



Araştırma Makalesi

www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs
Selçuk Üniversitesi
Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi
26 (1): (2012) 77-83
ISSN:1309-0550



Nisin Üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Beyaz Peynirde *Listeria monocytogenes*'in Gelişiminin Engellenmesi Üzerine Etkisi

Kübra KASAROĞLU¹, Nefise AKÇELİK², Pınar ŞANLIBABA³, Mustafa AKÇELİK^{1,4}

¹Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara/Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara/Türkiye

³Ankara Üniversitesi, Kalecik Meslek Yüksek Okulu, Ankara/Türkiye

(Geliş Tarihi: 22.01.2012, Kabul Tarihi: 22.02.2012)

Özet

Bu çalışmada dört farklı *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşu (LL2, LL23, LL9 ve LL27) kullanarak üretilen beyaz peynirlerde 90 gün boyunca *Listeria monocytogenes*'in kalıcılığı incelenmiştir. Farklı suşlar kullanarak üretilen peynirler arasında toplam bakteri sayısı ve pH gelişimi açısından önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 suşu kullanılarak üretilen peynirdeki laktik asit düzeyi diğer peynirlerle oranla daha düşük saptanmıştır. Öte yandan beyaz peynir örneklerinde 90 günlük depolama sonunda sadece *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun *Listeria monocytogenes*'in gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Beyaz peynir, *L. lactis* subsp. *lactis*, nisin, *Listeria monocytogenes*

The Effect of Nisin Producer Strain of *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 on the Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Beyaz Cheese

Abstract

The persistence of *Listeria monocytogenes* in white brined cheese made using four three wild-type strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (namely LL2, LL9, LL23 and LL27) were monitored for a period of 90 days. No marginal difference was noted among the wild type strains in terms of total bacteria counts and pH development. However in the cheese made using *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 the development of lactic acid was more limited compared to the other cheeses. On the other hand, it was determined that only the strain LL27 was inhibited *Listeria monocytogenes* in white-brined cheeses at the end of 90 days period.

Key Words: Beyaz cheese, *L. lactis* subsp. *lactis*, nisin, *Listeria monocytogenes*

Giriş

Gıdalardan *Listeria*'nın izolasyonu ve idenfikasyonu yöntemlerindeki ilerlemeler ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insanlarda önemli gıda kaynaklı enfeksiyon ve zehirlenme etkenlerinden birinin de *Listeria monocytogenes* enfeksiyonları olduğunu ortaya koymuştur (Schlech, 1988; Farber ve Peterkin, 199; Reij ve ark., 2004). Psikrofil bir mikroorganizma olan *Listeria monocytogenes* buzdolabı sıcaklığında gelişebilmesi nedeniyle öne çıkan bir bakteridir. Genellikle sporatik olarak seyreden listeriozis etkeni olan *Listeria*'nın doğada yaygın olarak bulunması ve toprak kökenli olması gıdalardaki kontaminasyon riskini artırmaktadır (Seeliger ve Jones, 1986; Cleveland ve ark., 2001). Listeriozis enfeksiyonları hayvansal gıdalar arasında özellikle *Listeria monocytogenes* ile kontamine peynir tüketiminden kaynaklanmaktadır. Bu kontaminasyonun peynir yapımı, olgunlaştırılması, depolanması ya da nakledil-

mesi aşamalarında, başta sıcaklık ve pH olmak üzere değişik koşullara bağlı olarak gerçekleştiği, *Listeria*'nın değişen düzeylerde canlı kalabildiği ve bu ürünlerin listeriozis yönünden potansiyel sağlık riski oluşturduğu saptanmıştır (Maisnier-Patin ve ark., 1992; Bersot ve ark., 2001).

Biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, biyokoruyuculardan faydalanma oranları her geçen gün artmaktadır. Biyokoruma yöntemleriyle hem gıdanın depolama ömrü hem de güvenilirliği artmaktadır. Biyokoruma yöntemlerinden birisi de laktik asit bakterileri veya bunların ürettiği oldukları antimikrobiyel bileşiklerin kullanılmasıdır. Laktik asit bakterileri bu amaç doğrultusunda starter kültür, yardımcı kültür veya koruyucu kültür olarak gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmuşlardır. Laktik asit bakterileri organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyel enzimler, alkol, diasetil, asetaldehit, reuterin, karbondioksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyel aktiviteye

⁴Sorumlu Yazar: akcelik@science.ankara.edu.tr

sahip metabolitlerin biri veya birkaçını üreterek diğer mikroorganizmaların gelişimini önlemektedirler (O'Sullivan ve ark., 2002; Carminati ve ark., 2004).

Bakteriler tarafından üretilen protein yapısında antimikrobiyel bileşikler olan bakteriyosinler, duyarlı bakterilere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler. Doğal kaynaklı olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın gıda kaynaklı bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler önemli biyokoruyucular arasında yer almaktadırlar. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri mikrobiyel gıda bozulmalarını önleme ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları inhibe etme potansiyeline sahiptirler. Gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin verilen ve ilk ticari kullanım olanağı bulunan bakteriyosin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (E234). Oldukça geniş bir etki spektrumuna sahip olan nisin, FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (İnsan ve hayvan tüketiminde güvenilir ajan) metabolitler kapsamına alınmış ve gıda koruma ajanı olarak belirlenmiştir (Nel ve ark., 2004). Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıdalarda kullanımına onay verilmiş tek bakteriyosindir (Bouttefroy ve Milliere, 2000; Nel ve ark., 2004). Bugün Türkiye de dahil olmak üzere birçok ülkede gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. 50 Avrupa ülkesi yanında Çin'de ve Amerika'da gıdaların korunması amacı ile nisin kullanılsa da üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle, gıda üreticileri tarafından sınırlı düzeyde tercih edilmektedir (Cleveland ve ark., 2001; De Vuyst ve Leroy, 2007; Bizani ve ark., 2008).

Yüksek düzeyde antimikrobiyel aktivitesi yanında, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı gösterdiği stabilite, nisinin gıda koruma ajanı olarak kullanımını öne çıkarmaktadır. Saflaştırılmış ya da yarı saflaştırılmış nisinin doğrudan gıdalara ilavesi yanında, fermente gıdaların üretiminde nisin üreticilerinin starter kültür olarak kullanımını üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bu çalışmada dört farklı *L. lactis* subsp. *lactis* suşu (LL2, LL23, LL9 ve LL27) kullanılarak üretilen beyaz peynirlerde 90 gün boyunca proteoliz ve lipoliz düzeyi ile *Listeria monocytogenes*'in inhibisyonu incelenerek söz konusu suşların endüstriyel kullanım potansiyellerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çiğ Süt

Peynir yapımı için Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği (İkizce/Haymana) Hayvancılık İşletmesi'nden Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Araştırma ve Uygulama İşletmesi'ne getirilen inek sütü kullanılmıştır.

Beyaz Peynir

Beyaz peynir Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır. Araştırmanın ilk bölümü için dört farklı peynir üretilmiştir. Kontrol peyniri, endüstriyel düzeyde peynir yapımı için kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* LL2 (PK1, bakteriyosin üreticisi olmayan) suşu ile üretilmiştir. Diğer üç çeşit peynirin yapımında ise sırasıyla *L. lactis* subsp. *lactis* LL9 (laktisin 481 üreticisi), *L. lactis* subsp. *lactis* LL23 (laktisin 3147 üreticisi) ve *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 (nisin üreticisi) suşları kullanılmıştır. Araştırmanın ikinci bölümünde ise starter kültür olabilme potansiyelleri incelenen *L. lactis* subsp. *lactis* LL27, LL23 ve LL9 suşlarının peynirlerde *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'ün gelişimini engelleme yeteneğini incelemek üzere beş farklı peynir üretilmiştir. *L. lactis* LL27, LL23 ve LL9 suşlarının tek tek kullanıldığı üç peynir çeşidine ilave olarak iki adet kontrol peyniri üretilmiştir. Kontrol olarak starter kültür ilave edilmiş ancak *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş ve bakteriyosin üretmeyen LL2 suşu ile birlikte *L. monocytogenes* ilave edilerek üretilen peynirler kullanılmıştır. Tüm sütlere peynir yapımı sırasında 10^7 kob/g oranında *L. monocytogenes* ATCC 7644 inoküle edilmiştir.

Laboratuvara getirilen sütler kaba süzme işlemine tabi tutularak tüy ve benzeri partiküllerden arındırılmıştır. Sütler sürekli karıştırılarak 68 °C'de 10 dakika ısıl işleme tabi tutulmuş ve pastörizasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yaklaşık 32 °C'ye soğutulan süt, 10'ar litrelik gruplara ayrılmıştır. Mayalama kazanlarına aktarılan sütlere iyonik kalsiyum dengesini yeniden sağlamak için % 0,02 oranında kalsiyum klorür (CaCl₂) eklenmiştir. Ardından % 1,5 oranında starter kültür ve/veya $\sim 10^7$ kob/g düzeyinde *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ilave edilip 60 dakika bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra 90 dakikada pıhtı kesim olgunluğu elde edilebilecek şekilde ticari peynir mayası (32±1°C) ilavesi gerçekleştirilmiştir. Mayalama süresi sonunda pıhtı bıçaklar yardımıyla yaklaşık 0,5-1,0 cm 'lük parçalar halinde kesilmiş ve peynir altı suyunun ayrılması için 15 dakika kadar beklenmiştir. Ardından içinde cendere bezi bulunan kalıplara aktarılmış ve kırk beş dakika kadar kendi halinde süzülme bırakılmıştır. Sonra kademeli olarak arttırılan ağırlıklar (0,5 kg'dan 1,5 kg' kadar) kullanılarak baskılı süzme işlemine alınmıştır. Baskı işleminin bitiminden sonra teleme 8 cm x 8 cm x 8 cm'lik boyutlarda kesilmiştir (Anonymous, 1983). Kesilen peynir kalıpları % 12 konsantrasyonlarındaki salamuralara alınmış ve steril plastik kutulara koyularak 4 °C de çalşıma bitimine kadar saklanmıştır.

Bakteriyosin Aktivite Testi

L. lactis subsp. *lactis* suşlarında bakteriyosin üretim özelliğinin belirlenmesinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bakteriyosin üretim özelliğinin tanısında kullanılan birinci yöntemde, M17 sıvı besiyerinde

geliştirilen aktif *L. lactis* subsp. *lactis* suşları öze yardımıyla M17 agar ortamlarına sürme ekim yapılmış ve bakteriler bu ortamlarda 30 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden, steril kürdan aracılığıyla M17 agar ortamına nokta ekim yapılmış ve 30 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uygun besiyeri ve inkübasyon sıcaklığında 18 saat geliştirilen indikatör bakterilerden *L. monocytogenes*'den 100 µL alınarak, % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (TSA) üzerine aktarılmış ve bu ortamlar M17 agar besiyerinde geliştirilen laktokok kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petri kutuları *L. monocytogenes* gelişimi için 37 °C 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda, laktokok suşlarının *L. monocytogenes*'e karşı oluşturduğu inhibisyon zonları incelenmiştir (Van Belkum ve ark., 1989).

L. lactis subsp. *lactis* suşlarının bakteriyosin üretme yeteneğinin belirlenmesinde ikinci yöntem olarak kuyucuk yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, test edilecek *L. lactis* suşları M17 sıvı besiyerinde 30 °C'de 18 saat süreyle geliştirilmiş ve santrifüj edilmiştir (6000 g'de 15 dk). Santrifüj işleminden sonra üst sıvı, membran filtre (0,45 µm gözenek çaplı) kullanılarak sterilize edilmiştir. İndikatör bakteri içeren agar ortamlarında kuyucuklar oluşturulduktan sonra hazırlanan üst sıvıdan 100 µL aktarılmış ve 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda laktokok suşlarının oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir (Geis ve ark., 1983).

Kimyasal Analizler

Peynir örneklerinin toplam kurumadde (Anonymous, 2001), titrasyon asitliği (Anonymous, 2006), yağ (Anonymous, 1978), ve tuz içeriği (Anonymous, 1988) belirlenmiştir. pH ölçümlerinde pH metre (Model Kent EIL, 7045/46) kullanılmıştır.

Beyaz Peynir Örneklerinde Bakteri Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Mikrobiyel Yöntemler

Mikrobiyolojik analizler için, analiz edilecek beyaz peynir örneğinden 10 g alınıp 90 mL steril dilüsyon sıvısı (% 2 sodyum sitrat çözeltisi) ile karıştırılmıştır. Sonra karışım stomacherde (Lab Blender 80; Seward Medical, London, England) 3 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Daha sonra steril % 0.9 sodyum klorür içerisinde dilüsyonlar hazırlanarak, Laktokok suşları M17 agar ortamına, *L. monocytogenes* ise Palcam Listeria Selektif agara (Merck) steril pipetlerle (100 µL) aktarılmıştır. Daha sonra dilüsyon oranları dikkate alınarak 1 g peynir örneğindeki mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Benech ve ark., 2002). Bu sayımlar her bir bakteri için üç paralelli olacak şekilde yürütülmüştür.

L. monocytogenes'in sayımı için; yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan peynir örneklerinden seri dilüsyonlar yapılarak Listeria selektif agara inoküle edilmiştir. 37 °C de 48 saat inkübasyondan sonra bakteri sayımları

yapılmıştır. Seyreltme oranları dikkate alınarak 1 gram peynir örneğindeki mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Benech ve ark., 2002). Palcam agarda istenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek için besiyerine eklenen selektif katkı maddesinin içinde polimiksin B sülfat, sefasidim ve akriflavin bulunmaktadır. Eklenen antibiyotikler rakabetçi florayı baskılayarak etkisini gösterir. *L. monocytogenes* besin ortamında bulunan eskülini glukoz ve eskülinetine parçalayarak ortamda bulunan Fe-(III) iyonları ile kompleks oluşturur ve ortamın renginin siyaha dönmesine neden olur (Griffiths, 1989).

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

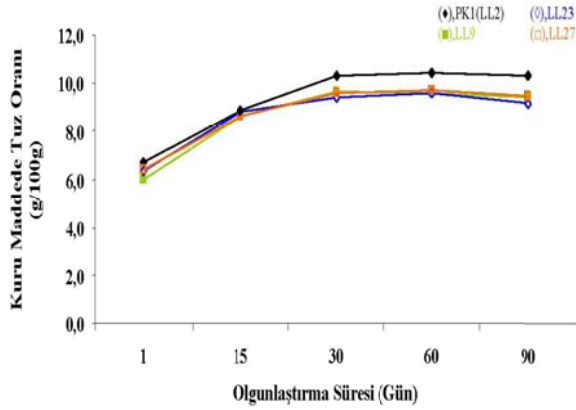
Peynirlerin Kuru Madde, Yağ, pH ve Titrasyon Asitliği Karakteristikleri

Araştırmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 (nisin üreticisi), LL9 (laktisin 481 üreticisi), ve LL23 (laktisin 3147 üreticisi) suşlarının peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılıp kullanılmayacağı, bu suşların ilavesi ile üretilen peynirlerin karakteristikleri incelenerek saptanmıştır. Bu amaçla yukarıda ifade edilen üç suş yanında, bakteriyosin üreticisi olmayan LL2 (PK1) suşu ile üretilen peynir kontrol olarak kullanılmıştır. Üretilen peynirlerin kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik özellikleri olgunlaşma süresi (90 gün) boyunca izlenmiştir.

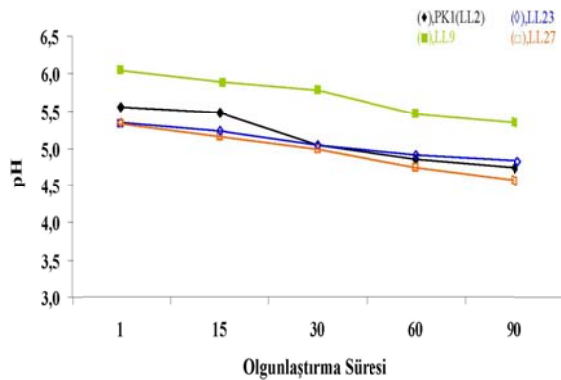
Üretilen peynirlerin tümünde toplam kurumadde oranı olgunlaşma süresince belirgin bir değişme göstermemiştir. Olgunlaşmanın ilk gününde tüm deneme peynirleri için toplam kuru madde oranı 39,54-40,14 g/100 g arasında bulunmuştur. Bu oranlar 90 gün olgunlaştırma süresi sonunda 40,68-40,85 g/100 g arasında tespit edilmiştir. Benzer şekilde kurumadde-deki yağ içerikleri de olgunlaştırma süresince sabit kalmıştır. Ancak, olgunlaştırma süresinin ilk iki haftasında kuru maddeye tuz geçişi hızlı bir şekilde gerçekleşmiş, daha sonra ise yavaşlayarak devam etmiştir (Şekil 1)

Deneme peynirlerinde pH, olgunlaşma süresi boyunca düşüş göstermiştir (Şekil 2). pH düzeyleri bakımından kontrol peyniri (PK1) ile LL23 kullanılarak üretilen peynirler arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. En yavaş pH gelişimi LL9 peynirinde, en hızlı pH gelişimi ise LL27 peynirinde gerçekleşmiştir. pH değerlerindeki varyasyon ile paralel bir şekilde, % laktik asit olarak ifade edilen titrasyon asitliği de tüm peynirlerde 90 gün olgunlaştırma süresi boyunca artış göstermiştir (Şekil 3). Olgunlaşmanın erken aşamalarında (ilk iki hafta) titrasyon asitliği, kontrol peynir örneği ve LL9 kullanılarak üretilen peynirde, diğer deneme peynirlerinden önemli oranda düşük bulunmuştur. Kontrol peynir örneğinde titrasyon asitliği olgunlaşma süresince doğrusal bir şekilde artış göstermiştir. Bununla birlikte LL9 peynirinde titrasyon asitliğinde sınırlı bir artış belirlenmiştir. LL27 peynirinde ilk 30 gün süresince titrasyon asitliği çok yavaş bir artış göstermiştir. Bu bulgu, peynirde kalıntı haldeki laktozun LL27

tarafından yavaş metabolize edildiğini kanıtlamaktadır. Nisin üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktöz metabolizmasının limitli olduğu görüşünü doğrulayan bu bulgular, özellikle yavaş olgunlaştırılan peynirler için söz konusu suşun ideal bir starter suşu olabileceğine işaret etmektedir (Atasoy ve ark., 2008). Bunun aksine LL23 peynirinde titrasyon asitliği artışı ilk 60 gün boyunca aşamalı olarak artmış, 60-90 gün arasında ise sabit kalmıştır.

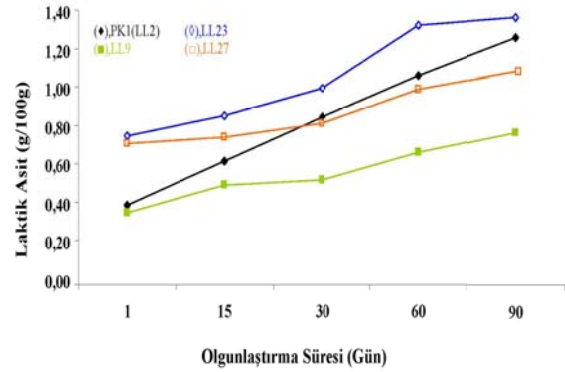


Şekil 1. Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince kuru maddelerindeki tuz konsantrasyonunda meydana gelen değişimler



Şekil 2. Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince pH değerlerinde meydana gelen değişimler.

Peynirlerin toplam kurumadde, kurumadde yağ oranları, salamuradan tuz geçişi, pH ve titrasyon asitliği gelişim özelliği dikkate alındığında; denemede kullanılan tüm bakteriyosin üreticisi suşların, beyaz peynir üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Zira olgunlaştırma süresi boyunca bu özelliklerin belirli sınırlar içerisinde gelişimi, peynir aroma ve tat bileşiklerinin de arzu edilen düzeylerde olacağına işaret etmektedir (Urbach, 1995; Morales ve ark., 2003; Özkalp ve ark., 2007; Atasoy ve ark., 2008).



Şekil 3. Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince titrasyon asitliği değerlerinde meydana gelen değişimler

Peynirlerde Olgunlaşma Süresince Starter Bakteri Sayısında Meydana Gelen Değişimler

Peynirlerin olgunlaştırma süresi (90 gün) boyunca, ilave edilen starter bakteri sayısında meydana gelen değişimler Şekil 4'de verilmiştir. Hiçbir peynir örneğinde, toplam olgunlaştırma süresi boyunca starter bakteri oranında önemli bir değişim meydana gelmemiştir. İlk günde peynir örneklerinde canlı bakteri sayısı 7.97 (PK1) ile 8.78 (LL9 peyniri) log₁₀ kob/g arasında saptanmıştır. Olgunlaşmanın 30. ve 60. günlerinde *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 peynirinde (LL27 peyniri) canlı bakteri sayısı diğer peynirlerden yaklaşık 1,5 log yüksek bulunmuştur. Kontrol peynir örneği PK1' de ise canlı bakteri sayısı, özellikle olgunlaşmanın erken aşamalarında, en düşük düzeyde belirlenmiştir. Bu durum büyük olasılıkla kontrol peynirinde kullanılan laktokok suşunun düşük tuz toleransından ileri gelmektedir. Ancak 90 gün sonunda peynirlerdeki laktokok sayıları arasında istatistiki açıdan ($p < 0,05$) önemli bir farklılık tespit edilmemiştir.

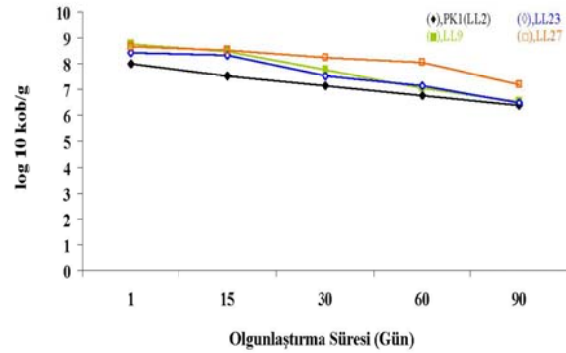
Peynir olgunlaştırma süresi boyunca, beyaz peynirlerde starter kültür aktivitesini engelleyen en önemli etken salamuradaki tuz oranıdır (Guo ve ark., 1997). Bu sorunun çözümünde en ideal yaklaşım, tuz toleransı yüksek starter kültür suşlarının tanımlanması ve kullanımınıdır. Bu açıdan bakıldığında en ideal starter kültür suşu olarak nisin üreticisi LL27 suşu öne çıkmaktadır. Ancak LL9 ve LL23 suşları da tuz toleransları bakımından potansiyel starter kültür bileşenleri olarak değerlendirilecek nitelikleri taşımaktadır.

Starter Kültür Suşlarının Peynir Üretiminde *Listeria monocytogenes*'in İnhibisyonu Üzerine Etkisi

Starter kültür suşu potansiyelleri incelenen *L. lactis* LL27, LL23 ve LL9 suşlarının peynirlerde *L. monocytogenes*'in gelişimini engelleme yeteneği, 10^7 kob/g oranında *L. monocytogenes* ilave edilen peynir örnek-

lerinde 90 gün boyunca izlenmiştir (Tablo 1). Kontrol olarak starter kültür ilave edilmemiş ancak *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş ve bakteriyosin üretmeyen LL2 suşu ile birlikte *L. monocytogenes* ilave edilerek üretilen peynirler kullanılmıştır. Tüm peynir örneklerinde 10^7 kob/g olarak inoküle edilen *L. monocytogenes* sayısı, olgunlaşmanın 1., 3., 10., 20., 30., 40., 50., 60., 70., 80. ve 90. günleri boyunca izlenmiştir. Sadece *L. monocytogenes* ilave edilen peynir örneğinde, canlı *L. monocytogenes* sayısı olgunlaşmanın 20-40. günleri arasında $\sim 10^8$ kob/g oranına ulaşmış 40-90. günler arasında ise başlangıç konsantrasyonuna ($\sim 10^7$ kob/g) gerilemiştir. LL9 ve LL23 suşları kullanılarak üretilen peynirlerde *L. monocytogenes* sayısı ilk 20 günde 10^4 kob/g seviyesine kadar gerilemiş, 20-40. günler arasında 10^6 kob/g düzeyine ulaşmış ve 90 gün boyunca istatistikî açıdan önemli bir değişme göstermemiştir ($p < 0,05$). Nisin üreticisi LL27 kullanılarak üretilen peynirlerde ise LL9 ve LL23 peynirlerinde olduğu gibi *L. monocytogenes* sayısı ilk 20 günde 10^4 kob/g, 30-50. günlerde 10^3 kob/g, 60-70. günler arasında 10^2 kob/g, 80. günde ~ 20 ve 90. gün sonunda ~ 10 seviyesine gerilemiştir (Tablo 1). Bu veriler peynir üretim süresinde patojenin engellenmesinde kullanışlı olan tek suşun nisin üreticisi *L. lactis* LL27 suşu olduğuna işaret etmektedir. Laboratuvar koşullarında *L. monocytogenes* üzerine inhibisyon etkisi belirlenen laktisin 481 (LL9) ve laktisin 3147 (LL23) üreticisi suşların (Akkoç ve ark., 2009), peynir üretiminde bu etkilerini sürdürememesi, bu süreçlerin laktisin üretimini engellenmesi ile açıklanabilir. Bu etki büyük bir olasılıkla laktisin üretimi üzerine tuz konsantrasyonunun letal etkisinden kaynaklanmaktadır. Benzer etkiler değişik araştırmacılar tarafından nisin üretimi için de tanımlanmıştır (De Vuyst ve Vandamme, 1993; Amiali ve ark., 1998; Pongtharangkul ve Demirci, 2006). Ancak LL27 suşunun bilinen nisin

üreticilerden temel farklılığı belirli bir konsantrasyona (% 4) kadar ortam tuz içeriğinin nisin üretimini teşvik etmesidir (Akkoç ve ark., 2009). Yüksek tuz toleransı gösteren bu suş, bu nedenle peynir üretiminde *L. monocytogenes*'in inhibisyonu üzerinde güçlü bir etkinlik göstermiştir.



Şekil 4. Peynirlerin 90 gün olgunlaştırma süresince starter bakteri sayısında meydana gelen değişimler

Nisinin Gram pozitif bakteriler yanında fiziksel ya da kimyasal ajanlar kullanılarak zayıflatılmış Gram negatif bakterilere karşı da etkinlik gösterdiği saptanmıştır (Wirawan ve ark., 2006; Papagianni ve ark., 2007; Şimşek ve ark., 2009). Bu nedenle özellikle salamurada olgunlaştırılan peynirlerde yüksek tuz oranı ve asitlik gelişimi sonucu zayıflatılacak Gram negatif bakterilere karşı LL27 suşunun da etkinlik göstereceği öngörülebilir.

Tablo 1. Olgunlaşma süresi boyunca peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* sayısındaki (kob/g) değişimler

Depolama Süresi (Gün)	Peynir Örnekleri				
	Tek başına <i>Listeria</i> sayısı	LL2 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	LL9 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	LL23 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı	LL27 Peynirindeki <i>Listeria</i> sayısı
0	$1,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
1	$2,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
3	$3,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
10	$5,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$5,1 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$
20	$6,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
30	$7,4 \times 10^8$	$4,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$3,8 \times 10^3$
40	$7,1 \times 10^8$	$6,1 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$
50	$1,6 \times 10^7$	$7,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3$
60	$1,3 \times 10^7$	$5,4 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$
70	$1,3 \times 10^7$	$4,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^2$
80	$1,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	< 20
90	$1,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	< 10

Kaynaklar

Akkoç, N., Özden, B., Tan, B.G. and Akçelik, M., 2009. The Role of stj Fimbrial Operon in the Intes-

tinal Persistence of *Salmonella* Typhimurium in Mice. *Biologia*. 64:859-863.

Amiali, M.N., Lacroix, C. and Simard R.E., 1998. High nisin Z production by *Lactococcus lactis*

- UL719 in whey permeate with aeration. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:887–894.
- Anonymous, 1978. Determination of Fat in Cheese. *Turkish Standards Institution, TS 3046*, Ankara.
- Anonymous, 1983. Beyaz peynir TS591 UDK637-363 *Türk Standartları Enstitüsü*.
- Anonymous, 1988. I.D.F. Determination of salt content, Standard 12 B. Brussels: *International Dairy Federationood ingredient. Federal Register*, 53,11247.
- Anonymous, 2001. I.D.F. Reference analysis for total solids (AOAC Oven dried method), IDF 20 1-2. Brussels: *International Dairy Federation*.
- Anonymous, 2006. White Cheese Standard. *Turkish Standards Institution, TS 591*, Ankara.
- Atasoy, A.F., Yetismeyen, A., Turkoglu, H. and Ozer, B., 2008. Effects of heat treatment and starter culture on the properties of traditional Urfa cheese (a white-brined Turkish cheese) produced from bovine milk. *Food Control*. 19:278-285.
- Benech, R., O. Kheadr, E.E., Laridi, R. Lacroix, C. and Fliss, I., 2002. Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar Cheese by Addition of Nisin Z in Liposomes or by In Situ Production in Mixed Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3683-3690.
- Bersot, L.S., Landgraf, M. Franco, B.D.G.M. and Destro M.T., 2001. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. *Meat Sci.* 57:13-17.
- Bizani, D., Morrissy, J.A.C., Dominguez, A.P.M. and Brandelli, A., 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *Intr. J. Food Microbiol.* 121: 229–233.
- Bouttefroy, A. and Milliere, J.B., 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the re-growth of bacteriocin resistant cells of *L.monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. of Food Microbiol.* 62: 65-75.
- Carminati, D., Perrone, A., Giraffa, G., Neviani, E. and Mucchetti, G., 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. *Food Microbiology.* 21:801–807.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71:1–20.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:17–22.
- De Vuyst, L. and Leroy, F., 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology.* 13: 194–199.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol., Reviews.* 45: 476-511.
- Geis, A., Singh, J. and Teuber, M., 1983. Potential of lactic Streptococci to produce bacteriocin. *Appl. and Environ. Microbiol.* 45:205-211.
- Griffiths, W., 1989. “*Listeria monocytogenes*.: Its importance in the dairy industry” *J. Sc. Food Agric.* 47:133–158.
- Guo, M.R., Gilmore, J.K.A. and Kindstedt, P.S., 1997. Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 80:3092-3097.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R. and Richard, J., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait.* 72:249-263.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P. and Núñez, M., 2003. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe’s milk cheese. *International Dairy Journal.* 13:201-209.
- Nel, S., Lues, J.F.R., Buys, E.M. and Venter, P., 2004. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. *Meat Science.* 66:667-674.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 84:593–604.
- Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P. and Akçelik, M., 2007. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Lait.* 87:521-534.
- Papagianni, M., Avramidis, G. and Filiouis, G., 2007. Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Enzym Microb. Technol.* 40:1557–1563.
- Pongtharangkul, T. and Demirci, A., 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnol Prog.* 22:217–224.
- Reij, M.W. and Den Aantrekker, E.D., 2004. ILSI European Risk Analysis in Microbiology Task

- Force. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* 91:1–11.
- Seeliger, H. and Jones, D., 1986. “Genus *Listeria* pirie” In Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology 9th Ed. P. Sneath, N. Mair, M. Sharpe and J. Holt, *The Williams and Wilkins Co., Baltimore.* 1235-1245.
- Şimşek, Ö., Çon, A.H., Akkoç, N., Saris, P.E.J. and Akçelik, M., 2009. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:481–490.
- Urbach, G., 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal.* 5:877-903.
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. and Venema, G., 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology.* 55:1187–1191.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W. and Tagg J.R., 2006. Molecular characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol.* 72:1148–1156.