



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2019; 33 (2): 55 - 61
http://www.fusabil.org

Gökhan Kürşad İNCİLİ^{1, a}
Abdullah DİKİCİ^{2, b}
Ahmet KOLUMAN^{3, c}
Mehmet ÇALICIOĞLU^{1, d}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Uşak Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği,
Uşak, TÜRKİYE

³ Pamukkale Üniversitesi,
Teknoloji Fakültesi,
Biyomedikal Mühendisliği,
Denizli, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-1178-3365

^b ORCID: 0000-0001-7302-8766

^c ORCID: 0000-0001-5308-8884

^d ORCID: 0000-0002-6658-784X

Geliş Tarihi : 05.02.2019
Kabul Tarihi : 21.06.2019

Yazışma Adresi Correspondence

Gökhan Kürşad İNCİLİ
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Anabilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

gkincili@firat.edu.tr

Aside Adapte ve Adapte Edilmemiş *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'lerin Şavak Tulum Peynirinin Olgunlaşması Boyunca Yaşamları*

Bu çalışmanın amacı, kontaminasyon öncesi aside adaptasyon kazandırılmış veya kazandırılmamış olan *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'in Şavak tulum peynirinde olgunlaşma süresince boyunca yaşam kabiliyetlerini incelemektir. Olgunlaştırma aşamasına alınacak olan Şavak tulum peynirleri aside adapte edilmiş ve edilmemiş *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* ile kontamine edildi ve 120 günlük olgunlaştırma periyodu boyunca sayımları yapıldı. Her iki patojen bakteri sayısı için de tüm olgunlaştırma periyodu boyunca aside adapte edilmiş ve aside adapte edilmemiş gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ($P>0.05$). Olgunlaşmanın ilk günü kontamine edilen peynirlerde aside adapte ve adapte edilmemiş *E. coli* O157:H7 sayıları sırasıyla, 5.39 ve 5.70 \log_{10} kob/g olarak tespit edilmişken, olgunlaşmanın 120. günü sırasıyla 3.64 ve 4.17 \log_{10} kob/g olarak saptandı. Olgunlaşmanın 0. gününde aside adapte ve adapte edilmemiş *L. monocytogenes* sayısı sırasıyla 5.95 ve 6.84 \log_{10} kob/g olarak belirlenmişken, olgunlaşmanın son günü sırasıyla 3.53 ve 3.01 \log_{10} kob/g olarak saptanmıştır. Sonuç olarak; olgunlaşmanın başlangıcında deneysel olarak kontamine edilmiş Şavak tulum peyniri örneklerinde 120 günlük olgunlaşma süresi boyunca *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin yaşama kabiliyeti üzerine asit adaptasyonun etkisinin önemli olmadığı tespit edilmiştir. Olgunlaşma periyodu sonunda bu patojen mikroorganizmaların sayılarının ortalama 2.0 log azalmasına rağmen sayılarının enfektif dozlarının çok üstünde kaldığı saptanmıştır. Bu durum, Şavak tulum peyniri gibi çiğ süttten yapılan ve uzun süre düşük sıcaklıklarda olgunlaştırılan peynirlerin *L. monocytogenes* ve *E. coli* ile kontamine olması durumunda halk sağlığı yönünden ciddi riskler meydana getirebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Asit adaptasyon, Olgunlaşma, *E. coli*, *Listeria*, Şavak tulum peyniri

Survival of Acid-Adapted or Non-Adapted *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during Ripening of Şavak Tulum Cheese

The aim of this study was to investigate the survival of acid adapted or non-adapted *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Şavak tulum cheese during ripening. Şavak tulum cheeses were contaminated with acid- and non-acidified *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* at the beginning of the ripening, and counted for 120 days. For both pathogenic bacteria, it was found that the differences between acid and non-acid-adapted groups were found to be insignificant throughout the ripening period ($P>0.05$). Acid adapted and non adapted *E. coli* O157:H7 counts on day 0 were 5.39 and 5.70 \log_{10} cfu/g, while these numbers were 3.64 and 4.17 \log_{10} cfu/g on day 120, respectively. Acid adapted and non- adapted *L. monocytogenes* numbers on day 0 of the ripening period were 5.95 and 6.84 \log_{10} cfu/g, while these numbers were 3.53 and 3.01 \log_{10} cfu/g on the last day, respectively. As a result, the effect of acid adaptation on the survival of *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 during 120 days of ripening in experimentally contaminated Şavak tulum cheese samples was not found to be significant. Although the number of these pathogenic bacteria counts were decreased 2.0 log at the end of the ripening period, their numbers were still remained well above the infective doses. Contamination of the cheeses that was made from raw milk and ripened for a long period at low temperatures, such as Şavak tulum cheese, with *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 may result in serious threats for public health.

Key Words: Acid adaptation, ripening, *E. coli*, *Listeria*, Şavak tulum cheese

Giriş

Şavak tulum peyniri, çiğ koyun sütünden üretilen, üretimi esnasında starter kültür ilave edilmeden sütün doğal florası tarafından fermente edilen ve 90 gün veya daha fazla süreyle olgunlaştırılan geleneksel bir Türk peynir çeşididir. Üretiminde hiçbir aşamasında ısı işlem uygulanmamaktadır. Türkiye'nin doğu bölgelerinde bulunan Elazığ, Bingöl, Tunceli ve Erzincan illerinde başta olmakla beraber, tüm yurttan üretilen bir peynirdir (1). Türkiye'de tulum peyniri üretimi halen yaygın olarak geleneksel metotlarla aile işletmeleri tarafından yapılmaktadır. Ürünün yaygın olarak çiğ süttten yapılması, pastörizasyon uygulanmaması, üretimde starter kültürlerin kullanılmaması (doğal fermentasyon) ve çapraz kontaminasyon riskinin çok yüksek

* 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 03–06 Nisan 2013, Antalya/TÜRKİYE.

olması gıda güvenliği açısından sağlık risklerini de beraberinde getirmektedir. Tulum peynirleri üzerinde yapılan saha taramalarında bu peynir çeşidinin *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Brucella* spp. gibi bir çok patojen ile kontamine olduğu bildirilmiştir (2, 3).

Tulum peynirinin üretimi ve olgunlaştırılması sırasında peynirde bulunabilecek patojen bakterilerin inhibisyonunu ve/veya ölmelerini sağlayan birçok stres faktörü (a_w , pH, ORP, asitlik) meydana gelmektedir (4). Ancak patojenler gıda içindeki bu stres faktörlerini elimine etmek için adaptasyon mekanizmalarını çalıştırarak hayatta kalmaya çalışmaktadırlar (5). Bakterilerin adaptasyon mekanizmalarının aktif hale gelebilmesi için sublethal streslere maruz kalmaları gerekmektedir (4, 5). Peynir üretimi esnasında pH düzeyinin yavaş yavaş düşmesinin ve asitliğin yavaş yavaş artmasının, birçok patojenin asit tolerans sistemlerini (ATR) aktif hale getiren sublethal ortamın şekillenmesine sebep olduğu anlaşılmıştır (6, 7). Bu olumsuz koşullara yeterli bir süre maruz kalan patojenlerde çok sayıda strese dayanıklılık mekanizması aktif hale gelebilmektedir. Patojenlerin kazandığı bu dayanıklılık pek çok durumda, çapraz-korunma olarak adlandırılan sıcaklık dahil çok çeşitli olumsuz koşula dayanıklılık şeklinde ortaya çıkmaktadır (6, 8). Bu mekanizmaları aktif hale gelen patojenler lethal asiditeye sahip mideden geçerken, rezistans sistemleri aktif hale gelmemiş patojenlere göre daha yüksek yaşama şansına sahip olabilmektedir (9). Diğer bir ifadeyle, midede yıkılma az olduğu için bu bakterilerin daha az sayıda alınmaları bile tehlikeli enfeksiyonlara neden olmaları için yeterlidir.

Geleneksel yöntemler ile yapılan tulum peynirlerinde patojenlerin yaşama kabiliyetleri üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu çalışmada aside adapte edilmiş ve adapte edilmemiş *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin tulum peynirinin 120 günlük olgunlaşma süresi boyunca yaşama kabiliyetleri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Deneyde Refik Saydam Hıfzı Sıhha Enstitüsü kültür koleksiyonu (RSKK), American Type Culture Collection (ATCC) ve Colorado State Üniversitesi'nden (N) temin edilen *Listeria monocytogenes* (RSKK 472, RSKK 474, RSKK 475, N 7143, N7144) ve *E. coli* O157:H7 (ATCC 43890, ATCC 43894, ATCC 51657, ATCC 43895, ATCC 35150) suşları kullanıldı.

İnokulumun Hazırlanması: *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin belirtilen suşları -20°C 'den çıkarılarak, Tryptic Soy Broth'a ekilerek (TSB, LABM, Lancashire, İngiltere) *L. monocytogenes* 30°C ve *E. coli* O157:H7 35°C 'de 24 saat inkübe edildi. Aside adapte suşları hazırlamak için %1 glukoz eklenmiş TSB içerisinde ve aside adapte edilmemiş suşları hazırlamak için ise glukoz içermeyen TSB içerisinde *E. coli* O157:H7 35°C 'de, *Listeria monocytogenes* ise 30°C 'de 24 saat inkübe edildi (10). Daha sonra her bir patojenin 5'er suşu santrifüj (4.200 rpm/15 dk.) edilerek (Nüve NF 800R,

Ankara, Türkiye) üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve yaklaşık 9 mL steril %0.9'luk NaCl (serum fizyolojik) ilave edilerek pelet yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen her iki patojene ait peletlerden aside adapte edilenler ve aside adapte edilmemişler ayrı ayrı birleştirildi ve suşlar inokülasyon için hazır hale getirildi.

Şavak Tulum Peynirine Kontaminasyon Aşaması ve Analiz Günleri: Şavak tulum peynirinin yapım aşaması tamamlanmış, ancak olgunlaşma aşamasına geçmemiş olan peynir örneklerine, her bir patojenin aside adapte olmuş veya aside adapte olmamış suşları kendi aralarında miks haline getirildi. İnokülasyon için hazırlanmış bakteri miksleri her iki patojen için yaklaşık olarak $6.00 \pm 1.00 \log_{10}$ kob/g olacak şekilde peynir kitlesine ilave edildi. Daha sonra inokulumun homojen dağılımını sağlamak için peynirler en az 5 dk. boyunca manuel olarak karıştırıldı. Elde edilen kontamine edilmiş peynir örnekleri steril plastik konteynirlara konulduktan sonra 6°C 'de olgunlaşmaya bırakıldı. Mikrobiyolojik ve kimyasal analizler olgunlaşmanın 0, 15, 30, 45, 60, 90 ve 120. günlerinde yapıldı. Çalışma birbirinden bağımsız 3 tekrar ve her tekrarda tüm analizler 2 paralel olarak gerçekleştirildi.

Mikrobiyolojik Analizler: Peynir örneklerinden aseptik şartlar altında 25 g örnekler alındı ve 225 ml %0.1'lik steril peptonlu su (LABM, Lancashire, İngiltere) ilave edildi. Daha sonra 2 dakika boyunca karıştırıcıda (Stomacher 400) homojenize edildi ve desimal dilüsyonları yapıp plaklara çift seri ekim yapıldı. Mikrobiyolojik analizlerde yayma plak yöntemi kullanıldı.

***E. coli* O157:H7 Sayımı:** *E. coli* O157:H7 sayımı Cefixim Tellurite ilave Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC) (LABM, Lancashire, İngiltere) besiyerinde yapıldı ve 35°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra 30–300 arasındaki beyaz renkli koloniler sayıldı (11).

***L. monocytogenes* Sayımı:** *Listeria monocytogenes* sayımı PALCAM Agar (Oxoid, Basingstoke, Hants., İngiltere) besiyerinde yapıldı ve 30°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra 30-300 arasındaki kahverengi-zeytuni renkli koloniler sayıldı (10).

Diğer Mikrobiyolojik Analizler: *Lactobacillus* spp. sayımı de Man Rogosa Sharpe Agar'da (MRS) (LABM) 30°C 'de 72 saat (12), *Lactococcus* spp. sayımı M17 Agar'da (LABM) 22°C 'de 72 saat (13), toplam mezofil aerob bakteri ve psikrofil bakteri sayımları da Plate Count Agar'da (PCA) (LABM) 35°C 'de 48-72 saat ve 7°C 'de 7 gün (14) inkübe edilerek yapıldı.

Kimyasal Analizler: pH tayini, pH metre (Selecta pH 2001, İspanya) ile daldırma yöntemine göre (15), peynirde toplam asitlik ve tuz tayini ise AOAC prosedürlerine göre (16, 17) yapıldı.

İstatistiksel Analizler: Bakteri sayıları \log_{10} kob/g'a çevrildi. Çalışmada parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği "Levene" testi ile kontrol edilirken, normallik varsayımına ise "Shapiro-Wilk" testi ile bakılarak parametrik testler kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıklar "Student t testi" ile belirlenirken

zamanlar arası farklılıklara tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc analizi olarak "Tukey" testi kullanılarak bakıldı. İstatistiksel önem seviyesi 0.05 olarak kabul edildi. Verilerin analizi, Statistical Analysis System (SAS) kullanılarak yapıldı (18).

Bulgular

Aside adapte edilmiş *Escherichia coli* O157:H7 sayısı Şavak tulum peyniri örneklerinde olgunlaşma periyodunun başlangıcında $5.39 \pm 0.63 \log_{10}$ kob/g olarak bulunurken 120. günde ise $3.64 \pm 0.83 \log_{10}$ kob/g bulunmuştur. Olgunlaşma periyodu boyunca asit adapte edilmiş grupta *E. coli* O157:H7 sayılarındaki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Asit adapte edilmemiş grupta ise olgunlaşma periyodu başında sayı $5.70 \pm 0.53 \log_{10}$ kob/g olarak bulunurken, 120. günde ise sırasıyla ve $4.17 \pm 0.59 \log_{10}$ kob/g olarak bulunmuştur. Asit adapte grupla benzer şekilde asit adapte olmayan grupta da *E. coli* O157:H7 sayısının olgunlaşma periyodu boyunca istatistiksel olarak önemli bir azalma gösterdiği saptanmıştır ($P < 0.05$). Ancak tüm olgunlaşma periyodu boyunca asit adapte edilmiş ve edilmemiş gruplar arasında *E. coli* O157:H7 sayısı yönünden istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0.05$). Şavak tulum peyniri örneklerinde asit adapte edilmiş ve edilmemiş gruplarda *E. coli* O157:H7 sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Şavak tulum peynirinin olgunlaştırma aşamasında aside adapte ve adapte edilmemiş *E. coli* O157:H7 suşlarının 6 °C'de 120 günlük olgunlaştırma periyodundaki sayıları (\log_{10} kob/g)

Olgunlaştırma Periyodu (Gün)	<i>E. coli</i> O157:H7 Sayısı (Ortalama±Standart Sapma)	
	Aside Adapte Edilmiş	Aside Adapte Edilmemiş
0	5.39 ± 0.63^a	5.70 ± 0.53^a
15	4.48 ± 0.42^{ab}	4.64 ± 0.32^{ab}
30	4.27 ± 0.89^b	4.3 ± 0.56^b
45	4.1 ± 1.09^b	4.26 ± 0.38^b
60	4.1 ± 0.89^b	4.79 ± 0.02^{ab}
90	3.7 ± 0.86^b	4.54 ± 0.25^b
120	3.64 ± 0.83^b	4.17 ± 0.59^b

^{a, b}: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$)

Aside adapte edilmiş ve aside adapte edilmemiş gruplar arasında fark bulunmamıştır ($P > 0.05$)

Listeria monocytogenes sayıları asit adapte edilmiş grupta olgunlaşma periyodunun başlangıcında $5.95 \pm 0.16 \log_{10}$ kob/g olarak bulunurken, 120. günde ise $3.53 \pm 0.82 \log_{10}$ kob/g olarak bulunmuştur. Asit adapte edilmiş grupta olgunlaşma periyodu boyunca *L. monocytogenes* sayılarındaki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Asit adapte edilmemiş grupta ise *L. monocytogenes* sayısı olgunlaşma periyodunun başında $6.84 \pm 0.11 \log_{10}$ kob/g olarak tespit edilmişken, 120. günde 3.01 ± 0.21 olarak belirlenmiştir. Asit adapte edilmemiş grupta da

olgunlaşma periyodu boyunca *L. monocytogenes* sayılarındaki azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Asit adapte edilmiş ve edilmemiş gruplar arasında tüm olgunlaşma periyodu boyunca elde edilen sayılar arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0.05$). Şavak tulum peyniri örneklerinde aside adapte edilmiş ve edilmemiş gruplardaki *L. monocytogenes* sayıları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Şavak tulum peynirinin olgunlaştırma aşamasında aside adapte ve adapte edilmemiş *Listeria monocytogenes* suşlarının 6 °C'de 120 günlük olgunlaşma periyodu boyunca elde edilen sayıları (\log_{10} kob/g)

Olgunlaştırma Periyodu (Gün)	<i>L. monocytogenes</i> Sayısı (Ortalama±Standart Sapma)	
	Aside Adapte Edilmiş	Aside Adapte Edilmemiş
0	5.95 ± 0.16^a	6.84 ± 0.11^a
15	5.33 ± 0.48^{ab}	5.25 ± 0.65^b
30	5.06 ± 0.23^{ab}	4.57 ± 0.78^{bc}
45	4.46 ± 0.68^b	4.52 ± 0.10^{bc}
60	4.93 ± 0.24^b	4.44 ± 0.91^{bc}
90	3.69 ± 1.49^b	3.70 ± 0.47^c
120	3.53 ± 0.82^b	3.01 ± 0.21^c

^{a, b, c}: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$)

Aside adapte edilmiş ve aside adapte edilmemiş gruplar arasında fark bulunmamıştır ($P > 0.05$)

Aside adapte edilmiş ve aside adapte edilmemiş peynir örneği gruplarının toplam mezofilik aerobik bakteri, psikrofilik bakteri, *Lactococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp. sayıları Tablo 3'de gösterilmiştir. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı olgunlaşma periyodunun başlangıcında aside adapte edilmiş grupta $8.42 \pm 0.23 \log_{10}$ kob/g olarak bulunmuşken, aside adapte edilmemiş grupta ise $8.45 \pm 0.25 \log_{10}$ kob/g olarak bulunmuştur. Olgunlaşma periyodunun sonunda ise TMAB sayıları aside adapte edilmiş ve edilmemiş gruplarda sırasıyla 8.26 ± 0.32 ve $8.15 \pm 0.2 \log_{10}$ kob/g olarak bulunmuştur. Tüm olgunlaşma periyodu boyunca iki grup arasında TMAB sayıları yönünden istatistiksel bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0.05$). Benzer şekilde grupların kendi içinde olgunlaşma periyodu boyunca TMAB sayısı açısından önemli bir değişiklik olmamıştır ($P > 0.05$). Psikrofil bakteri sayıları aside adapte edilmiş ve edilmemiş grupta olgunlaşma periyodunun başlangıcında 8.13 ± 0.49 ve $8.26 \pm 0.43 \log_{10}$ kob/g olarak bulunurken, olgunlaşma periyodunun sonunda ise 8.14 ± 0.1 ve 8.17 ± 0.08 olarak bulunmuştur. Psikrofil bakteri sayılarında hem gruplar arasında hem de olgunlaşma boyunca grup içindeki değişimler önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Aside adapte edilmiş ve aside adapte edilmemiş gruplarda *Lactococcus* spp. sayısı olgunlaşma periyodu başlangıcında sırasıyla 8.84 ± 0.62 ve 8.9 ± 0.43 olarak bulunmuş ve aradaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Tüm olgunlaşma

Tablo 3. Şavak tulum peynirinin 6 ° C'de 120 gün boyunca olgunlaştırılması süresince bazı mikroorganizmalardaki değişimler (log₁₀ kob/g)

Grup	Olgunlaşma Periyodu (Gün)							
	0	15	30	45	60	90	120	
Toplam Mezofilik Aerob Bakteri	Aside Adapte Edilmiş	8.42±0.23	8.42±0.17	8.45±0.33	8.30±0.3	8.26±0.04	8.17±0.18	8.26±0.32
	Aside Adapte Edilmemiş	8.45±0.25	8.38±0.16	8.56±0.25	8.01±0.16	8.25±0.05	8.17±0.18	8.15±0.2
Aerob Psikrofil Bakteri	Aside Adapte Edilmiş	8.13±0.49	8.03±0.28	8.27±0.12	8.29±0.39	8.1±0.34	8.2±0.08	8.14±0.1
	Aside Adapte Edilmemiş	8.26±0.43	8.09±0.2	8.3±0.07	8.05±0.03	8.22±0.12	8.25±0.04	8.17±0.08
Lactobacillus spp.	Aside Adapte Edilmiş	8.94±0.32	8.56±0.15	8.59±0.06	8.4±0.27	8.24±0.19	8.45±0.14	8.25±0.16
	Aside Adapte Edilmemiş	8.95±0.33	8.58±0.12	8.6±0.09	8.4±0.28	8.24±0.18	8.1±0.46	8.36±0.09
Lactococcus spp.	Aside Adapte Edilmiş	8.84±0.62	8.54±0.09	8.30±0.6	8.19±0.09	8.03±0.86	7.74±1.23	8.24±0.09
	Aside Adapte Edilmemiş	8.9±0.43	8.52±0.07	8.54±0.03	8.19±0.08	7.63±0.66	7.67±0.61	8.19±0.07

Aside adapte edilmiş ve aside adapte edilmemiş gruplar arasında fark bulunmamıştır (P>0.05).

Olgunlaşma periyodu boyunca günler arasında fark bulunmamıştır (P>0.05).

Tablo 4. Şavak tulum peynirinin 6 ° C'de 120 gün boyunca olgunlaştırılması süresince pH, laktik asit ve tuz miktarlarındaki değişimler

Olgunlaştırma Periyodu (Gün)	pH	Laktik asit Miktarı (% g)	Tuz Miktarı (%)
0	4.74±0.12	1.74±0.22	2.92±0.38
15	4.91±0.07	1.76±0.38	2.69±0.45
30	4.89±0.19	1.76±0.13	2.79±0.41
45	4.83±0.24	1.70±0.11	2.88±0.18
60	4.80±0.32	1.88±0.33	2.98±0.71
90	4.88±0.27	1.90±0.27	3.12±0.33
120	4.92±0.41	1.89±0.41	3.10±0.27

periyodu boyunca *Lactococcus* spp. sayılarındaki değişim önemsiz bulunmuştur (P>0.05) *Lactobacillus* spp. sayıları olgunlaşma periyodunun başında aside adapte edilmiş ve edilmemiş gruplarda sırasıyla 8.94±0.32 ve 8.95±0.33 olarak bulunmuştur. *Lactobacillus* spp. sayılarındaki değişim tüm olgunlaşma periyodu boyunca önemsiz bulunmuştur (P>0.05).

Şavak tulum peyniri örneklerinden elde edilen kimyasal analiz bulguları, aynı peynirin ikiye bölünmesi sonucu oluşturulan gruplar ve gruplara patojen bakterilerin dışında herhangi başka bir madde ilavesi yapılmadığı için iki grubun ortalaması alınmış ve tek bir değer olarak Tablo 4'de gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda olgunlaşma periyodunun başlangıcında ve 120. günde pH miktarının sırasıyla 4.74±0.12 ve 4.92±0.41 olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma periyodu boyunca pH değişiminin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Laktik asit miktarının olgunlaşma periyodunun başında ve 120. gününde sırasıyla %1.74±0.22 ve %1.89±0.41 olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma periyodunda laktik asit miktarının bir miktar artmış olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen,

başlangıç günü ile 120. gün arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (P>0.05). Tuz miktarında da laktik asit ve pH değerleri gibi olgunlaşma periyodu boyunca istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Tuz miktarı olgunlaşma periyodunun başlangıcında %2.92±0.38 olarak bulunmuşken, 120. günde ise %3.10±0.27 olarak bulunmuştur.

Tartışma

Bu çalışmada, saha şartlarında uygulanan geleneksel tulum peyniri üretim prosedürleri kullanılarak Şavak tulum peyniri üretilmiştir. Üretimi tamamlanan peynirlere olgunlaşma başlangıcında aside adapte edilen ve edilmeyen *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 kontamine edilmiş ve peynir örneklerinde bu patojenlerin yaşam kabiliyetleri araştırılmıştır. Olgunlaşma periyodunun sonunda aside adapte edilen ve edilmeyen gruplar arasında fark çıkmamış olmasına rağmen, iki patojenin de sayılarında yaklaşık olarak 2.0 log₁₀ kob/g civarında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Tulum peynirinin olgunlaştırılması sırasındaki bu azalmasının sebebi olarak; ürünün içerisindeki doğal florada yer alan bakterilerinin sayısı, ortamda bulunan besin maddeleri için yarışmacı kabiliyeti yüksek olan çok sayıda bakteri bulunması, pH ve asit miktarı, laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolitlerin (bakteriosin vb.) ortamda birikimi ve bu metabolitlerin patojenler üzerinde oluşturdukları inhibitör etki ve bu faktörlerin patojen bakterilerde oluşturduğu metabolik yorgunluk olduğu düşünülmektedir (19-23). Ancak patojenlerin sayısında meydana gelen bu azalma, Amerika Birleşik Devletleri, Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration – FDA) (24) tarafından açıklanan insan sağlığı açısından risk taşıyan patojenlerin seviyesinde 5 log'luk azalma şartını, kontamine Şavak tulum peynirlerinde *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* için karşılayamamıştır.

Gıdaların üretim, muhafaza ve olgunlaştırılması esnasında patojen mikroorganizmaların yaşamını veya aside dirençliliğini araştıran çalışmalarda, aside dirençli ve aside dirençli olmayan suşlar arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amaçlanmıştır (25-27). Fermente bazı gıdalarda yapılan çalışmalar da aside adapte olmayan mikroorganizmaların da aside adapte edilen mikroorganizmalar kadar yaşayabildikleri ve gıdanın içerisinde fermentasyon işlemi sırasında aside adaptasyon kabiliyeti kazanabildikleri belirtilmektedir (22, 27). Ayrıca gıdanın üretimi ve muhafazası esnasında aside adapte olmamış mikroorganizmaların daha uzun süre canlılıklarını koruyabildikleri belirlenmiştir (22, 27). Bu konuda yapılan bir çalışmada %1 glikoz ilave edilmiş Tyrtic Soy Broth içerisinde aside adapte edilmiş bakteriler ile gıda ortamında aside adapte edilmiş (portakal, elma ve domates suyunda 24 saat bekletilmiş) bakterilerin sentetik mide sıvısında asit direnç kabiliyetleri karşılaştırıldığında, gıda ortamında aside dirençli hale getirilmiş bakterilerin daha dayanıklı olduğu belirtilmiştir (28). Bu sonuçlar göz önüne alındığında mevcut çalışmamızda aside adapte edilmemiş grupların da kısa sürede adaptasyon kabiliyeti kazandıkları düşünülmektedir. Bu durum da aside adapte edilmiş grup ile aside adapte edilmemiş gruplar arasında fark çıkmaması sonucunu açıklayabilmektedir.

Asit adaptasyon konusunda yapılan bir başka çalışmada (27), aside adapte edilmiş ve edilmemiş *E. coli* O157:H7 suşlarının yoğurt, set-yoğurt, kefir ve süzme yoğurtta fermentasyon öncesi ve sonrasında kontamine edilmiş ve 4 °C'de muhafaza sırasında bu bakterilerin yaşama kabiliyetleri incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular olarak fermentasyon öncesi kontaminasyonda aside adapte olmayan bakterilerin daha dirençli oldukları, fakat fermentasyon sonrası kontaminasyonda ise aside adaptasyonun bakterinin yaşama gücünü arttırdığı belirtilmiştir. Aynı şekilde cottage peyniri (pH 4.71), yoğurt (pH 3.9), az yağlı (pH 5.25) ve yağlı (pH 5.16) cheddar peyniri gibi asidik gıdalarda yapılan bir çalışmada, bu ürünlerin hepsinde de *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonla hayatta kalma kabiliyetinin arttığı belirtilmiştir (21).

Pastörize (endüstriyel) veya çiğ koyun sütünden (geleneksel) üretilen Galotyri peyniri ile yapılan çalışmalarda (11, 29), iki tipte üretilen bu peynire deneysel olarak *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inoküle edilmiş ve peynirlerin 4 °C ve 12 °C sıcaklıkta muhafazası sırasında bu patojenlerin yaşam kabiliyetleri incelenmiştir. Başlangıçta 7 log₁₀ kob/g sayıda *L. monocytogenes* inoküle edilmiş ve 12 °C'de muhafaza edilen örneklerde 21. günden itibaren patojen sayısının tespit edilebilir seviyenin altına düştüğü belirtilmiştir (29). Ancak 4 °C'de muhafaza edilen örneklerde ise *L. monocytogenes* sayısının 28. günde yaklaşık 1.6 log₁₀ kob/g olduğu belirtilmiştir. *E. coli* O157:H7 ile deneysel olarak kontamine edilmiş (6.5 log₁₀ kob/g) Galotyri peynirinde ise endüstriyel üretim ile hazırlanan peynirlerde her iki muhafaza sıcaklığında da (4 °C ve 12 °C) yaklaşık muhafazanın 14. gününden itibaren bu

patojenin tespit edilebilir seviyenin altına düştüğü belirtilmiştir (11). Ancak geleneksel üretimde her iki muhafaza derecesinde de patojen seviyesi 5 log₁₀ kob/g civarında bulunmuştur (54). Araştırmacılar, endüstriyel ve geleneksel yöntemler ile üretilen Galotyri peynir örneklerinde *E. coli* O157:H7'nin yaşama kabiliyetindeki bu farklılığın, 0. ve 7. günler arasındaki L (+) laktik asit artışından ve endüstriyel üretimde kullanılan ticari starter kültürlerin oluşturduğu metabolitlerden kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir (11). Şavak tulum peyniri ile çok yakın benzerlikleri bulunan geleneksel Galotyri peynirinde elde edilen sonuçlar ile Şavak tulum peyniri ile yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılığın, mevcut çalışmamızda deneysel peynir örneklerinin üretiminde ticari bir starter kültür kullanılmaması ve buna bağlı olarak olgunlaşma periyodu boyunca laktik asit miktarının önemli düzeyde bir artış göstermemesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Şavak tulum peynirleriyle yapılan bu çalışmada belirlenen *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., toplam mezofilik aerobik bakteri ve psikrofilik aerobik bakteri sayıları ile pH değeri, laktik asit miktarı ve tuz miktarı benzer peynirlerde çalışmış diğer araştırmacıların bulgularıyla uyum göstermektedir (30-36). Tulum peynirinde *Lactobacillus* spp. ve *Lactococcus* spp. mevcut mikrofloranın çok büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar gerek besin madde gereksinimleri için yarışmacı halde olmaları ile gerekse de ürettikleri metabolitler ile diğer mikroorganizmalar üzerinde bir stres yaratmaktadır. Ancak bu stresin diğer mikroorganizmalar üzerinde yarattığı inhibitör etki, ürünün yapısı, üretim şekli, muhafaza sıcaklığı ve mevcut mikroflora içerisinde bulunan mikroorganizmaların sayı ve çeşidine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu durumun, mevcut çalışmamızda incelenen aside adapte ve adapte edilmemiş suşların, Şavak tulum peynirindeki yaşamları arasında önemli bir farklılık bulunmamasının sebeplerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, peynir örneklerinde kontaminasyonun meydana geldiği olgunlaştırmanın 0. gününden, son analiz günü olan 120 güne kadar *L. monocytogenes* sayısında ortalama 2.5-3.0 log, *E. coli* O157:H7 sayısında ise yaklaşık 1.5-2.0 log bir azalma tespit edilmiştir. Olgunlaştırma periyodu boyunca pH, asitlik ve tuz oranında ise önemli bir değişiklik tespit edilememiştir. Bu patojenlerin sayılarında olgunlaştırma periyodu boyunca her ne kadar bir azalma meydana gelmiş olsa da çiğ süttten üretilen bu peynirlerin halk sağlığı açısından oldukça riskli olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Mevcut durum göz önüne alınarak peynirlerin üretim ve olgunlaşma aşamalarında patojen mikroorganizmalarla kontamine olması engellenmeli ve üretimde kullanılan hammaddede pastörize edilmelidir. Ayrıca işletmelerdeki hijyenik kriterlerin artırılması, GMP uygulamalarının gerçekleştirilmesi ve HACCP planlarının hazırlanırken patojenlerin pre ve post-kontamine olma ihtimalleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Kaynaklar

- Kara R, Akkaya L. Afyon tulum peynirinin mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri ile laktik asit bakterisi dağılımlarının belirlenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimler Dergisi 2015; 15: 1-6.
- Çolak H, Hampikyan H, Bingöl EB, Ulusoy B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in tulum cheese. Food Control 2007; 18: 576-579.
- Patır B, Ateş G, Dinçoğlu AH, Kók F. Elazığ'da tüketime sunulan tulum peynirinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi ile laktik asit bakterileri üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 2000; 14: 75-83.
- Gahan CGM, Hill C. Relationship between stress adaptation and virulence in foodborne pathogenic bacteria. In: Yousef AE, VK Juneja VK (Editors). Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press, New York. 2003: 213-235.
- Foster JW. When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 170-174.
- Falerio ML, Andrew PW, Power D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. Int J Food Microbiol 2003; 84: 207-216.
- Kıvanç M. The microbiological quality of Erzincan (Savak) tulum cheese from Turkish retail markets. Die Nahrung 1989; 33: 895-900.
- Murphy C, Carrol C, Jordan KN. Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol Lett 2003; 223: 89-93.
- Jonge R, Takumi T, Ritmeester WS, Leusden FM. The adaptive response of *Escherichia coli* O157 in environment with changing pH. J Appl Microbiol 2003; 94: 555-560.
- Calicioglu M, Sofos JN ve Kendall PA. Influence of marinades on survival during storage of acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* inoculated post-drying on beef jerky. Int J Food Microbiol 2003; 86: 283-292.
- Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas LP, Kontominas MG, Samelis J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. Food Microbiol 2006; 23: 268-276.
- International Organization For Standardization (ISO) 15214:1998(en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — colony-count technique at 30 degrees C. 1998
- Terzaghi BE, Sandine WE. Improved medium for *lactic streptococci* and their bacteriophages. Appl Microbiol 1997; 29: 807-813.
- United States Agricultural Department-Food Safety Inspection Service (USDA-FSIS). Microbiology Laboratory Guidebook. Metot 3.01, Quantitative analysis of bacteria in foods as sanitary indicators, 2011.
- American Public Health Association. Standards Methods for the Examination of Dairy Products. 13th Edition, New York: American Public Health Association, 1974.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Method 920.124. Acidity of cheese. 15th Edition. Association of official analytical chemists; Arlington: 15th Edition, Washington DC, 1990.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). International official methods of analysis, 18th edn., 2005; Current through revision 2, 2007 (On-line). Method 941.18, Standard solution of silver nitrate; Method 983.14, Chloride (total) in cheese. AOAC International, Gaithersburg, MD, 2007.
- Statistical Analysis System (SAS) Version 8.0. Cary, NC: SAS Institute. 1999.
- Border P, Horvard J, Plastow G, Siggins K. Detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Lett Applied Microbiol 1990; 11: 158-162.
- Frank JF, Marth EH. Fermentation. In: Wong NP, Jenness R, Keeney M, Marth EH. (Editors). Fundamentals of dairy chemistry. Van Nostrand-Reinhold, New York, 1988: 655-738.
- Gahan CGM, O'Driscoll B, Hill C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 3128-3132.
- Hsin-Yi C, Chou CC. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. Int J Food Microbiol 2001; 70: 189-195.
- Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int Food Microbiol 2000; 55: 181-186.
- Samelis J, Sofos JN. Organic acids. In: Roller S. (Editor), Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Cambridge, UK: CRC Woodhead Publishing Ltd., 2003: 98-132.
- Cataldo G, Conte MP, Chiarini F, Seganti L, Ammendolia MG, Superti F, Longhi C. (). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. J Applied Microbiol 2007; 103: 185-193.
- Sing M, Simpson SM, Mullins HR, Dickson JS. Thermal tolerance of acid adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef during storage. Foodborne Pathog Dis 2006; 3: 439-446.
- Tosun H, Seçkin AK, Gönül ŞA. Acid adaptation effect on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented milk products. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science 2007; 31(1): 61-66.
- Yuk HG, Schneider KR. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. Food Microbiol 2006; 23: 694-700.
- Rogga KJ, Samelis J, Kakouri A, Katsiari MC, Savvaidis IN, Kontominas MG. Survival of *Listeria monocytogenes* in galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. Int Dairy J 2005; 15: 59-67.
- Morul F, İşleyici Ö. Divle tulum peynirinin kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2012; 23: 71-76.
- Erdem G, Patır B. Elazığ'da tüketime sunulan tulum peynirlerinde histamin düzeyleri ile bazı kimyasal kalite parametreleri üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 2017; 31: 235-241.
- Karadal F, Onmaz NE, Bağcı C, Yıldırım Y, Al S, Abay S. Niğde ilinde satışa sunulan koyun-keçi sütünün ve

- peynirlerinde *Brucella melitensis* ve biyotiplerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2016; 13: 101-108.
33. Çağlar A. Çiğ süttten üretilen ve farklı ambalajlama materyallerinde olgunlaştırılan Erzincan tulum peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerindeki değişimler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 20013; 2: 285-292.
34. Çakmakçı S, Dağdemir E, Hayaloğlu AA, Gürses M, Gündoğdu E. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in tulum cheese. World J Microbiol Biotech 2008; 24: 293-299.
35. Dinçoğlu AH. Tulum peynirinin olgunlaştırılması sırasında *Brucella melitensis*'in yaşam süresine potasyum sorbatın etkisi. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2002.
36. Patır B, Ateş G, Dinçoğlu AH. Geleneksel yöntemle üretilen tulum peynirinin olgunlaşması sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve kimyasal değişimler üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 2001; 15: 1-8.