

KOPANİSTİ PEYNİRİNİN FERMENTASYONUNDA ROL OYNAYAN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI*

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN THE FERMENTATION OF KOPANISTI CHEESE

Şeniz KARABIYIKLI¹, Mehmet KARAPINAR

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

Geliş tarihi: 14.08.2006

ÖZET : Kopanisti peyniri; günümüzde endüstriyel boyutta mevcut olmayan ve yapımı yörelere göre farklılık göstermekle birlikte, temel olarak lорun doğal fermentasyonu sonucu elde edilen, keskin kokulu, acımsı lezzette, kremsi yapıda, yumuşak ve tuzlu bir süt ürünüdür. Bu çalışmada, Kopanisti peynirinin fermentasyonunda rol oynayan laktik asit bakterileri, kuf ve mayaların fermentasyon sırasındaki sayısal değişimini takip etmek, fermentasyonun farklı aşamalarından izole edilen laktik asit bakterilerini tanımlamak ve elde edilen son ürünlerin Türk Gıda Kodeksi'nde yer alan peynir standartlarına uygunluğunu saptamak amaçlanmıştır. Fermentasyonun 0., 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde Çeşme'de ticari olarak üretim yapan küçük ve yöresel bir işletmeden ve laboratuarda üretilen peynirlərden örnekler alınmıştır. Yapısal özellikler temel alınarak yapılan analizler sonucunda; izole edilen laktik asit bakterileri, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus vaginalis* ve *Lactobacillus viridescens* olarak tanımlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kopanisti peyniri, laktik asit bakterileri, tanımlama

ABSTRACT : Kopanisti cheese which is produced from whey curd is a kind of soft and salty fermented dairy product has strong odour with spicy taste and creamy structure. However, its process shows local differences and it is not produced on industrial basis. In this study it is aimed to follow the differences in the numbers of lactic acid bacteria, moulds and yeasts during fermentation and to identify the lactic acid bacteria which play role in fermentation of Kopanisti cheese. Additionally in order to determine the microbial quality of end products microbiological analyses given in Turkish Food Codex were carried out. Samples were taken from the products, at 0, 1, 7, 14, 21, 28 days of fermentation, which produced at a private small local plant in Çeşme and in our laboratory batch. Isolates were named as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus vaginalis* and *Lactobacillus viridescens* on the basis of phenotypic identification.

Keywords: Kopanisti cheese, lactic acid bacteria, identification

GİRİŞ

Yunanca "dövülmüş, ezilmiş" anlamına gelen 'Kopanisti' kelimesinden adını alan Kopanisti peyniri, Ege'de İzmir – Çeşme ve Karaburun yöresine has bir peynirdir. Bu bölgelerin karşısında bulunan Yunan adalarında da üretilmektedir. Roquefort peynirini andıran bir tadı vardır ve sahip olduğu bu yoğun aroma ve acı tat sebebiyle, belli bir tüketici kesimine hitap etmektedir. Önceleri Yunanistan'a ihraç edilen Kopanisti peynirinin üretimi giderek azalmıştır. Günümüzde bu peynir, yalnızca küçük çaplı işletmelerde yapılarak aile içinde tüketilmekte ve pek az yerli pazara sunulmaktadır (1).

* Bu çalışma Şeniz Karabiyıklı tarafından hazırlanan Yüksek Lisans Tezi'nin bir bölümündür. GIDA (2007) 32 (3): 143-149'da baskı hatası olan makalenin düzeltilmiş halidir.

¹ E-mail : senizkarabiyikli@mail.ege.edu.tr

Kopanisti peyniri yapımı yörelere göre farklılıklar göstermektedir. Bu farklı prosesler peynirin doğal mikroflorasını da etkilemektedir. Hammaddeden gelen doğal yük, temel farklılığı yaratmakla birlikte, uygulanan yöntem de florayı değiştirmektedir. Örneğin; Yunanistan'da uygulanan yöntem, peynirin küflendirilmesi esasına dayanırken; ülkemizde üretilen Kopanisti peynirinin küflendirilmesi gibi bir aşama yoktur. Fakat yüzeyde küflenme görülmese de, doğal fermentasyonun bir sonucu olarak küp sayısı yüksek seviyededir.

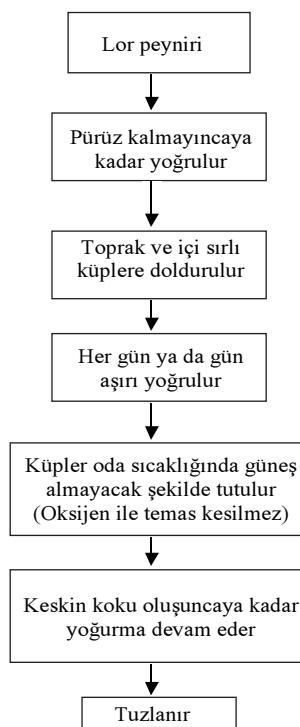
Kopanisti peynirinin mikrobiyolojisi üzerine yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Tzanetakis ve ark. (2), Kopanisti peynirinin mikrobiyolojisi üzerine yapmış oldukları çalışmalarında Kopanisti peynirinin mikroflorasına ait temel türleri ve bu türlere ait sayıları tespit etmeyi amaçlamışlardır. Elde etmiş oldukları bakteri izolatlarını; *Lactobacillus plantum*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. curuatus*, *L. xylosus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. viridescens*, *L. cellobiosus*, *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. faecium* subsp. *casseliflavus*, *S. durans*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Micrococcus luteus* olarak tanımlamışlardır.

Pek çok fermente ürünü olduğu gibi Kopanisti peyniri üretiminde de bir starter kültür oluşturulması, ürün kalitesinin artırılmasında ve proses optimizasyonunda önemli bir aşama olacaktır. Bu sebeple bu çalışmada Kopanisti peynirinin fermentasyonunda rol oynayan laktik asit bakterilerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

MATERIAL VE YÖNTEM

Materyal

Kopanisti peynirinin yapımında; Çeşme – İlica'da geleneksel olarak uygulanan yöntem izlenmiştir. Proses ile ilgili akım şeması Şekil 1'deki gibidir. Çeşme'de ticari olarak üretilen Kopanisti peynirinden ve aynı proses ile laboratuarda üretilen Kopanisti peynirinden fermentasyonun 0., 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde olmak üzere toplam 12 adet örnek toplanarak analize alınmış ve iki paralelli olarak çalışılmıştır.



Şekil 1. Kopanisti Peyniri Yapımında Kullanılan Proses Akım Şeması

Yöntem

pH Değerinin Saptanması: Fermentasyon sonunda elde edilen son ürünlerden 10 g örnek alınarak 100 ml destile suya aktarılmış ve stomacher cihazında 120 saniye homojenize edildikten sonra pH ölçümü pHmetre ile üçer paralelli olmak üzere ölçülmüştür. Elde edilen verilerin ortalamaları alınarak, her bir örneğe ait pH değeri hesaplanmıştır.

Mikrobiyolojik Analizler: Kopanisti peynirinin hammaddesi olan lordan (0.gün) fermentasyon başlangıcında (1. gün), fermentasyon boyunca (7., 14., 21. gün) ve fermentasyonu tamamlanmış son ürünlerden (28. gün) aseptik koşullarda örnekler alınmıştır. Örnekler soğuk koşullarda tutularak yaklaşık 2 saat içinde analize alınmıştır. 10 g örnek tartılarak 90 ml, %0,1'lik steril peptonlu suya (Difco) aktarılmış ve 90 saniye homojenize edilmiştir. Bu şekilde elde edilen 10^{-1} 'lik ilk dilüsyondan, desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan MRS Agar (Oxoid) besiyerine ve M17 Agar (Merck) besiyerine, çift tabaka dökme plak yöntemine göre iki paralelli olarak ve Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid) besiyerine dökme plak yöntemine göre, çift paralelli olarak ekimler yapılmıştır (3, 4). 30°C'de 48 – 72 saatlik inkübasyon süresini tamamlayan M17 ve MRS agar petrilerinde laktik asit bakteri sayısı, 30°C'lik inkübatoryerde 24 – 48 saat inkübasyona bırakılan DRBC agar petrilerinde ise maya – küp sayısı belirlenmiştir. 30 – 300 arasında koloni sayılan M17 Agar ve MRS Agar petri plaklarından koloni sayısının karekökü kadar sayıda koloni rasgele seçilmiştir (5). Seçilen kolonilerin saflıklarını kontrol için MRS Agar ve M17 Agar plaklarına çizgi ekim yöntemiyle (6) ekim yapılmış ve inkübasyon sonrası bu plaklardan alınan koloniler Gram boyama yöntemine (6) göre boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. Bu şekilde saflıklar tespit edilen izolatların MRS sıvı besiyerinde (Oxoid), 30°C'de geliştirilen 24 saatlik kültürlerine katalaz testi (6) uygulanmıştır. Gram pozitif ve katalaz negatif sonuç veren izolatlara, Hammes ve Vogel (7), Schillinger ve Lücke (8) ve Teuber'in (9) belirtikleri kriterlere göre biyokimyasal testler yapılmıştır. Bu doğrultuda izolatlara oksidasyon fermentasyon testi, glikozdan CO₂ oluşumu testi (6), arjinin hidrolizi testi (8), farklı sıcaklıklarda üreme testi (8) (10°C, 15°C ve 45°C), karbonhidrat fermentasyon testi (7, 8) (D-(+)-Galaktoz (Merck), D-(+)-Selibyoz (Fluka), D-(+)-Trehaloz (Fluka), D-(+)-Melibyoz (Fluka), D-(+)-Ksiloz (Merck), D-(+)-Melezitoz monohidrat (Fluka), L-(+)-Arabinoz (Merck), D-(+)-Riboz (Fluka), D-(+)-Rafinoz pentahidrat (Fluka), Maltoz monohidrat (Merck), Laktoz monohidrat (Merck)) ve laktik asit konfigürasyonunun belirlenmesi testi (4, 8) uygulanmıştır.

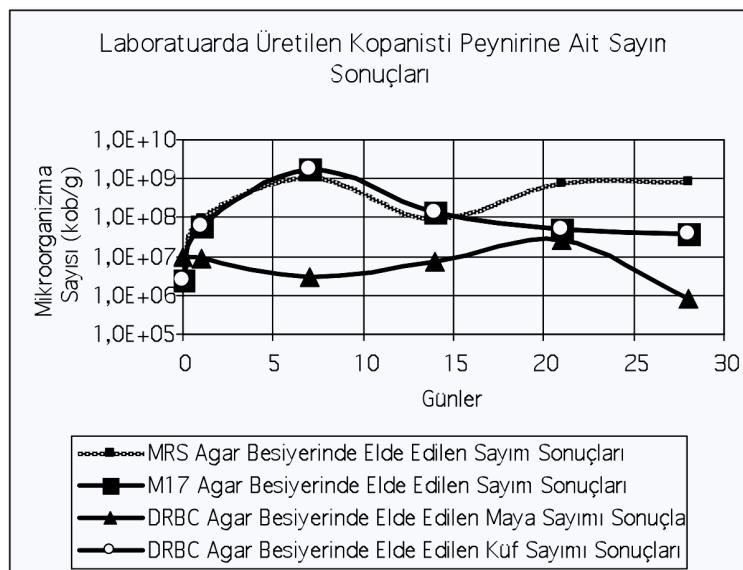
Türk Gıda Kodeksi, 2001–19 Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde yer alan peynir standartlarına uygunluğunu saptamak amacıyla hem laboratuarda yapılan, hem de Çeşme'den alınan fermentasyonu tamamlanmış Kopanisti peynirlerinin farklı bölgelerinden 5'er adet örnek alınmış ve bu örneklerde koliform, *Escherichia coli* (11), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* (11, 12) analizleri yapılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

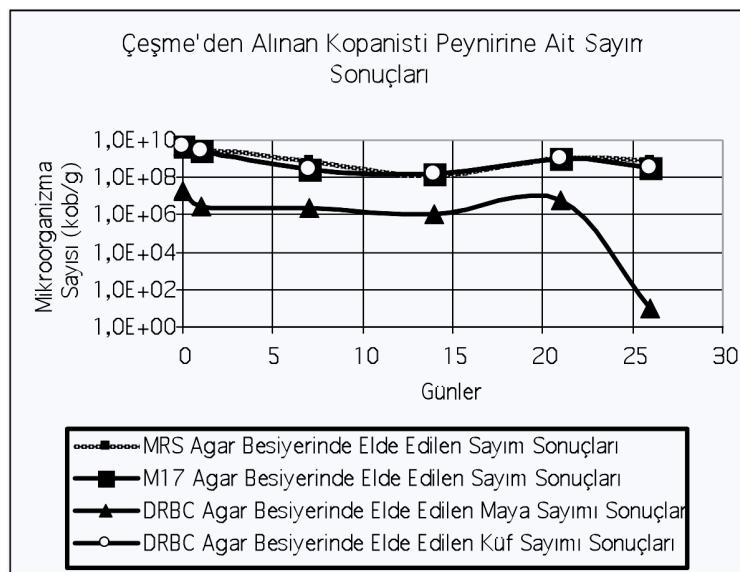
Fermentasyonun başlangıcından sonuna kadar laktik asit bakterilerinin, küp ve mayaların sayısal değişimi Çizelge 1 ve 2 ile Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir. Fermentasyon sonunda elde edilen ürünler homojenize edildikten sonra pH'ları, pH metre ile üçer paralelli olmak üzere ölçülmüştür. Elde edilen verilerin ortalamaları alınarak, laboratuarda üretilen Kopanisti peyniri için ortalama pH 4,66, Çeşme'den alınan Kopanisti peyniri için ise ortalama pH 5,44 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 1. Laboratuvara üretilen Kopanisti peynirine ait sayım sonuçları

Günler	MRS Agar (kob/g)	M17 Agar (kob/g)	DRBC Agar (Maya) (kob/g)	DRBC Agar (Küf) (kob/g)
0	$2,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
1	$9,2 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$	$8,9 \times 10^6$	$5,9 \times 10^7$
7	$1,1 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$3,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^9$
14	$9,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$7,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$
21	$7,7 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$
28	$8,5 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$	$8,1 \times 10^5$	$3,7 \times 10^7$

**Şekil 2.** Laboratuvara üretilen Kopanisti peynirine ait sayım sonuçları**Çizelge 2.** Çeşme'den alınan Kopanisti peynirine ait sayım sonuçları

Günler	MRS Agar (kob/g)	M17 Agar (kob/g)	DRBC Agar (Maya) (kob/g)	DRBC Agar (Küf) (kob/g)
0	$5,2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$1,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^9$
1	$3,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^9$
7	$8,8 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$
14	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$
21	$1,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$6,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$
26	$8,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$< 1,0 \times 10^1$	$3,3 \times 10^8$



Şekil 3. Çeşme'den alınan Kopanisti peynirine ait sayım sonuçları

Laktik asit bakterilerinin morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla izolatlara; Gram boyama işlemi uygulanmıştır. Yapılan mikroskopik inceleme sonucunda Gram pozitif 73 izolattan 44 tanesinin çubuk, 26 tanesinin kokobasil ve 3 tanesinin ise kok şeklinde olduğu gözlemlenmiştir.

Gram pozitif ve katalaz negatif sonuç veren izolatlar Hammes ve Vogel (7), Schillinger ve Lücke (8) ve Teuber'in (9) belirtilikleri kriterlere göre biyokimyasal testler ile tanımlanmıştır. Bu amaçla yapılan testlerin sonuçları ve tanımlanan laktik asit bakterileri Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Tanımlama amacıyla yapılan testlerin sonuçları ve tanımlanan laktik asit bakterileri

YAPILAN ANALİZLER		Lactobacillus brevis Lactobacillus buchneri Lactobacillus collinoides Lactobacillus minor Lactobacillus oris Lactobacillus parabuchneri Lactobacillus reuteri Lactobacillus sanfrancisco Lactobacillus suebeicus Lactobacillus vaginalis Lactobacillus johnsonii Lactobacillus malii Lactobacillus casei Lactococcus lactis ssp. Lactobacillus sharpeae										
Katalaz Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oksidasyon Fermentasyon Testi	-	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	
Glikozdan CO ₂ Oluşumu Testi	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Arjinin Hidrolizi Testi	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	
Farklı Sıcaklıklarda Üreme Testi	10°C 15°C 45°C	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	
	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	*	
	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	
	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	
	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	
Trehaloz	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	*	
Melibiyoz	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	
Ksiloz	+	+	*	-	+	-	+	-	*	-	*	
Melezitoz	-	+	+	-	+	-	-	-	*	-	*	
Arabinoz	+	+	-	+	+	-	+	-	*	-	*	
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	-	*	+	-	
Rafinoz	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
Laktoz	*	*	*	*	*	*	*	*	+	-	*	
Laktik Asit Konfigürasyonu	*	*	*	DL	DL	*	DL	*	*	*	*	
Yüzdelik diliimi (%)	2,74	5,48	1,37	1,37	2,74	1,37	15,07	32,88	4,11	1,37	8,22	4,11
												1,37

Fer.: Fermentatif

*: Analiz uygulanmamıştır.

Çeşme'den temin edilen ve laboratuarda üretilen Kopanisti peyniri örneklerinde, bu tür ürünlerde risk kaynağı olarak dikkate alınması gereken mikroorganizmalar, Türk Gıda Kodeksi, 2001 – 19 nolu Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde yer alan peynir standartları doğrultusunda incelenmiştir. Koliform ve *Escherichia coli* <3 olarak tespit edilmiş, *Staphylococcus aureus* sayısı ise laboratuarda üretilen Kopanisti peyniri için $1,0 \times 10^1$, Çeşme'den alınan Kopanisti peyniri için < $1,0 \times 10^1$ olarak saptanmıştır. *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* 25 g örnekte yoktur. Maya ve küp sayısı ise tebliğde belirtilen değerlerin oldukça üzerindedir. Elde edilen sonuçların tebliğdeki değer ile kıyaslaması Çizelge 4'te görülmektedir.

Çizelge 4. Türk Gıda Kodeksi, 2001 – 19 nolu Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre son ürüne yapılan analizler ve sonuçları

YAPILMASI GEREKEN ANALİZLER	n	c	m	M	n	Laboratuarda üretilen Kopanisti peyniri (kob/g)	Çeşme'den temin edilen Kopanisti peyniri (kob/g)
Koliform	5	1	9	95	5	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	5	0	<3	—	5	<3	<3
<i>Salmonella</i>	5	0	25 g'da bulunmayacak		5	25 g'da yok	25 g'da yok
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	25 g'da bulunmayacak		5	25 g'da yok	25 g'da yok
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	5	$1,0 \times 10^1$	< $1,0 \times 10^1$
<i>Clostridium perfringens</i> (kob/g)	5	1	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	-	-	-
Maya (kob/g)	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	5	$9,26 \times 10^6$	$9,26 \times 10^6$
Küp (kob/g)	5	2	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	5	$6,09 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$

n : Analize alınacak numune sayısını,

c : "M" değerini taşıyabilecek en fazla numune sayısını,

m : (n-c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri,

M : "c" sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla sayısı,

A : Laboratuarda üretilen Kopanisti peynirini,

B : Çeşme'den temin edilen Kopanisti peynirini ifade eder.

- : Analiz uygulanmamıştır.

Spontan fermentasyona tabi tutulmuş bir ürün için yukarıda adı geçen patojen mikroorganizmaların bu denli düşük seviyede çıkma sebebinin; laktik asit fermentasyonundan kaynaklanan düşük pH'dan olabileceği düşünlülmektedir. Bir diğer sebep ise; hakim floranın laktik asit bakterileri, mayalar ve küflerden oluşmasının, diğer mikroorganizmaların gelişimini olumsuz yönde etkilemiş olma olasılığıdır. Yapılan sayımlar sonucunda maya ve küp sayısının Türk Gıda Kodeksi, 2001 – 19 nolu Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ndeki peynir standardında belirtilen sınırların çok üzerinde olduğu belirlenmiş ve bunun sebebinin de spontan fermentasyondan dolayı kontaminasyona açık bir üretimin sonucu olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın bir sonraki aşaması olarak genetik tanımlama analizlerini takiben, izole edilen kültürlerden seçilen farklı laktik asit bakterisi ve maya kombi-

nasyonları kullanılmak suretiyle, bu kombinasyonların üretim koşullarına uygunluğu ve tat profili test edilmelidir. Elde edilen bulgular doğrultusunda oluşturulacak starter kültürün endüstriyel açıdan faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ünsal A. 2003. Süt Uyuyunca – Türkiye Peynirleri. Yapı Kredi Yayıncıları. İstanbul, 221s.
2. Tzanetakis N, Litopoulou – Tzanetaki E and Manolkidis K. 1987. Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek cheese. International Journal of Food Microbiology, 4: 251 – 256.
3. Sharpe ME, Fryer E and Smith DG. 1966. Identification of lactic acid bacteria. In *Identification Method for Microbiologists Part A*. Gibbs B.M. and Skinner F.A.(Eds.), pp 65 – 67, London Academic Pres.
4. Kandler O and Weiss M. 1986. Regular, nonsporing Gram – positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Hold JG (Eds), pp 1208 – 1219, Williams and Wilkins, USA.
5. Hounhouigan DJ, Nout MJR, Nago CM, Houben JH and Rombouts FM. 1993. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawé, a fermented maize dough from Benin. International Journal of Food Microbiology, 18:279 – 287.
6. Harrigan WF and McCance ME. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Pres, London, 425p.
7. Hammes WP and Vogel RF. 1995. The genus Lactobacillus. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), pp 19 – 54, Chapman & Hall, London.
8. Schillinger U and Lücke FK. 1987. Identification of lactobacilli from meat and products. Food Microbiology, 4. 199 – 208.
9. Teuber M. 1995. The genus Lactococcus. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), pp 179 – 234, Chapman & Hall, London.
10. Anonymous. 2005. D – Lactic acid / L – Lactic acid, UV – method for the determination of D – and L – Lactic acid in foodstuffs and other materials. Cat. No. 11 112 821 035. Boehringer Mannheim / R – Biopharm Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis, Roche.
11. Ünlütürk A ve Turantaş F. 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 186s.
12. Karapınar M. 1995. Gıdaların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 198s.