of Microbial Origin. Eds.: Ray, B., Daeschel, M.A. CRC Press, pp. 177-206.