

Margarinde Yüksek Sıcaklığa Dayanıklı Küflerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Isıl Dirençlerinin Belirlenmesi¹

A. Ş. Demirci

M. Arıcı

Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ

Bu çalışmada Trakya bölgesinde faaliyet gösteren bir margarin üretim tesisinde problem oluşturan küfler izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Ayrıca bu küflerin ısıl dirençleri incelenmiştir. Araştırmada margarin üretim tesisi kullanma suyu ve margarinlerden, ısıl dirence sahip farklı iki küf izole edilmiş, bu izolatların tanımlanması yapıldıktan sonra farklı sıcaklıklardaki ısıl dirençleri incelenmiştir. Küf izolatları makroskopik ve mikroskopik özellikleri dikkate alınarak yapılan analizlerin sonucunda sıcaklığa dayanıklı, doğada çok yaygın olarak bulunan ve insan ve hayvanlarda enfeksiyona sebep olan *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii* olarak tanımlanmıştır. Isıl dirençle ilgili analiz sonuçlarına göre; *Aspergillus fumigatus*'un 95°C'de 15 dakika, *Paecilomyces variotii*'nin ise 90°C'de 10 dakikalık ısıl işleme dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, ısıl direnç

Isolation, Identification of Heat Resistant Moulds in Margarine and Determination of Their Heat Resistance

In this study, moulds that cause problems in a margarine production plant which is located in Trakya region have been isolated and identified. In addition to, their heat resistance and lipolytic activity were studied. For this purpose, margarine samples from various production lots and process water samples from production plant were taken aseptically, transported immediately to the laboratory and analyzed. In this research, two different heat resistant mould strains have been isolated from margarines and process water. After identification of this moulds, their heat resistances at different temperatures have been investigated. Mould isolates were identified as heat resistant *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii* based on macroscopic and microscopic features. To this analyses results about thermal resistance, *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* were ability to survive heat treatment at 95°C 10 minutes and 90°C 10 minutes, respectively.

Key Words: *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, heat resistance

¹ Bu makale A. Şükrü Demirci'nin Yüksek Lisans Tezinden hazırlanmıştır.

Giriş

Isıl işleme dayanıklı küfler, kısa süreli sıcaklık uygulamalarına ve gıda üretim proseslerindeki çeşitli ısıl işlemlere direnç göstererek yaşamlarını sürdüren mikroorganizmalardır. Uygulanan ısıl işlemlerden ısıya dayanıklı küfler, askosporları sayesinde etkilenmeyerek canlılıklarını sürdürmektedir (Aydın ve ark., 2005).

Yüksek sıcaklığa dayanıklı küfler sanayide uygulanan bazı ısıl proseslere (pastörizasyon, termizasyon) göstermiş oldukları direnç ile ısıl işlemleri görmüş son ürünlerde, görünüm değişikliği, bombaj, aroma ve lezzet kaybı gibi bozulmalara ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Beuchat ve Rice 1979, Butz ve ark., 1996, Ku ve Hang 1994). Bozulmaya yol açan en tanınmış ısıya dirençli küf türleri *Byssoschlamys fulva*, *Byssoschlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces macrosporus* ve *Talaromyces avellaneus*'tur. Isıya dayanıklı küfler gıdalarda bozulma ve ekonomik kayıpların yanı sıra ürettikleri mikotoksinler ile de insan sağlığını doğrudan olarak ilgilendirmektedirler.

Isıya dayanıklı ürünlerin en çok tespit edildiği ürünler, meyve suları, meyveli jel şeklindeki bebek gıdaları, şarap, süt ve süt ürünleri (peynirler, krema vb.), domates salçası ile unlu mamuller olarak bildirilmektedir (Anonymous, 2001; Samson ve ark., 2002; Pitt ve Hocking, 1997; Anonymous, 1998).

Sıcaklık uygulamalarına bağlı inaktivasyon çalışmaları en çok *B. nivea*, *B. fulva*, *N. fischeri* ve *Talaromyces* türlerinde (*T. flavus* ve *T. macrosporus*) gerçekleştirilmiştir. Bagermann ve Samson (1988), ısıya dayanıklı küflerin kendi arasında, ısıya daha dayanıklı suşların bulunduğunu, özellikle *Neosartorya fischeri* ve *Talaromyces flavus*'un diğer ısıya dayanıklı küflere oranla daha dirençli olduklarını ve 100°C'de 30 dakikadan fazla sürede canlılıklarını muhafaza ettiklerini bildirmektedir.

Ugwuanyi ve Obeta (1991)'nin yapmış oldukları çalışmada, toprak örnekleri ve mango meyvesinde ısıya dayanıklı küf varlığını araştırmışlar ve belirlenen bu küfler *N. fischeri*, *N. fischeri* var. *spinosa*, *A. flavus*, *P. citrinium* ve *Paecilomyces variotii* olarak tanımlanmıştır.

Jesenská ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada toprak örneklerinden izole edilen *A. fumigatus* ve diğer küfler 60-70-80-90°C'lerde

ısı muameleye maruz bırakmışlar ve *A. fumigatus*'un 80°C'de 60 dakika sonunda canlı kaldığını fakat 90°C'de 10 dakikalık muamelenin sonunda tamamen inaktive olduğunu tespit etmişlerdir.

Kotzekidou (1997) bozulmuş konserve domates püresinden izole ettiği ısıya dayanıklı küf kültürleri üzerinde yaptığı çalışmada; Bu küflerin 90°C'deki ölüm zamanlarını *Byssoschlamys nivea* için 1,5 dakika, *Byssoschlamys fulva* için 8,1 dakika ve *Neosartorya fischeri* için 4,4-6,6 dakika olarak bulmuştur.

Bu çalışmada, margarinlerde ısıl direnci yüksek küflerin varlığı, izolasyonu, tanımlanması, küflerin insan sağlığına etkileri ve ısıl dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

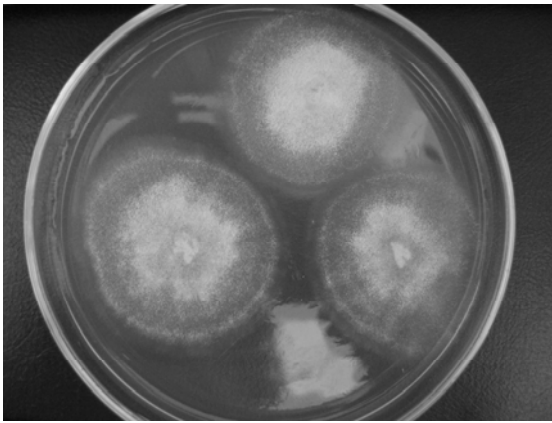
Araştırmada materyal olarak bir margarin üretim tesisi kullanma suyu ve margarinlerden izole edilmiş küf izolatları kullanılmıştır.

Isıya Dayanıklı Küflerin İzolasyonu: Isıya dayanıklı küflerin izolasyonu Beuchat ve Pitt (2001)'in önerdiği metoda göre yapılmıştır. Margarin belirli oranlarda saf su ile karıştırılıp homojen hale getirilmiştir. Karıştırma işleminden sonra; kaba yayılmış haldeki karışım sızıntı olmayacak kapalı şekilde 75°C – 80°C arasında 1,5 saat su banyosuna bırakılmıştır. Homojen yapının korunması açısından 75°C'de en azından 30 dakika tutulmuştur. Isıtma işleminden sonra; homojenize edilmiş örnekler petri kaplarındaki Potato Dextrose Agar (PDA) veya Malt Extract Agar (MEA) üzerine yayma yöntemiyle ekilmişlerdir. Petri kapları kurumayı engelleyecek şekilde inkübatöre 30°C'de 30 güne kadar bırakılmış, canlı kalan askosporun çimlenmesi sağlanmıştır ve 7-10 gün inkübasyondan sonra çimlenen sporlar koloni oluşturmaya başlamıştır. Buna karşılık ısıya dayanıksız, zayıf askosporlar koloni oluşturmak için daha fazla zamana ihtiyaç duymuşlardır. 30 günlük inkübasyon süresiyle küflerin olgunlaşım spor oluşturmaya imkan sağlanmış, böylece tanımlanmaları imkan dâhilinde olmuştur.

Küflerin Tanımlanması: İzolatların saf kültürleri elde edildikten sonra petri kutularındaki PDA, MEA ve Czapek Dox Agar (CDA) besi yerlerine üç nokta ekimleri

yapılarak 25°C'de 3-5 gün inkübe edilmişlerdir. Gelişimlerini tamamlayan küf kolonilerinin tanımlanmaları, makroskopik ve mikroskopik özellikler göz önüne alınarak yapılmıştır. Makroskopik incelemede; koloni görünümü (düz, balmumu, kadife, pamuk veya yün manzarası şeklinde görünüm), koloni büyüklüğü, yüzeyin basık, kümelenmiş, göbekli, halkalı, çatlaklı olup olmadığı, örgüsünün tüylü, tozlu ve taneli, deri gibi olup olmadığı, yüzey veya besi yerinin altından rengi incelenmiştir. Mikroskopik görünümde ise, hiflerin yapısı, septalı olup olmadığı, şekli, uçlarında üreme ile görevli yapıların bulunup bulunmadığı, bulunuyorsa bunların ince yapısı mikroskopta incelenmiştir (Harrigan ve ark., 1966; Erbakan, 1989).

Küflerin Sıcaklıkla Muamelesi: Tüp içinde hazırlanan küf sporları süspansiyonu sıcaklık kontrollü su banyosunda 80, 85, 90, 95, 100°C'lik sıcaklıklarda sırasıyla 5, 10, 15 dakikalık sürelerde ısıtılma maruz bırakılmıştır. Isıtılma işleminden sonra tüpler buzlu suya alınarak soğutulmuş ve ekimleri yapılmıştır.



Şekil 1 *Aspergillus fumigatus*'un CDA besiyeri üzerindeki koloni gelişimi.

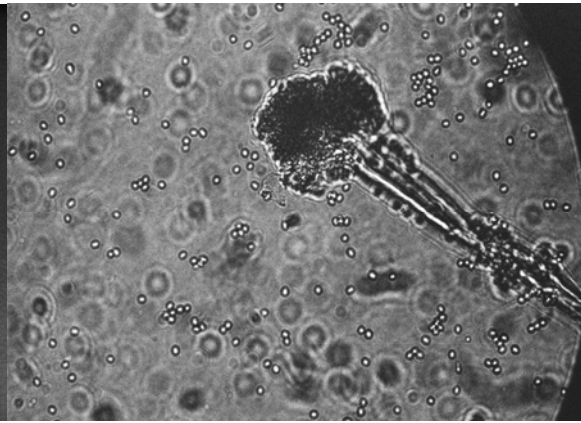
Paecilomyces variotii kolonileri besi yerleri üzerinde hızlı bir şekilde gelişme göstermiş ve 3 gün içerisinde olgunluğa erişmiştir. *Paecilomyces variotii*'nin termofilik bir küf olduğu ve 50-60°C'lerde iyi gelişme gösterdiği saptanmıştır. Koloniler düz, yassı, toz halinde ve kadife yapıda gözlemlenmiştir. Koloni rengi başlangıçta beyaz, zamanla sarı, sarı-yeşil, sarı-kahverengi-zeytin kahverengi, pembe veya mor

Bulgular ve Tartışma

İzole edilen küf türleri makroskopik ve mikroskopik özellikleri dikkate alınarak *Aspergillus fumigatus* ve *Paecilomyces variotii* olarak belirlenmiştir.

Aspergillus fumigatus kolonilerinin yüzeyi PDA üzerinde 25°C'de fume gri-yeşil bir renk oluşturmuştur. Alt kısmı solgun sarı bir renk olarak görülmüştür. Daha olgun kolonilerde gri renge doğru bir dönüşüm gözlenmiştir. CDA üzerindeki gelişmede ise kolonilerin yüzeyi mavi-yeşil bir görüntü almıştır. Her iki besi yerinde de çok hızlı bir şekilde gelişme göstermiştir. Gelişen koloniler makroskopik olarak ipliksi, yünlü, pamuksu, ince tüylü ve toz şeklinde bir yapıda görülmüştür.

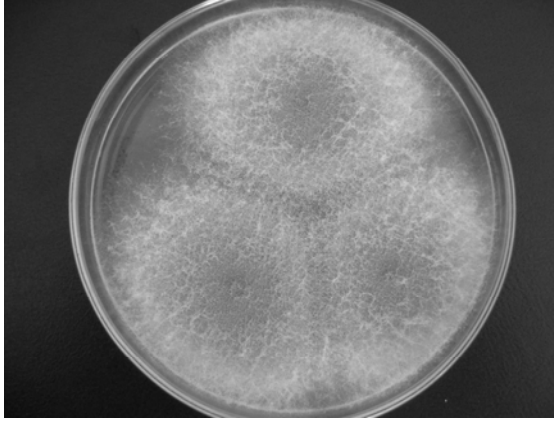
Aspergillus fumigatus'un mikroskopik görünümünde ise hifler bölmeli ve şeffaf (renksiz) bir yapıda gözlemlenmiştir. Konidial başları 400x500 µm büyüklüğünde ölçülmüştür. Konidiosporlar düz ve pürüzsüz yapıda, renksiz, 300 µm uzunluğunda ve uç bölgelerde konik şekilli (20-30 µm çapında) keseciklere sahip bir görüntü arz etmiştir. Şekil 1'de *Aspergillus fumigatus*'un CDA besiyeri üzerindeki koloni gelişimi, Şekil 2'de ise mikroskopik görünümü verilmiştir.



Şekil 2 *Aspergillus fumigatus*'un mikroskopik görünümü (x200)

rengine doğru dönüşümler göstermiştir. Olgun kültürlerde tatlı bir koku hissedilmiştir. Kolonilerin alt tarafları kirli beyaz, solgun sarı veya kahverengi renklerinde görülmüştür.

Paecilomyces variotii'nin mikroskopik görünümünde ise; bölmeli şeffaf-renksiz hif, konidiospor, kese, konidia ve klamidiosporlar gözlemlenmiştir. Konidiosporlar (3-4 µm genişliğinde ve 400-600 µm uzunluğunda) dallı



Şekil 3 *Paecilomyces variotii*'nin CDA besiyeri üzerindeki koloni gelişimi.



Şekil 4 *Paecilomyces variotii*'nin mikroskopik görünümü (x400).

bir yapı gösterdiği ve uçlarında keseler taşıdıkları saptanmıştır. Şekil 3'de *Paecilomyces variotii*'nin CDA besiyeri üzerindeki koloni gelişimi, Şekil 4'de ise mikroskopik görünümü verilmiştir.

Aspergillus fumigatus ve *Paecilomyces variotii*'nin ısı muameleye gösterdikleri direnç değerleri Çizelge 1 ve Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 1'den de görüleceği gibi *Aspergillus*

fumigatus askosporları 80, 85 ve 90°C'lik sıcaklıklarda 30 dakika sonunda canlı kalabilmiş, 95°C'de 15 dakikanın sonunda inaktive olmuşlardır. Fakat 100°C'lik sıcaklığa askosporların hiçbirisi dayanmamıştır. 80 ve 85°C'lik muamelelerde 15-20 dakikalar arasında askospor konsantrasyonunda ciddi bir değişim olmamıştır.

Çizelge 1. *Aspergillus fumigatus* MA01'in farklı sıcaklık ve sürelerde belirlenen ısı direnci.

Askospor (kob/ml) Sıcaklık (°C)					
Zaman (dak.)	80	85	90	95	100
0	3,5x10 ⁶	3,1x10 ⁶	3,7x10 ⁶	3,6x10 ⁶	3,4x10 ⁶
5	5,2x10 ⁴	3,7x10 ⁴	3,1x10 ³	2,1x10 ²	-
10	8,2x10 ³	5,6x10 ³	7,3x10 ²	1,6x10 ²	-
15	6,4x10 ²	6,2x10 ²	5,8x10 ²	6x10 ²	-
20	2x10 ²	1,7x10 ²	1,4x10	-	-
30	3x10	1,5x10	3	-	-

Paecilomyces variotii de *A. fumigatus*'a uygulanan aynı sıcaklık ve sürelerde ısı işlemi tabii tutulmuştur. *Paecilomyces variotii*'nin ısı işlemi *Aspergillus fumigatus*'a nazaran daha dayanıksız olduğu ve maksimum 90°C'de 10 dakikalık muameleye dayanabildiği tespit edilmiştir. Bu süre sonunda askosporların

tamamının inaktive olduğu belirlenmiştir. 80°C'lik ısı işleminde 5-10 ve 15-20 dakikalar arasında canlı kalan askospor sayısında ciddi bir değişim olmamıştır. 85°C'de başlangıçtaki konsantrasyon 5 dakika sonunda yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. 90°C'de askosporlar 10 dakikaya kadar direnç gösterebilmiştir.

Çizelge 2. *Paecilomyces variotii* MA 02'nin farklı sıcaklık ve sürelerde belirlenen ısı direnci.

Askospor (kob/ml) Sıcaklık (°C)					
Zaman (dak.)	80	85	90	95	100
0	8x10 ⁵	10 ⁶	9x10 ⁵	1,1x10 ⁶	1,2x10 ⁶
5	9,2x10 ³	6,3x10 ³	3,4x10 ³	-	-
10	2,4x10 ³	3,5x10 ²	2x10 ²	-	-
15	4,1x10 ²	1,8x10 ²	-	-	-
20	2,3x10 ²	6x10	-	-	-
30	5	2x10	-	-	-

Sonuç

Birçok antimikrobiyel katkı maddeleri ile ısı uygulamalarına dirençlilik gösterebilen ısıya dayanıklı küfler diğer küfler arasında gıda sanayi açısından özel bir öneme sahiptir. Bu bakımdan; ısıya dayanıklı küflerin, ürettikleri metabolitler ve mikotoksinler ile halk sağlığına verdikleri zarar ve gıdaların bozulmalarından kaynaklanan ekonomik kayıplar bu konuyu çok önemli ve hassas bir mevzu haline getirmiştir.

Kaynaklar

- Anonymous, 1998. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods 6. Blackie Academic and Professional, London.
- Anonymous, 2001. American Public Health Association (APHA). Compendium Methods for the Microbiological Examination of Foods. Beuchat, L.R., Pitt, J.I. (Eds), Detection and Enumeration of Heat-Resistant Molds, 4th Edition (pp. 217-222) Washington DC.
- Aydın, A., M.E Erkan ve B.H. Ulusoy, 2005. Isıya Dayanıklı Küflerin Gıda Sanayi ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi, Yıl:4 Sayı:7, Bursa Gıda Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa.
- Baggerman, W.I. and R.A. Samson, 1988. Heat resistance of Fungal Spores. In Samson, R.A., Hoekstra, E.S. (eds.), Introduction to Food-Borne Fungi (3rd ed, pp. 262-267). Centraalbureau voor Schimmelcultures: Baarn, The Netherlands.
- Beuchat, L.R. and J.I. Pitt, 2001. Detection and Enumeration of Heat Resistant Molds. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Eds: Downes, F.P., Ito, K.) 4th ed., APHA pp. 217-222.
- Beuchat, L.R. and S.L. Rice, 1979. *Bysoochlamys* spp. and their importance in processed fruits. Adv. in Food Res. 25: 237-288.
- Butz, P., S. Funtenberger, T.Haberdzitl and B. Tauscher, 1996. High pressure inactivation of *Bysoochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. Lebens. Wiss. Technol. 29: 404-410.
- Erbakan, N. 1989. Derinin Mantar Hastalıkları. Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1. Baskı. Ankara, 1-13.
- Harrigan, W.F., M.C. McCance and E. Margaret, 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Pres. London and New York. 208-269.
- Jesenská, Z., E.Piecková and J. Sepitkova, 1991. Thermoresistant Propagules of *Neosartorya fischeri*; some ecologic considerations. J. Food Prot. 54: 582-584.
- Kotzekidou, P. 1997. Heat resistance of *Bysoochlamys nivea*, *Bysoochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. J. Food Sci. 62: 410-412, 437.
- Ku, M.A. and Y.D. Hang, 1994. Lypolytic enzyme activity of *Bysoochlamys fulva*. Lebensm. Wiss. Tech. 27: 390-391.
- Pitt, J.I. and A.D. Hocking, 1997. Fungi and Food Spoilage. 2nd Edition. Aspen publishers. Gaithersburg, MD. (Cambridge University).
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra, O.Filtborg and J.C. Frisvad, 2002. Introduction to Food and Airborne Fungi, 6 Edition. Published by Centraalbureau voor Schimmelcultures, Wageningen, Netherlands.
- Ugwuanyi, J.O. and J.A.N. Obeta, 1991. Incidence of heat-resistant fungi in Nsukka, Southern Nigeria. Int. J. Food Microbiol. 13: 157-164.