

## Beyaz Peynir Üretiminde Nisin Kullanımı ile *Listeria monocytogenes*'in İnhibisyonu\*

Ela AKTÜRKOĞLU, İrfan EROL

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.06.1998

**Özet :** Bu çalışmada, pastörize sütlerden üretilen beyaz peynirlerde, nisin *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi 60 günlük olgunlaşma ve muhafaza periyodunca araştırılmıştır. Bu amaçla dört grup peynir üretilmiş ve tüm gruplara  $10^4$ - $10^5$  kob/ml (koloni oluşturan birim/ml) düzeylerinde *L. monocytogenes* 1/2a test suşu inokule edilmiştir. I. grup kontrol grubu olarak (starter kültür ve nisin içermeyen) bırakılmış, II. gruba *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus cremoris* karışımından oluşan ticari starter kültürden % 2 oranında katılmış, III. gruba aynı starter kültür ile 30 µg/ml nisin birlikte, IV. gruba ise yalnızca 30 µg/ml dozunda nisin ilave edilmiştir. Bu şekilde peynir üretimi 3 kez tekrar edilmiştir. Bu süreç içerisinde *L. monocytogenes*'in izolasyonu FDA tarafından önerilen yöntemle, sayısal gelişimi ise MPN tekniği ile belirlenmiştir.

I. grup peynirlerde ilk 24 saat sonunda *L. monocytogenes* sayısı 3-4 log.lık, II. grup peynirlerde yaklaşık 1 log.'lık artışla, sırasıyla  $10^7$ - $10^8$  MPN/g ve  $10^5$  MPN/g'a ulaşmış ve 60. günün sonuna kadar önemli bir değişiklik göstermeden bu düzeylerde kalmıştır. III. ve IV. grup peynirlerde *L. monocytogenes* sayısında 24 saat sonra, sırasıyla 2 ve 3 log.'dan fazla azalma olmuş ve III. gruplarda *L. monocytogenes* sayısı gittikçe azalarak 60. günde ya tamamen elimine olmuş, ya da 0.23 MPN/g düzeyine kadar gerilemiştir. IV. gruplarda ise etken gittikçe azalarak 60. günün sonunda tamamen elimine olmuştur.

Sonuç olarak, beyaz peynirlerde nisin kullanımının (30 g/ml) *L. monocytogenes* üzerine oluşturduğu kuvvetli bakterisit etki ile bu patojen bakterinin, olgunlaşma ve muhafaza periyodunun 60. gününde peynirlerden tamamen elimine olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler :** Beyaz peynir, *L. monocytogenes*, nisin, starter kültür, inhibisyon, MPN

### Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin During Manufacture of White Pickled Cheese

**Abstract :** This study based on the effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in white pickled cheese made from pasteurized milk during the ripening and storage period for 60 days. For this purpose, four groups of cheese were produced. All groups were inoculated with the *L. monocytogenes* 1/2a test strain at the levels of  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml. Group I was remained as a control group (contained no starter culture and nisin). Group II was added a mixture culture of the commercial starter culture *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* in a proportion of 2 % , while in group III was added the same starter culture with 30 µg/ml nisin, and group IV contained only 30 µg/ml of nisin. In this way, 3 productions were realized. FDA suggested method was used for the isolation of *L. monocytogenes* and the development of *L. monocytogenes* during this period was determined using Most Probable Number (MPN) technic.

Regarding the group I cheeses, at the end of the first 24 hours, the number of *L. monocytogenes* increased 3-4 log; in the group II cheeses, with an increase of approx. 1 log, in turns it reached the level of  $10^7$ - $10^8$  MPN/g and  $10^5$  MPN/g without any important change during the ripening and storage period and it remained at this level until the end of 60th day. In the groups III and IV cheeses, after the first 24 hours there was a decrease of more than 2 and 3 log in the number of *L. monocytogenes* and in the group III cheeses, the number of *L. monocytogenes* gradually decreased and it was either totally eliminated or it remained at a level of 0.23 MPN/g, while in the group IV cheeses, the agent gradually decreased and it was totally eliminated at the end of the 60th day.

As a result, it has been ascertained that nisin has a strong bactericid effect on the *L. monocytogenes*. So this important foodborne pathogens was eliminated from white pickled cheese during the ripening and storage period for 60 days with adding of 30g/ml nisin.

**Key Words :** White pickled cheese, *L. monocytogenes*, nisin, starter culture, inhibition, MPN

\* Bu çalışma aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

## Giriş

Doğada yaygın olarak bulunan *Listeria* cinsi içerisinde yer alan *Listeria monocytogenes* insan ve hayvanlar için patojen bir türdür (1). Değişik ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar hayvansal gıdaların insanlardaki listeriosis olgularının ortaya çıkışında önemli rol oynadığını ve ölüm oranının % 30 gibi oldukça yüksek oranlara ulaşabildiğini göstermektedir (1, 2, 3, 4).

Listeriosis olgularının hayvansal gıdalar arasında özellikle *L. monocytogenes* ile kontamine değişik tip peynir tüketiminden kaynaklandığı ve peynirlerin yapımı, olgunlaştırılması, depolanması ve nakledilmesi aşamalarında başta sıcaklık ve pH olmak üzere, değişik koşullara bağlı olarak *Listeria*'ların değişen düzeylerde canlı kalabildiği ve bu ürünlerin listeriosis yönünden potansiyel sağlık riski oluşturduğu bildirilmektedir (5, 6, 7, 8).

Biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak son yıllarda faydalı mikroorganizmalardan yararlanma olanaklarının artırılması çalışmaları ve gıdalarda kimyasal maddeler ile irradiasyonla yapılan muhafaza yöntemlerine alternatif arayışlar sonucu kullanılmaya başlanan biyoprezervatifler içerisinde nisin önemli bir yer tutmaktadır. Nisin; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in bazı suşları tarafından üretilen protein yapısında, antibakteriyel etkiye sahip bir maddedir (9). Nisinin; laktokoklar, basiller, mikrokoklar, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *C. botulinum*'un da dahil olduğu pek çok Gram (+) bakteriyeye karşı etkili olduğu bildirilmektedir (9, 10, 11). Nisin, 1989'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; Food and Drug Administration) tarafından ABD'de Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen [Generally Recognized As Safe (GRAS)] tek bakteriosin olup, günümüzde en az 46 ülkede sütlerde, peynirlerde, konserve sebzelerde, bebek mamalarında, diyet ürünlerde, mayonezde, salça ve kremada kullanıldığı rapor edilmiştir (9, 11, 12, 13).

Türkiye'de, çiğ sütün mikroflorası ile beyaz peynir üretimindeki hijyenik koşulların arzu edilen seviyede olmaması, yüksek düzeyde kontamine sütlere düşük dereceli pastörizasyon uygulanması halinde *Listeria* türlerinin canlı kalabilmesi ve/veya pastörizasyon işlemi sonrasındaki kontaminasyonlar sonucu; *Listeria*'ların yapım, olgunlaşma ve muhafaza aşamalarında canlılığını koruması ve çoğalabilmesi nedenleri ile peynir üretiminde bu mikroorganizmanın eliminasyonu için inhibitör maddelerin kullanılma olanaklarının araştırılması, gıda

güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması yönünden önem kazanmaktadır.

Çeşitli ülkelerde farklı tip peynirler üzerine yapılan çalışmalar, peynir yapımında nisin kullanımının *L. monocytogenes*'in inhibisyonunda etkili olabildiğini göstermesine karşın, yapılan literatür taramalarında, farklı bir yapım teknolojisi ile büyük üretim potansiyeline sahip beyaz peynirlerde nisin kullanımı hakkında Türkiye'de yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Belirtilen nedenlerle bu çalışma, nisinin beyaz peynirde *Listeria monocytogenes* üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

## Materyal ve Metot

**Peynir yapımı:** Geleneksel yöntemin (14) uygulandığı beyaz peynir yapımında, her deneysel üretim için Atatürk Orman Çiftliği Süt Fabrikasından sağlanan ve içerisinde *L. monocytogenes* olmadığı saptanan 80'er kg çiğ inek sütü kullanıldı.

Tüm gruptaki sütler önce 72°C'de 2 dakika pastörize edildi. Pastörizasyondan hemen sonra 32°C'ye soğutulan tüm gruptaki süte ml'sinde  $10^4$ - $10^5$  düzeylerinde, daha önceden Tryptic Soy Broth'da (TSB; Difco, Kat. No 0370-17-3) üretilen *L. monocytogenes* 1/2a test suşu (Dr. Weise, Bundesgesundheitsamt, Berlin) inokule edildi. Bu aşamadan sonra sütler aşağıda belirtilen ve herbiri 20 kg olan 4 gruba ayrıldı. Yalnızca *L. monocytogenes* 1/2a test suşu içeren I. grup kontrol grubu olarak ayrıldı. II. ve III. gruba, tindelizasyonla sterilize edilen edilmiş sütte 20-23°C'de 14-18 saat rejenere edilen ve % 95-98 oranında *Lactococcus cremoris* ile % 2-5 oranında *Lactococcus lactis* suşlarının karışımından oluşan ticari liyofilize starter kültürden (Chr. Hansen'in 54 No'lu mesofilik kültür) % 2 oranında ilave edildi. III. gruba aynı starter kültür aynı oranla ve 30 µg/ml nisin (Nisaplin, Aplin & Barrett, England) preparatı birlikte katılırken; IV. gruba yalnızca 30 µg/ml nisin katıldı.

I. grup : Kontrol grubu, starter kültür ve nisin içermeyen grup.

II. grup : Starter kültür içeren grup.

III. grup : Starter kültür + nisin içeren grup.

IV. grup : Nisin içeren grup.

Daha sonra süte CaCl<sub>2</sub> (10g/100kg) ve maya ilave edilerek mayalama işlemi gerçekleştirildi. Peynir mayası

olarak 1/10000 kuvvetinde hayvansal kökenli kimozin (2:20 v/w) kullanıldı. Gruplar pıhtılaşmaya bırakıldı. Yeterli sertlik kazandıktan sonra 2x2x2 cm boyutunda kesilen pıhtı, kalıpların içine yerleştirilen cendere bezlerine dökülerek süzölmeye bırakıldı ve baskıya alındı. Baskı sonunda teleme 8x8x8 cm ebadında kesildi ve kalıplar % 13 tuz içeren salamura solüsyonunda 14 saat ön salamuraya alındı. Bu sürenin sonunda kalıplar % 6 tuz içeren salamura solüsyonu ile teneke kutulara konuldu ve 4°C'de olgunlaşmaya bırakıldı. Yukarıda belirtilen şekilde deneysel peynir yapımı üç kez tekrar edildi.

**Örneklerin alınması:** Mikrobiyolojik yönden çiğ sütün başlangıçta *L. monocytogenes* ile kontamine olup olmadığının saptanması ve kimyasal analizler (asitlik, yağ ve kuru madde tayinleri) için, her üretim öncesi süt örnekleri alındı. *L. monocytogenes*'in seyri ile aerob mezofil genel canlı, laktik asit bakterileri ve koliform bakteri düzeylerini saptamak ve pH değerlerini ölçmek amacıyla her bir gruptaki inokule süt ve peynirlerden 0., 1., 3., 7., 15., 30. ve 60. günlerde örnekler alındı.

**Peynir yapımında kullanılan çiğ sütlerde yapılan kimyasal testler:** Peynir yapımında kullanılan sütlerde asitlik, kuru madde ve yağ tayini TS 1018'de bildirilen yöntemlere göre yapıldı (15).

**Örneklerin pH değerlerinin ölçülmesi:** Mikrobiyolojik muayenelere paralel olarak süt ve peynir örneklerinin pH değerleri, elektronik pH metre (pH 900, Nel Elektronik, Ingold Lot 406-mg-dxk-57/25) ile ölçüldü.

***L. monocytogenes* izolasyonu ile yapım, olgunlaştırma ve muhafaza periyodunca seyri:** Süt ve peynir örneklerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için Hitchins (16) tarafından bildirilen FDA metodu kullanılırken, *L. monocytogenes*'in 60 günlük periyot içerisindeki seyri Most Probable Number (MPN) sayım tekniği (17) ile belirlendi.

Zenginleştirme amacıyla modifiye Listeria Enrichment Broth (MLEB; Difco Kat. No. 0205) ile 3'lü tüplerde örneklerin gerekli olan basamaklara kadar dilusyonları hazırlanarak, tüpler 30°C'de 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda LEB kültürlerinden bir öze dolusu alınarak Oxford agara (OXA;Difco Kat. No 0225; Oxford Antimicrobial Supplement, Difco Kat. No. 0214) çizme yöntemi ile ekim yapıldı. Plaklar 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda siyahlaşma ile karakterize kolonilerden tipik olan 5'i seçilerek Tryptic

Soy Yeast Extract Agara (TSYEA; Difco, Kat. No. 0370-01) geçildi ve plaklar 30°C'de 24-48 saat inkübe edildi. TSYEA'da üreyen kolonilerden sırasıyla, Gram boyama, % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile katalaz, SIM besiyerinde (Sulphate Indol Motility Medium, Difco, Kat. No. 0271-01) hareket ve kanlı agarda (Blood Agar; Difco, Kat. No. 0792-01) hemoliz testleri yapıldı. Gram pozitif, katalaz pozitif, SIM besiyerinde (25°C'de 7 gün) şemsiye tarzında üreme gösteren ve kanlı agarda (37°C'de 24 saat) β-hemoliz veren koloniler *L. monocytogenes* olarak değerlendirildi. Bu özelliklere sahip plaklarda *L. monocytogenes* sayısı MPN tablosuna göre belirlendi.

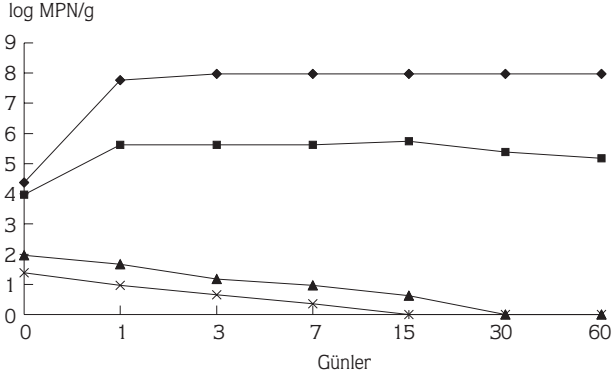
**Diğer mikrobiyolojik muayeneler:** Her bir gruptan aseptik koşullarda steril naylon torbalara alınan 10'ar ml süt veya 10'ar g peynir örneği 90'ar ml peptonlu su ile karıştırılıp stomacher'da homojenize edildi. Bundan içerisinde 9'ar ml steril peptonlu su bulunan tüplerle 10<sup>-8</sup>e kadar desimal dilüsyonlar hazırlanarak, aerob mezofil genel canlı mikroorganizmaların sayımı için Tryptic Soy Agara (TSA; Difco Kat. No. 0369-01-4), laktik asit bakterileri sayımı için Laktobazillen Agara (LS) (18) ve koliform bakterilerinin sayımı için Violet Red Bile Agara (VRBA; Merck Kat. No. 1406) damla plak yöntemi ile ekimler yapıldıktan sonra, TSA plakları 30°C'de 48-72 saat aerob, LS plakları 30°C'de 2-3 gün anaerob ve VRBA plakları 37°C'de 24-48 saat anaerob koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen tipik koloniler sayıldı. 1., 2. ve 3. üretimlerden elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları alınarak ortalama değerler belirlendi (19).

## Bulgular

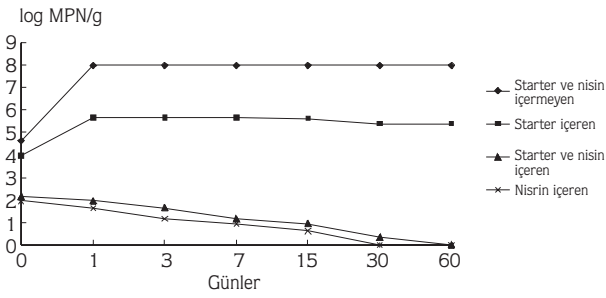
**Çiğ sütün kimyasal analiz bulguları:** 1., 2. ve 3. peynir üretimlerinde kullanılan çiğ sütlerin asitlik oranları sırasıyla; % 0.15, % 0.19 ve % 0.19 L.A., yağ oranları sırasıyla; % 3.1, % 3.4 ve % 3.3 ve kuru madde oranları da % 11, % 12 ve % 11 olarak bulunmuştur.

***L. monocytogenes*'in yapım olgunlaştırma ve muhafaza periyodunca seyri:** Her üç üretime ait çiğ süt örneklerinde Listeria'ların varlığı yönünden yapılan analizlerde, örneklerin başlangıçta Listeria ile kontamine olmadığı saptanmıştır.

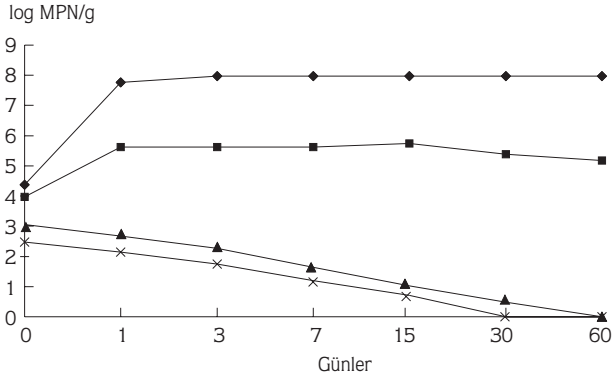
Her üç üretimdeki örneklerde *L. monocytogenes*'in seyri Şekil 1, 2 ve 3 'te verilmiştir. Bu çerçevede, peynir yapımında 1., 2. ve 3. üretimlerde yer alan tüm gruplara sırasıyla 4.7x10<sup>4</sup>kob/ml, 8.5x10<sup>4</sup> kob/ml ve 2.2x10<sup>5</sup> kob/ml oranlarında *L. monocytogenes* 1/2a test suşu inokule edilmiştir.



Şekil 1. Birinci peynir üretiminde gruplarda *L. monocytogenes*'in seyri.



Şekil 2. İkinci peynir üretiminde gruplarda *L. monocytogenes*'in seyri.



Şekil 3. Üçüncü peynir üretiminde gruplarda *L. monocytogenes*'in seyri.

Tüm peynir üretimlerinin kontrol gruplarında (I. grup) 1. günde 3-4 log.'lık artışlar olmuş ve *L. monocytogenes* sayısı 60. günün sonuna kadar aynı düzeyde kalarak 1., 2. ve 3. üretimlerde sırasıyla  $9.3 \times 10^7$  MPN/g,  $9.3 \times 10^7$  MPN/g ve  $2.4 \times 10^8$  MPN/g olarak bulunmuştur. Her üç

peynir üretiminin II. gruplarında 0. günde inokulasyon dozuna göre yaklaşık 1 log.'lık düşüşler olmuş, 1. günde ise 0. güne oranla 2 log.'a yaklaşan artışlar saptanmış ve 60. günün sonuna kadar hafif azalmalar ile 1., 2. ve 3. üretimlerde *L. monocytogenes* sayısı sırasıyla,  $1.5 \times 10^5$  MPN/g,  $2.4 \times 10^5$  MPN/g ve  $4.6 \times 10^5$  MPN/g düzeylerinde bulunmuştur. Peynir üretimlerinin III. gruplarında 0. günde inokulasyon dozuna göre 2 log.'dan fazla düzeyde azalmalar oluşmuştur. Birinci günden itibaren *L. monocytogenes* sayısı belirgin bir şekilde azalarak, 60. günün sonunda, 1. üretimde  $3 \times 10$  gramlık dilüsyonda üreme saptanmamış, 2. ve 3. üretimlerde ise *L. monocytogenes* sayısı 0.23 MPN/g olarak saptanmıştır. Tüm üretimlerin IV. gruplarında 0. günde *L. monocytogenes* sayısında inokulasyon dozuna göre yaklaşık 3 log.'dan fazla azalmalar meydana gelmiştir. Birinci günden itibaren azalma devam ederek 60. günde tamamen elimine olmuştur.

**Diğer mikroorganizmaların seyri:** Aerob mezofil genel canlı sayısı, I. ve IV. grup peynirlerde 0. günde ortalama  $10^5$  kob/ml, starter kültür içeren II. ve III. gruplarda ort.  $10^7$ - $10^8$  kob/g düzeyinden bulunmuş ve tüm gruplarda 60 günlük periyot boyunca ort.  $10^6$  kob/g düzeyinde kalmıştır. Laktik asit bakterileri 0. günde I. ve IV gruplarda  $<2.0 \times 10^2$  kob/ml olarak bulunurken, starter kültür ilave edilen II. ve III. gruplarda ort.  $10^7$  kob/ml düzeyinde saptanmış ve 60 günlük periyot sonunda II. grupta ort.  $10^5$  kob/g, III. grupta ise ort.  $10^2$  kob/g seviyesine kadar gerilemiştir. Tüm gruplarda koliform grubu bakterilerin sayısı 0. günde saptama sınırı altında kalırken, 1. günden itibaren 60. güne kadar ort.  $10^3$ - $10^4$  kob/g düzeyinde seyretmiştir.

**pH değerleri seyri:** Peynir yapımında kullanılan sütlerin pH değerleri 6.4-6.7 olarak bulunmuştur. Starter kültür katılmayan I. ve IV. grup ile starter kültür ve nisin kombinasyonu içeren III. grup peynirlerin pH değerleri olgunlaşma periyodu boyunca 5.9-6.5 arasında seyretmiş, yalnızca starter kültür içeren II. grup peynirlerde 4.8-5.1 arasında olmuştur.

## Tartışma ve Sonuç

Süt ve peynirlerin *L. monocytogenes* ile kontaminasyonu her zaman söz konusu olabilmekte ve *L. monocytogenes* beyaz peynirde varlığını tüketim aşamasına kadar sürdürebilmektedir (3, 6, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

Bazı araştırmacılar (5, 28, 29) yaptıkları deneysel çalışmalarda, farklı tip peynirlerde üretim koşullarının farklı olmasına bağlı olarak *L. monocytogenes*'in bu çalışma bulgularında da olduğu üzere "peynirlerden tamamen eliminasyonundan, canlı kalmaya ve üremeye" kadar değişen sonuçlar gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada,  $4.7 \times 10^4$  kob/ml,  $8.5 \times 10^4$  kob/ml ve  $2.2 \times 10^5$  kob/ml düzeylerinde inokule edilen, peynir üretimlerinin kontrol gruplarında (I. gruplar) *L. monocytogenes* sayısında 1. günden itibaren 3-4 log arası artışlar olmuş ve *L. monocytogenes* sayısı 60. günün sonuna kadar aynı seviyelerde kalmıştır. Bu çalışmada kontrol gruplarından elde edilen sonuçlarla, Abdala ve ark. (30) tarafından yapılan çalışmaların kontrol grubuna ilişkin sonuçlar teyit edilmektedir. Abdala ve ark. (30) benzer bir çalışmada, pastörize edilmiş süte  $10^4$ - $10^5$  kob/ml *L. monocytogenes* Scott A suşu inokule edilerek yapılan salamura beyaz peynirlerde, *L. monocytogenes* sayısının birinci günde  $10^7$  kob/g'a yükseldiğini ve 60. güne kadar bu düzeyde seyrettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın I. gruplarında pastörize süte starter kültür katılmaksızın peynir yapıldığı için peynirin normal asitliği gelişememiş ve buna bağlı olarak da pH değerleri yüksek (6-6.5) bulunmuştur. Bu nedenle peynir örneklerinin oda sıcaklığında bekletildikleri 1. güne kadar *L. monocytogenes* süratle çoğalarak  $10^7$ - $10^8$  kob/g düzeyine ulaşmış ve 4°C'de depolamaya alındıkları 1. günden 60. güne kadar da sayıları büyük ölçüde değişmeden kalmıştır.

Bu çalışmada starter kültür (*L. lactis* ve *L. cremoris*) katılan II. grup örneklerde, inokulasyonun hemen sonrası yapılan ekimlerde *L. monocytogenes* sayısında 1 log.'lık düzeye yaklaşan düşüşler görülmüşse de, bir gün oda sıcaklığında bekleme sonucu 0. güne göre 2 log.'a yaklaşan düzeyde artışlar meydana gelmiş ve 4°C'de depolamada 60. güne kadar bu oran aynı seviyede kalmıştır. Birinci günde pH'nın 4.8'e düşmüş olması oda sıcaklığında tutulan örneklerde *L. monocytogenes*'in üremesini engelleyememiştir. Daha sonraki günlerde ise pH değerlerinde daha fazla düşüş görülmemiştir. Çeşitli literatür bildirimlerinde (31, 32, 33) laktik asit bakterilerinin *L. monocytogenes*'in üremesini tam olarak önleyemediği belirtilmiştir. *L. monocytogenes* ile kontamine edilen süte *L. lactis*-*L. cremoris* karışık kültürü katılarak peynir yapılan bir çalışmada (29), ilk 24 saatte üreme olduğu ve Colby peyniri üzerine yapılan başka bir deneysel çalışmada da (8), yeni yapılan peynirde süte göre

daha fazla sayıda *L. monocytogenes* bulunduğu saptanmıştır.

*L. lactis*'in inhibitör madde üreten farklı suşlarının *L. monocytogenes*'e karşı bakterisit etki yaptığı (1, 34, 35, 36, 37), *L. cremoris* ile yapılan bir çalışmada (38) ilave edilen *L. cremoris* dozunun artmasına paralel olarak artan bir inhibisyonun meydana geldiği, ancak tam bir inhibisyonun sağlanmadığı bildirilmiştir. Schaack ve Marth (39), yağsız süte *L. monocytogenes* V7 ve Ohio suşlarının inokulasyonunu takiben, *L. cremoris* ve *L. lactis* kültürleri katarak sütleri 21°C'de veya 30°C'de 15 saat fermente ettikten sonra 4°C'de tutmuşlar ve tüm fermentasyonlarda *L. monocytogenes*'lerin canlı kaldığını ve bir dereceye kadar da ürediğini, ancak *L. lactis* katılarak 30°C'de inkubasyona bırakılan örneklerde *L. monocytogenes* V7 suşunun % 100 inhibe olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmadan elde ettikleri bilgiler ışığında, genel olarak *L. lactis*'in *L. cremoris*'e göre fermentasyon sırasında sütlerin pH'sını daha fazla düşürdüğünü ve pH 4.75'in altına düştüğünde *L. monocytogenes*'in üremesinin tamamen durduğu sonucuna varmışlardır.

Camembert peynirinde yapılan bir çalışmada (37) nisin üreten bir *L. lactis* suşunun, nisin üretmeyen *L. lactis*-*L. cremoris* starter kültür kombinasyonu ile birlikte kullanıldığında *L. monocytogenes* üzerine etkili olmadığı, ancak nisin üreten *L. lactis*'in tek başına starter kültür olarak kullanılması halinde, kontaminasyonun erken dönemlerde şekillenmesi ve kontaminasyon düzeyinin çok düşük olması durumunda *L. monocytogenes*'i tamamen baskıladığı bildirilmiştir.

*L. lactis* starter kültürünün tek başına ve daha yüksek oranlarda katılmasının etkenin inhibisyonunda daha etkili olduğu belirtilmekle birlikte, *L. lactis*'in nisin üreten suşlarının tek başına kullanılmasının *L. monocytogenes* üzerine çok daha etkili olduğu bildirilmiştir (37, 40).

Bu çalışmada da görüldüğü ve diğer literatür bilgilerinden de anlaşılacağı üzere normal koşullarda peynir yapımında klasik olarak kullanılan *L. lactis*-*L. cremoris* starter kültür karışımlarının % 2 oranında katılmalarının *L. monocytogenes*'i inhibe etmediği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmanın III. gruplarında pastörize süte starter kültür (*L. lactis* ve *L. cremoris*) ve nisin katılarak yapılan peynirlerde *L. monocytogenes* sayısında, 1. günün sonunda 2 log.dan fazla bir azalma olmuş ve olgunlaşma

periyodunun ilerleyen günlerinde *L. monocytogenes* sayısı giderek azalarak, 60. günde ya tamamen yok olmuş veya 0.23 MPN/g seviyesine kadar düşmüştür. Bu grup peynirlerde 1. günde normal peynir asitliği gelişmemiş ve buna bağlı olarak da pH değerleri (pH 6.1-6.5) düşmemiştir. Bu grupta laktik asit bakterileri sayısı 60 günde  $10^7$  kob/g'dan  $10^2$  kob/g'a düşmüştür. Nisin katılmayan starter kültürü gruplarında (II. gruplar) 0. günde  $10^7$  kob/g olan laktik asit bakterileri sayısı 60. günde  $10^5$  kob/g olarak tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar, III. gruplarda nisin starter kültürü baskıladığını ve bunun sonucu olarak da normal asitliğin şekillenmediğini göstermektedir. Buna rağmen 30 µg/ml oranında katılan nisin *L. monocytogenes* üzerine çok yüksek bakterisit etkili olduğu ortaya çıkmaktadır.

Çeşitli streptokok suşlarının Grana peynirinde nisine karşı duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada (41), 1-100 IU/ml nisin ile *Str. bovis* ve *Str. faecalis* var. *liquefaciens* dışındaki streptokokların inhibe olduğu bildirilmiştir.

Yumuşak peynirlerde nisin üreten starter kültürlerin *L. monocytogenes* üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada (40), starter kültür olarak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 1040 ile *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JS 102 (NCDO1404/JS102) ve *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 suşlarının *L. monocytogenes* üzerine inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, kontrol grubu olarak nisin üretmeyen, asit üreten kültürler kullanılmış ve sonuçta nisin üreten kültürlerin *L. monocytogenes* üzerine daha fazla inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır.

Camembert peynirleri ile yapılan diğer bir çalışmada (5), başlangıçta  $10^1$ ,  $10^3$  veya  $10^5$  kob/ml *L. monocytogenes* içeren süt ile üç farklı zamanda yapılan peynirlerde bu bakteriyi inhibe etmek üzere *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in proteaz pozitif ve proteaz negatif suşları kullanılmış ve nisin konsantrasyonunun laktokok üremesine paralel olarak arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada 700 IU/g olan maksimum nisin konsantrasyonuna 9. saatte erişilmiştir. Nisin konsantrasyonu 9.-24. saatler arasında oldukça yavaş, peynirin daha sonraki olgunlaşma periyodunda ise hızla düşmüştür. Nisin varlığında *L. monocytogenes* sayısı 6.-24. saatler arasında hızla azalmış ve bu azalma, olgunlaşma periyodunun 2. haftasının sonuna kadar devam ederek mikroorganizma sayısında toplam 3.3 log düzeyinde bir azalma meydana gelmiştir. Ancak daha sonra *L. monocytogenes* tekrar üremeye başlamıştır. Süt,

$10^1$  veya  $10^3$  kob/ml düzeyinde *L. monocytogenes* içerdiğinde nisin daha etkili bulunmuştur.

Bu çalışmada nisin ilave edilerek yapılan IV. grup peynirlerde starter kültür yokluğuna bağlı olarak pH yüksek değerlerde (6.1-6.5) kalmış, ancak nisin etkisi ile *L. monocytogenes* sayısında starter kültür katılan III. gruplardan yaklaşık 1 log daha fazla azalma meydana gelmiş ve bu azalma eğilimi devam ederek *L. monocytogenes* 60. günde IV. grup peynirlerden tamamen elimine edilmiştir. Starter kültür ve nisin içeren gruba (III. grup) göre sadece nisin katılan grupta (IV grup) meydana gelen inhibisyon oranındaki 1 log<sub>10</sub>'lık fark, nisin üreten starter kültürlerin tek başına kullanılmasının daha etkili olduğu (37) görüşünü destekler niteliktedir.

Değişik pH düzeylerinde Tryptic Soy Broth (TSB) ile steril ve steril olmayan Cottage peynirlerine  $3.7 \times 10^2$  IU/ml ve  $2.5 \times 10^3$  IU/g nisin katılarak, *L. monocytogenes* ATCC 7644'ün inhibisyonu araştırılmış ve TSB'da bu patojenin pH 5-7 arasında 24 saat sonra, pH 4.5, 4.0 ve 3.5'de 24 saat içerisinde tam olarak elimine olduğu, peynir sterilize edilmeden veya sterilize edildikten sonra  $3.5 \times 10^5$  kob/g *L. monocytogenes* ilave edilerek 37°C ve 4°C'de tutulduğunda canlı mikroorganizma saptanmadığı bildirilmiştir (34). Aynı çalışmada, içerisinde  $10^5$  kob/ml *L. monocytogenes* içeren, pH değeri 6.48 olan ve nisin içermeyen grupta *L. monocytogenes* sayısı 24 gün sonra  $10^7$  kob/g'a yükselirken, aynı koşullardaki nisin içeren grupta *L. monocytogenes* 2. günde tamamen elimine edilmiştir.

Nisin düşük pH değerlerinde daha aktif olduğu (34, 42), düşük protein ve yağ oranlarına sahip gıdalarda ve pH < 6.0'da en etkili olduğu bildirilmiştir (43). Nisin aktivitesi yüksek yağ oranlarında büyük ölçüde azalmaktadır (44). Buna rağmen yağ oranının ve pH'nın nisin üzerine, dolayısıyla da *L. monocytogenes*'in inhibisyonu üzerine etkisi, özellikle kullanılan nisin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (35, 44). Bruno ve ark. (45), pH 6.5'de 2.5 µg/ml nisin *L. monocytogenes* suşlarının membran potansiyelini bozarak 5 log.'lık bir azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada kullanılan sütlerin yağ oranlarının % 3.1-3.4 arasında olduğu ve nisinli grupların 1. günlerindeki pH değerlerinin 6.1-6.4 arasında değiştiği saptanmıştır. Peynirlerde yapılan çalışmalarda (5, 34, 44), nisin sütteki ve peynirdeki konsantrasyonunun giderek azalmasından dolayı etkisinin büyük kısmının ilk 24 saat içerisinde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen

sonuçlar, benzer çalışmalardan sağlanan bulgularla uyum göstermektedir. Çünkü bu çalışmada da nisin içeren gruplarda nisinin etkisinin en fazla ilk 24 saat içerisinde olduğu belirlenmiştir.

Abdala ve ark. (30) beyaz peynirde yaptıkları çalışmada, pastörize süte  $10^4$ - $10^5$  kob/ml düzeyinde *L. monocytogenes* Scott A ve 25 µg/ml nisin katarak ürettikleri peynirlerde, nisinin *L. monocytogenes* Scott A üzerine etkisini 60 günlük periyot boyunca izlemişlerdir. Araştırmacılar bu süre içerisinde *L. monocytogenes*'in inhibe olmadığını saptamışlar ve buna neden olarak da peynirlerin pH değerlerinin yüksek olmasından dolayı nisinin etkili olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarında başlangıçta 6.5 olan sütün pH'sı peynir yapımı sırasında 7.0'a yükselmiş ve 60 gün boyunca aynı düzeyde kalmıştır. Abdala ve ark. (30)'nın bulgularıyla bu çalışma sonuçları arasındaki önemli fark, başta peynirlerin pH değerleri ve kullanılan *L. monocytogenes* suşu ve salamuradaki tuz konsantrasyonu olmak üzere değişik faktörlere bağlanabilir. Bu çalışmada, yapılan peynirlerde nisin içeren grupların pH değerleri peynir yapımından sonra 1. günde 6.1-6.4 olarak tesbit edilmiştir. pH 7.0'da nisin aktivitesi bu çalışmadaki örneklerle ait pH değerlerine göre (6.0-6.5) daha düşüktür. Cheddar

peyniri üzerine yapılan deneysel bir çalışmada (6), farklı *L. monocytogenes* suşlarının peynirde farklı sürelerde canlı kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, *L. monocytogenes* Scott A suşunun nisine karşı dirençli bazı mutantlarının olduğu bildirilmiştir (46). *L. monocytogenes*'in nisine karşı duyarlılığının saptandığı bir çalışmada (10), 10 µg/ml düzeyindeki nisin *L. monocytogenes* ATCC 19115, Scott A ve UAL500'ün  $10^9$  kob/ml olan başlangıç popülasyonunda 6-7 log'.lık bir azalma meydana getirdiği ve ortama tuz ilavesinin nisinin bakterisit etkisini arttırdığı bildirilmiştir. Abdala ve ark. (30), peynirleri % 4 oranında tuz içeren salamurada muhafaza etmelerine karşın bu çalışmada % 6 tuz içeren salamura kullanılmıştır.

Sonuç olarak; bu çalışmada beyaz peynir yapımında nisin kullanımının gıda kaynaklı listeriozis olgularının % 90'ından fazlası için sorumlu tutulan üç serotipten birisi olan *L. monocytogenes* 1/2a'ya karşı kesin etkili olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, nisinin preparat olarak kullanımında peynirin normal asitliğinin gelişmemesi ve pahalı olması nedeniyle, peynir yapımında *L. monocytogenes*'in kontrolünde nisin üreten uygun starter kültürlerin kullanılmasına yönelik çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

## Kaynaklar

1. Bahk,J. and Marth,E.H.: Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Diseases. Ed. Cliver,D.O. Academic Press Inc., pp.248-256, 1991.
2. 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. and Reingold,A.L.: Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N England J Med, 14:404-407, 1985.
3. Johson,E.A., Nelson, J.H. and Johnson,M.: Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, Part II. Microbiology. J Food Prot, 53 (6):519-540, 1990.
4. Zottola,E.A. and Smith,L.B.: Pathogens in cheese. Food Microbiol, 8:171-182, 1991.
5. Maisnier-Patin,S., Deschamps,N., Tatini,S.R. and Richard,J.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. Lait, 72:249-263, 1992.
6. Ryser,E.T. and Marth,E.H.: Behaviour of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of cheddar cheese. J Food Prot, 50 (1):7-13,1987.
7. Ryser,E.T. and Marth,E.H.: Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. J Food Prot, 50:372-378, 1987.
8. Yousef,A.E. and Marth,E.H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese. J Food Prot, 51(1):12-15, 1988.
9. Delves-Broughton, J.: Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol, 44 (11):100-112, 1990.
10. Harris,L.J., Fleming,H.P. and Klaenhammer,T.R.: Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL500 to nisin. J Food Prot, 54 (11):836-840, 1991.
11. Nettles,C.G. and Barefoot,S.F.: Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. J Food Prot, 56(4):338-356, 1993.
12. Daeschel,M.A.: Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol, 1:164-167, 1989.
13. Harris,L.J., Fleming,H.P. and Klaenhammer,T.R.: Developments in nisin research. Food Res Int, 25:57-66, 1992.
14. Anon.: Beyaz Peynir. TS 591, UDK 637.353, Türk Standardları Enstitüsü, 1983.
15. Anon.: Çiğ Süt. TS 1018, UDC 673.141, Türk Standardları Enstitüsü, 1981.

16. Hitchins,A.D.: *Listeria monocytogenes*. In: FDA Bacteriological Analytical Manual, 7<sup>th</sup> ed. Assoc Off Anal Chem Int, Arlington,VA., 1992.
17. De Man, J.C.: MPN-tables, corrected. J Appl Microbiol Biotechnol, 17:301-305, 1983.
18. Reuter,G.: Erfahrungen mit Naehrboeden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg.19. 53-57; 84-89, 1968.
19. Baumgart, J. : Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag., 1989.
20. Back,J.P., Langford,S.A. and Kroll,R.G.: Growth of *Listeria monocytogenes* in Camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures. J Dairy Sci, 60:421-429, 1993.
21. Çiftçioğlu, G. ve Uğur,M. (1992): Ülkemizde tüketilen salamura beyaz peynirlerde Listeriaların varlığı üzerine bir araştırma. Bursa İl. Uluslararası Gıda Sempozyumu. 1-3 Ekim, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Gıda Teknolojisi Araştırma Enstitüsü,179-190,1992
22. Farber,J.M.: *Listeria monocytogenes*. Assoc Off Anal Chem, 74 (4):701-704, 1991.
23. Linnan,M.J., Mascola,L., Lou,X.D., Goulet,V., May,S., Salminen,C., Hird,D.W., Yonekura, M. L., Hayes,P., Weaver,R., Audurier,A., Plikaytis.B.D., Fannin,S.L., Kleks,A. and Broome,C.V.: Epidemic Listeriosis associated with Mexican-style cheese. N England J Med, 29:823-828, 1988.
24. Ryser,E.T. and Marth,E.H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Brick cheese. J Dairy Sci, 72 (4):838-853, 1989.
25. Ryser,E.T., Marth,E.H. and Doyle,M.P.: Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. J Food Prot, 48(9):746-750, 1985.
26. Sarımehtemoğlu,B.: Türk Salamura Beyaz Peynirinde Yapım ve Olgunlaşma Aşamalarının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1992.
27. Tümbay,E., Seeliger,H.P.R., İnci,R., Coşar,G. and Langer,B.: Isolation of *Listeria* from cheese in Turkey. Turkish J Infect, 2(4):593-598, 1988.
28. Kovincic,I., Vujicic,I.F., Svabic-Vlahovic,M., Vulic,M., Gagic,M. and Wesley,I.V.: Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Trappist cheese. J Food Prot, 54:418-420, 1991.
29. Papageorgiou,D.K. and Marth,E.H.: Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of blue cheese. J Food Prot, 52(7):459-465, 1989.
30. Abdala,O.M., Davidson,P.M. and Christen,G.L.: Survival of selected pathogenic bacteria in white pickled cheese made with lactic acid bacteria or antimicrobials. J Food Prot, 56(11):972-976, 1993.
31. Batish,V.K., Lal,R. and Grover,S.: Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus*. Res Food Microbiol, 7:199-206, 1990.
32. Eckner,K.F.: Bacteriocins and food applications. Dairy Food Environ Sanit, 12 (4):204-209,1992.
33. Toba,T., Yoshioka,E. and Itoh,T.: Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Lett Appl Microbiol, 12:106-108, 1991.
34. Benkerroum,N. and Sandine,W.E.:Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. J Dairy Sci, 71:3237-3245, 1988.
35. Carminati,D., Giraffa,G. and Bossi,M.G.: Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. J Food Prot, 52 (9):614-617, 1989.
36. Hanlin,M.B., Kalchayanand,N., Ray,P. and Ray,B.: Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. J Food Prot, 56 (3):252-25, 1993.
37. Sulzer,G. and Busse,M.: Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. Int J Food Microbiol, 14:287-296, 1991.
38. Wenzel,J.M. and Marth,E.H.: Changes in populations of *Listeria monocytogenes* in a medium with internal pH control containing *Streptococcus cremoris*. J Dairy Sci, 73:3357-3365, 1990.
39. Schaack,M.M. and Marth,E.H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. J Food Prot, 51 (8):600-606, 1988.
40. Williams,D.J. and Tatini,S.R.: Behavior of *Listeria monocytogenes* in associative growth with nisin producing starter cultures. J Dairy Sci, 73, Suppl. 1: 87, 1990.
41. Carini,S., Gregori,A. and Sozzi,T.: Nisin-producing streptococci. II. The microflora of Grana cheese and *Str. lactis* bacteriophages. Scienze e Tecnica Lattiero Casearia, 22(3):149-166, 1971. (Abstr. An: 72-03-PO299).
42. Broughton,J.D.: Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol, 44 (11):106-112, 1990.
43. Okereke,A. and Montville,T.J.: Bacteriocin mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. Environ Microbiol, 57(12):3423-3428, 1991.
44. Jung,D., Bodyfelt,F.W. and Daeschel,M.A.: Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J Dairy Sci, 75:387-393, 1992.
45. Bruno,M.E.C., Kaiser,A. and Montville,T.J.: Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. Appl Environ Microbiol, 58 (7):2255-2259, 1992.
46. Ming,X. and Daeschel,M.A.: Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. J Food Prot, 56 (11):944-948, 1993.