

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ŞAVAK TULUM PEYNİRİNİN ÜRETİMİ ve
OLGUNLAŞTIRILMASI SIRASINDA
Escherichia coli O157:H7, *Listeria*
monocytogenes ve *Salmonella'* nın YAŞAM ve
ASİT ADAPTASYON KABİLİYETİNİN
İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Abdullah DİKİCİ

ELAZIĞ – 2008

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. EMİNE ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Bahri PATIR

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Harun AKSU _____

Prof Dr. Bahri PATIR _____

Prof. Dr. Ali ARSLAN _____

Doç. Dr. H. Basri ERTAŞ _____

Doç. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU _____

Sevgili eşim *Selvihan DİKİCİ* ve biricik kızım *Berrunaz DİKİCİ*' ye
ithafen ...

TEŞEKKÜR

Bu bilimsel çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve ortaya konmasında, tüm doktora dönemim boyunca her türlü ilgi ve desteğini esirgemeyen danışmanım, sayın Doç. Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU' na teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca Tez İzleme Komitesi' nde yer alan sayın Prof. Dr. Bahri PATIR ve sayın Doç. Dr. H. Basri ERTAŞ'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmada kullanılan koyun sütünün elde edilmesinde yardımcı olan KAPLAN Gıda Ltd. Şti. sahipleri Fatih - Yavuz KAPLAN' a, çalışmanın bütün aşamalarında maddi ve manevi olarak yardımını esirgemeyen sevgili hocam ve arkadaşım Dr. Pınar ŞEKER' e, çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında manevi desteğini esirgemeyen, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, bana her zaman güç veren sevgili eşim Selvihan DİKİCİ' ye, en zor anlarımda beni umutlandıran ve moral veren biricik kızım Berrunaz DİKİCİ' ye, her zaman desteğini hissettiğim sevgili annem Hacer DİKİCİ, sevgili babam Sabri DİKİCİ ve sevgili kardeşim Yusuf Tolga DİKİCİ' ye sonsuz şükran ve minnetlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Stresin Tanımı	5
3.2. Bakterilerin Strese Karşı Oluşturdukları Yanıt	7
3.2.1. Adaptasyon	8
3.2.2. Tolerans	8
3.2.3. Yaralanma	8
3.3. Stres, Adaptasyon ve Gıda Güvenliği İle İlişkisi	9
3.4. Strese Karşı Meydana Gelen Yanıtın Mekanizması	12
3.5. Genel Stres Yanıtı	13
3.6. Özel Stres Yanıtları	13
3.6.1. Sıcaklık	13
3.6.2. Soğuk	14
3.6.3. Asit	14
3.6.4. Ozmotik Stres	21
3.6.5. Oksidatif Stres	21
3.7. Çapraz Koruma	22
3.8. Stres ve Virulens Arasındaki İlişki	24
3.9. Gıdalarda Patojenlerin Stres Adaptasyonu	25
4. GEREÇ ve YÖNTEM	34
4.1. Gereç	35
4.1.1. Süt Örnekleri	35

4.1.2. Deneysel gruplar	35
4.1.3. Denejde Kullanılan Patojen Suşları	36
4.2. Yöntem	37
4.2.1. İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon	37
4.2.2. Deneysel Tulum Peyniri Üretim Prosedürü	38
4.2.3. Mikrobiyolojik Analizler	40
4.2.3.1. <i>Salmonella</i> Sayımı	40
4.2.3.2. <i>E. coli</i> O157:H7 Sayımı	41
4.2.3.3. <i>Listeria monocytogenes</i> Sayımı	41
4.2.3.4. <i>Lactobacillus</i> spp. Sayımı	42
4.2.3.5. <i>Lactococcus</i> spp. Sayımı	42
4.2.3.6. Toplam Aerob Mezofil Bakteri Sayımı	42
4.2.3.7. Psikrofil Aerob Bakteri Sayımı	42
4.2.3.8. <i>Enterococcus</i> spp. Sayımı	43
4.2.3.9. Maya Sayımı	43
4.2.3.10. <i>Staphylococcus</i> spp. Sayımı	43
4.2.3.11. <i>Koliform</i> Sayımı	43
4.2.4. Sentetik Mide Sıvısında Aside Dayanıklılık Deneyleri	43
4.2.5. Kimyasal Analizler	45
4.2.5.1. pH Tayini	45
4.2.5.2. Peynirde Toplam Asitlik Tayini	45
4.2.5.3. NaCl Tayini	45
4.2.5.4. Su Aktivitesi Tayini	45
4.2.5.5. Protein Tayini	45

4.2.5.6. Rutubet Tayini	45
4.2.5.7. Yağ Tayini	45
4.2.5.8. Çiğ Sütte Asitlik Tayini	45
4.2.5.9. Çiğ Sütte Yağ Tayini	45
4.2.6. İstatistiksel Analizler	46
5. BULGULAR	47
5.1. Deneysel Tulum Peyniri Yapımında Kullanılan Çiğ Koyun Sütünün Kimyasal Özellikleri.	47
5.2. Deneysel Tulum Peynirinin Yapım ve Olgunlaştırma Aşamalarında Saptanan Mikrobiyolojik ve Kimyasal Değerler	48
5.2.1. Mikrobiyolojik Değerler	48
5.2.1.1. <i>Salmonella</i> Sayısı	48
5.2.1.2. <i>E. coli</i> O157:H7 Sayısı	49
5.2.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> Sayısı	49
5.2.1.4. <i>Enterococcus</i> spp. Sayısı	50
5.2.1.5. <i>Lactococcus</i> spp. Sayısı	51
5.2.1.6. <i>Lactobacillus</i> spp. Sayısı	52
5.2.1.7. Maya Sayısı	53
5.2.1.8. <i>Staphylococcus</i> spp. Sayısı	54
5.2.1.9. Toplam Aerob Mezofil Bakteri Sayısı	55
5.2.1.10. Psikrofil Aerob Bakteri Sayısı	56
5.2.1.11. Koliform Bakteri Sayısı	57
5.2.2. Kimyasal Değerler	61
5.2.2.1. pH Değeri	61

5.2.2.2. Toplam Asitlik Miktarı	62
5.2.2.3. Rutubet Oranı	63
5.2.2.4. Su Aktivitesi Değeri (a_w)	64
5.2.2.5. Tuz Oranı	65
5.2.2.6. Yağ Miktarı	66
5.2.2.7. Protein Miktarı	67
5.2.3. Deneysel Kontamine Tulum Peynirleri Örneklerinin Sentetik Mide Sıvısındaki Muameleleri Sonucu Patojen Bakterilerdeki Değişimler	72
5.2.3.1. Tulum Peyniri Örneklerinin SMS ile Muamelesi Sonucunda <i>Salmonella</i> Sayılarında Meydana Gelen Değişimler	72
5.2.3.2. Tulum Peyniri Örneklerinin SMS ile Muamelesi Sonucunda <i>E. coli</i> O157:H7 Sayılarında Meydana Gelen Değişimler.....	75
5.2.3.3. Tulum Peyniri Örneklerinin SMS ile Muamelesi Sonucunda <i>Listeria monocytogenes</i> Sayılarında Meydana Gelen Değişimler	78
6. TARTIŞMA	81
7. SONUÇ	94
8. KAYNAKLAR	95
9. ÖZGEÇMİŞ	102

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Deneysel Şavak tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırması numune alma günleri ve yapılan analizler	39
Tablo 2.	Deneysel tulum peyniri üretiminde kullanılan çiğ sütün kimyasal ve fiziksel özellikleri	47
Tablo 3.	<i>Salmonella</i> inoküle edilmiş çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki mikrobiyolojik değişimler	58
Tablo 4.	<i>E. coli</i> O157:H7 inoküle edilmiş çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki mikrobiyolojik değişimler	59
Tablo 5.	<i>Listeria monocytogenes</i> inoküle edilmiş çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki mikrobiyolojik değişimler	60
Tablo 6.	<i>Salmonella</i> inoküle edilmiş çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki kimyasal değişimler	69
Tablo 7.	<i>E. coli</i> O157:H7 inoküle edilmiş çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki kimyasal değişimler	70
Tablo 8.	<i>Listeria monocytogenes</i> inoküle edilmiş çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki kimyasal değişimler	71
Tablo 9.	<i>Salmonella</i> ile kontamine deneysel Şavak tulum peynirleri örneklerinin yapım ve olgunlaştırma işlemleri esnasında sentetik mide sıvısındaki muameleleri sonucu patojenin sayısındaki değişiklikler	74
Tablo 10.	<i>E. coli</i> O157:H7 ile kontamine deneysel Şavak tulum peynirleri yapım ve olgunlaştırma işlemleri esnasında sentetik mide sıvısındaki muameleleri sonucu patojenin sayısındaki değişiklikler	77

Tablo 11. <i>Listeria monocytogenes</i> ile kontamine deneysel Şavak tulum peynirleri yapım ve olgunlaştırma işlemleri esnasında sentetik mide sıvısındaki muameleleri sonucu patojenin sayısındaki değişiklikler	80
--	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Enterik patojenlerin bilinen asit tolerans yanıtları	16
Şekil 2.	Deneysel kontamine Şavak tulum peyniri üretim prosedürü	38
Şekil 3.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki patojen bakterilerin sayısındaki değişimler	50
Şekil 4.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki <i>Enterococcus</i> spp. sayısındaki değişimler	51
Şekil 5.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki <i>Lactococcus</i> spp. sayısındaki değişimler	52
Şekil 6.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki <i>Lactobacillus</i> spp. sayısındaki değişimler	53
Şekil 7.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki maya sayısındaki değişimler	54
Şekil 8.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki <i>Staphylococcus</i> spp. sayısındaki değişimler	55
Şekil 9.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki Toplam Aerob Mezofil Bakteri sayısındaki değişimler	56
Şekil 10.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki Psikrofil Aerob Bakteri sayısındaki değişimler	57
Şekil 11.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki pH değeri değişimler	61

Şekil 12.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki % laktik asit miktarındaki değişimler	63
Şekil 13.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki % rutubet miktarındaki değişimler	64
Şekil 14.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki a_w miktarındaki değişimler	65
Şekil 15.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırılması sırasındaki % tuz oranı miktarındaki değişimler	66
Şekil 16.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırılması sırasındaki % yağ miktarındaki değişimler	67
Şekil 17.	Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırılması sırasındaki % protein miktarındaki değişimler	68
Şekil 18.	Tulum peyniri örneklerinin SMS ile muamelesi sonucunda <i>Salmonella</i> sayılarında meydana gelen değişimler	73
Şekil 19.	Tulum peyniri örneklerinin SMS ile muamelesi sonucunda <i>E. coli</i> O157:H7 sayılarında meydana gelen değişimler	76
Şekil 20.	Tulum peyniri örneklerinin SMS ile muamelesi sonucunda <i>L. monocytogenes</i> sayılarında meydana gelen değişimler	79

1. ÖZET

Bu çalışma Şavak tulum peyniri üretiminin *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin yaşamları ve sentetik mide sıvısında (SMS) aside dirençlilikleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Elazığ ilinde Şavak tulum peyniri üretimi yapan işletmelerin üretim koşulları incelendi ve model olarak en kısa yapım prosedürü seçildi. Her patojen için yapılan 3 tekerrürlü deneylerde, çiğ koyun sütleri, her biri 5 suştan oluşan *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* veya *E. coli* O157:H7 karışımları ile ayrı ayrı inokule edilerek (ortalama $7.0 \log_{10}$ kob/ml) tulum peynirinin yapımı (25°C ' de 3 gün) ve plastik kavanozlarda olgunlaşması (6°C 'de 90 gün) sağlandı. Kontamine tulum peynirinin yapımı (1. ve 2. günler) ve olgunlaştırılması esnasında belirli günlerde (0., 15., 30., 45., 60., 90.) mikrobiyolojik, kimyasal analizler ve SMS'de (pH 1.5-2.5) aside maruz bırakma deneyleri yapıldı. Olgunlaşma sürecinde tulum peyniri örneklerinin pH'sı 4.46-4.75, su aktivitesi 0.899-0.915, tuz oranı %2.88-4.05 arasında değişti. *Salmonella* sayısı, yapım aşamasının 2. gününden itibaren hızla düştü ve olgunlaşmanın 90. gününde tespit edilebilir seviyenin ($<1.0 \log_{10}$ kob/g) altında bulundu. Fakat *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 90. gün itibariyle sırasıyla $2.91 \pm 0.27 \log_{10}$ kob/g ve $3.15 \pm 0.51 \log_{10}$ kob/g bulundu. SMS deneylerinde ise *Salmonella*'nın yapımın 2. gününde bile 90 dk maruz kalma sonucunda canlı kalmadığı, buna karşın 90. günde 90 dk sonunda *E. coli* O157:H7' nin $0.90 \pm 0.02 \log_{10}$ kob/ml ve *L. monocytogenes*'in $1.36 \pm 0.52 \log_{10}$ kob/ml seviyelerinde olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'in Şavak tulum peyniri üretiminde oluşan koşullara *Salmonella*'ya göre daha dayanıklı olduğunu ve bu patojenlerin yapım ve

olgunlaşma aşamaları boyunca SMS' da 90 dk boyunca canlılıklarını koruyabildiklerini göstermiştir. Bunun nedeni, üretim esnasında oluşan subletal ortamın *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'te aside dirençlilik mekanizmalarını aktif hale getirmiş olması olabilir.

Anahtar kelimeler: Tulum, peynir, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, aside dirençlilik, olgunlaştırma.

2. ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate the effects of production of Şavak tulumu cheese on survival and acid resistance of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *E. coli* O157:H7. Production procedures of commercial Şavak tulumu producers in Elazığ were evaluated and the shortest processing was selected as a modal. In each of triplicate experiments per pathogen, raw ewe's milk was inoculated with 5-strain mixture of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 (average 7.0 log₁₀ cfu/ml) and processed (at 25°C, 3 days) and ripened at (6°C, 90 days) in plastic containers. Microbiological and chemical analysis and exposure experiments to synthetic gastric fluid (SGF, pH 2.0-2.5) were carried out during processing (days 1 and 2) and on certain days (0, 15, 30, 45, 60, 90) during ripening. During ripening, range of pH for tulumu cheese samples was 4.46-4.75, a_w was 0.899-0.915, and salt level was 2.88-4.05 %. The numbers of *Salmonella* decreased relatively faster as of the second day of curd-processing and dropped below detection limit (1.0 log₁₀ cfu/g) on day 90. However, numbers of *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 showed a gradual decrease during ripening and their numbers were 2.91±0.27 log₁₀ cfu/g and 3.15±0.51 log₁₀ cfu/g, respectively, on day 90. In SGF experiments, *Salmonella* did not survive 90 min exposure even on the day 2 of processing while viable cells of 0.90±0.02 log₁₀ cfu/ml of *E. coli* O157 and 1.36±0.52 log₁₀ cfu/ml of *L. monocytogenes* were recovered after 90 min exposure on day 90 of ripening. These results indicate that compared to *Salmonella* cells, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were more resistant to the intrinsic conditions occurred during production of Şavak tulumu cheese and these two pathogens could survive to 90

min exposure to SGF throughout the processing and ripening periods. This increased survival could be due to activation of acid resistance mechanisms of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* by sublethal conditions occurred during production and ripening period.

Key words: Tulumí, cheese, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, acid resistance, ripening

3. GİRİŞ

Araştırmacılar uzun yıllardır letal ortamlarda mikroorganizmaların nasıl yaşadıklarını ve aşırı stresli ortamlarda, sonradan ortaya çıkan adaptasyon mekanizmalarının yapısını merak etmiştir. Örneğın Fay 1934 (40) yılında ozmotik strese maruz bırakılmış bakterilerin, ısı adaptasyonunun artmış olduğunu bildirmiştir. Subletal strese maruz bırakılan mikroorganizmalarda, uygulanan strese karşılık direnç artmaktadır. Bu durum genellikle “strese adaptasyon” olarak adlandırılmaktadır. Gıda kaynaklı mikroorganizmalarda strese adaptasyon geçmişte göz ardı edilmiştir. Fakat günümüzde bu fenomenin gıda güvenliğı alanındaki önemi giderek artmaktadır.

Mackey ve Derrick (60) 1987 yılında, ısı şokuna (subletal ısı stresi) uğramış *Salmonella enterica* serovar Thompson suşunun, gıda içindeki ısıya direncinin artmış olduğunu rapor etmişlerdir. 1990 yılında Farber ve Brown (39), 48 °C’ de 120 dakika ısı şoku uyguladıkları *Listeria monocytogenes* suşlarını, sosis hamuruna inokule ettikten sonra 68 °C ısı işleme uygulamışlar ve patojenin ısıya karşı direncinin arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar ile strese adaptasyon fenomeni hakkında birçok veri sağlanmaktadır.

3.1. Stresin Tanımı

Stres ilgili olduğu alana göre farklı anlamlar taşımaktadır. Bir fizikçiye göre stres, birim alana uygulanan kuvvet anlamına gelmektedir. Ancak bir biyolog için ise suboptimal fiziksel şartlar, toksik kimyasallar ve zararlı besinsel ortamların zorla kabul ettirilmesi anlamına gelmektedir (66). Kısacası

mikroorganizmaların gelişmesi veya üremesini olumsuz yönde etkileyen herhangi bir zararlı faktöre/ortama stres adı verilmektedir. İşlenmiş gıda ürünleri bir çok stres faktörünü bünyesinde barındırmaktadır. Ancak bunların seviyeleri (şiddetleri) farklılık göstermektedir (95).

Bir mikroorganizma karşılaşmış olduğu strese, farklı yanıtlar verebilir. Zayıf stres (mild) olarak adlandırılan subletal bir stres ile bakteriler karşılaştığında, sayılarında bir azalma meydana gelmemektedir. Fakat üreme oranında durma veya azalma ile sonuçlanmaktadır. Mikroorganizmanın orta şiddetli (moderate) bir stres ile karşılaştığında mikrobiyel gelişimin durmasının yanında, bakterilerin yaşama kabiliyetlerinde azalma da meydana gelmektedir. Şiddetli (extreme veya severe) stres olarak adlandırılan durum ise bakteri hücreleri için ölümcül bir durum oluşturmaktadır. Bakteri popülasyonunun çoğunluğunun ölümü ile sonuçlanmaktadır (95).

Gıdalarda bulunan bakteriler, ham maddenin elde edilmesi sırasında kontrol edilemeyen stres faktörleri (kuruma vb) ve hammaddenin işlenmesi esnasında bilinçli olarak uygulanan koruyucu faktörler ile karşılaşabilmektedirler. Gıdanın üretimi ve işlenmesi esnasında mikroorganizmaların maruz kalabilecekleri stresler aşağıdaki gibi sıralanabilir (95).

- Isı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok gibi fiziksel stresler,
- Asitler, tuzlar ve oksitleyiciler gibi kimyasal stresler,

- Mikrobiyel metabolitler, antagonizma ve yarışmacı flora gibi biyolojik streslerdir.

Gıdalardaki bakteriler yavaş yavaş artan veya ani streslere maruz kalabilirler. Özellikle ani maruziyet durumlarında “şok” adı verilen durum söz konusu olmaktadır. Örneğin, gıdalar ile birlikte alınan bakteriler mide ortamında ani pH değişikliğine veya asit şokuna maruz kalırlarken, bir gıdanın fermantasyonu esnasında yavaş yavaş artan bir asitlik ile karşılaşabilirler.

3.2. Bakterilerin Strese Karşı Oluşturdukları Yanıt

Herhangi bir strese maruz bırakılmamış bir bakteri ilk maruz bırakıldığı strese karşı duyarlıdır. Duyarlı olduğu stres karşısında bakterilerde membran geçirgenliğinde değişimler (soğuk şoku), hücre protein yapısında değişimler veya ribozomal hasarlar (ısı) ve nükleik asitlerin olumsuz etkilenmesi (γ radyasyon) gibi hücresel aktiviteleri etkileyen olumsuz etkileyen çeşitli değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Moleküler düzeyde incelenecek olursak, bu olumsuz durumlarda hücrelerde şok düzenleyici proteinlerin sentezi meydana gelebilmektedir. Böylece bakteri sentezlenen proteinler ile maruz kaldığı stres ile baş edebilecek düzeye ulaşabilmektedir. Strese karşılık oluşan mikrobiyel yanıt aşağıdaki gibi sonuçlanabilir (95).

- Stres karşısında meydana gelen hasarı onarabilen, hücrenin yaşamını devam ettirebilen veya stres ajanlarını elemine edebilen proteinlerin üretimi,
- Stres faktörlerine karşı toleransın veya rezistansın kısa sürede şekillenmesi,

- Hücrenin transformasyona uğrayarak sporlanması veya yaşayabilen fakat kültürü yapılamayan (Viable-But-Not-Culturable,VBNC) duruma geçmesi,
- Konakçı olduğu organizmanın savunma sisteminden kurtulması.

3.2.1. Adaptasyon

Mikroorganizmalar strese maruz kaldıkları zaman, koruyucu veya adapte edici yanıt oluşturabilmektedirler. Uygulanan strese karşılık oluşan yanıt, benzer veya farklı streslere karşılıkta çeşitli seviyelerde adaptasyona (çapraz koruma) neden olabilmektedir. Bu fenomen adaptiv yanıt, indüklenmiş tolerans, alışma terimleriyle de tanımlanmaktadır (95).

3.2.2. Tolerans

Tolerans, mikroorganizmaların strese karşı yaşayabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Her mikroorganizmanın belli bir strese karşı tolerans seviyesi farklıdır. Fakat uyarılan bu tolerans seviyesi geçici olabildiği gibi, adaptiv tolerans da oluşabilir. Örneğin, laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, diğer bakterilere oranla çok daha fazla olabilmektedir. Ayrıca aside adapte edilen bakterilerin asit toleransı daha da artabilmektedir. Bu kavramların anlatımında kullanılan rezistanslık ve tolerans kavramları ise birbirine çok yakın anlamlar içermektedir (95).

3.2.3. Yaralanma

Mikroorganizmalar bir veya birden fazla zararlı faktöre karşılık duyarlılık gösterebilmekte ve bu durumda hücrel yapılar zarara uğrayabilmektedir. Bu değişikliklere yaygın olarak yaralanma adı verilmektedir. Yaralanma daha çok strese maruz bırakılmış hücrelerde özel bir ajana karşılık duyarlılık şeklinde

oluşabilmektedir. Yani strese uğramış hücrelerin maruz bırakıldığı ajan, sağlıklı hücrelere uygulandığında kolaylıkla canlılığını sürdürürken, strese uğramış hücrelerde bu ajan yaralanmalara sebep olabilmektedir (95). Hücrelerdeki yaralanma ve strese adaptasyon kavramları tam olarak karakterize edilememiştir. Fakat yaralanma, bakterinin maruz bırakıldığı strese karşılık oluşan stres yanıtındaki yetersizlik, yanıtta bir gecikme veya adaptasyon yanıtındaki yetersizlikten kaynaklanabilir. Yaralanmış olan hücrelerin sonu ya ölüm yada iyileşme ile sonuçlanmaktadır. Leistner (53), farklı stres faktörlerine maruz bırakılan bakterilerin enerji tüketiminin arttığını, metabolik yorgunluk ve homeostazisin bozulması yoluyla bakterilerde ölüme yol açtığını işaret etmektedir.

3.3 Stres, Adaptasyon ve Gıda Güvenliği İle İlişkisi

Gıdalardaki bakteriler hammaddenin üretiminden, ürünün işlenmesine ve sindirilmesi aşamasına kadar birçok stres faktörü ile karşılaşabilmektedir. Gıdanın üretim ortamında güneş ışığından kaynaklanan ultraviyole radyasyondan veya güneş ışınlarından bakteriler strese uğrayabilir, yaralanabilir ve hatta ölebilir. Güneş ışığından kaynaklanan ısı da bakteriler üzerinde stres oluşturabilmektedir. Fermantasyon asitliği, deniz suyunun tuzluluğu, kuru hava diğer stres faktörleri arasında sayılabilir. Bunun yanı sıra bakteriler tarafından üretilen metabolitler de stres yaratabilmektedir. Bakterilerin yaşaması ve üremesi aşamasında esansiyel besin maddelerinin eksikliği/açlığı, açlığın süresi ve boyutuna göre yaralanmalara veya ölümlere neden olabilmektedir. Kısacası doğada bulunan bakteriler farklı şiddetlerde kimyasal, fiziksel ve besinsel streslere maruz kalabilmektedir. Gıda da ise asit, ısı, donma, ozmotik şok, kurutma, oksidasyon ve açlık gibi streslerle karşılaşabilmektedir (95).

Hücresel yanıtlar, çeşitli tip ve büyüklüklerdeki stres faktörleri ile uyarılabilmektedir. Stres faktörüne karşı ortaya çıkan yanıtın gıda güvenliği açısından oldukça önemlidir. Çünkü strese adapte olmuş hücrelerin benzer (homolog) veya farklı (heterolog) streslere karşı da direnç kazanabileceği bildirilmiştir (95). Direnç kazanmış olan bakteriler, direnç kazanmadan önce kendileri için letal olan ortamlarda yaşayabilmektedir. Isı şokuna maruz bırakılmış hücreler, daha sonradan letal bir ısıya maruz bırakıldıklarında dirençli oldukları için, bu sıcaklıklara dayanabilmektedirler (17). *Listeria monocytogenes*' in zayıf sıcaklığa (45 °C'de 60 dak.) maruz bırakıldıktan sonra letal dozlardaki etanol, hidrojen peroksit ve tuza karşı önemli derecede direncinin (çapraz koruma) geliştiği saptanmıştır (57). Patojen bakterilerde adaptasyon mekanizmalarının uyarılmasının, ilgili patojenlerin hastalık oluşturma kabiliyetlerini arttırdığı da düşünülmektedir. Stephens ve arkadaşlarının (82) yaptıkları çalışmada, soğuk ortamda çoğaltılan *L. monocytogenes* hücrelerinin, farelere inokülasyonu sonrası virulenslerinin arttığını saptamışlardır.

Geleneksel gıda üretimi esnasında uygulanan aşamalar (örneğin pastörizasyon) çoğunlukla bakterilerin ölmesine neden olmaktadır. Ancak üretim aşamaları esnasında bakteriler zayıf stresli ortamlarla da karşılaşabilmekte ve adaptasyon mekanizmaları uyarılabilmektedir. Örneğin asit adaptasyon mekanizmaları uyarılmış *Salmonella* suşlarının peynir içindeki yaşam sürelerinin arttığı tespit edilmiştir (55). Isıya adapte edilmiş (48 °C'de 120 dak.) maruz bırakılmış *Listeria monocytogenes* suşlarının sosis hamurundaki ısıya karşı dirençlerinin arttığı rapor edilmiştir (39). Asit adaptasyon mekanizması uyarılmış *Listeria monocytogenes* suşlarının yoğurt, portakal suyu ve salata gibi asidik

gıdalarda yaşayabildiği belirlenmiştir (46). Bu durum gıdaların hazırlanışı esnasında bakterilerin maruz kaldıkları zayıf stresler (ısı, asit, tuz vb) karşısında uyarılan adaptasyon mekanizmalarının, gıda güvenliği açısından oluşturduğu tehlikeleri ortaya koymaktadır. Örneğin sucuğun fermantasyonu esnasında oluşan asitlik ve formülasyondan gelen tuzun sayesinde patojen bakterilerde asit adaptasyon yanıtı ve ozmotik şok yanıtı uyarılabilmektedir. Sucuğun fermantasyonu esnasında asit ve ozmotik şoka karşı uyarılmış patojenler, sucuğun daha sonraki aşamaları olan pişirme ve dumanlama aşamalarına karşı dirençli hale gelmekte veya ürünün muhafaza aşamasında, stres faktörlerine karşı dayanıklı hale gelebilmektedir. Benzer şekilde sütte bulunan bakteriler pastörizasyon sıcaklığı altında ısı işlemine tabi tutulduklarında (bazı peynir türlerinin yapımında olduğu gibi) zayıf bir ısı stresine maruz kalmakta ve adaptasyon kazanmaktadırlar. Ürünün (peynir) ilerleyen aşamalarında maruz kaldıkları letal sıcaklıklara karşı direnç kazanabilmektedirler. Anlaşıldığı gibi hammaddeden veya kontaminasyondan kaynaklanan bulaşmalarla dirençsiz halde bulunabilen bakteriler hammaddenin işlenmesi esnasında zayıf stres faktörleri ile karşılaşabilmekte ve adaptiv yanıtları uyarılabilmektedir. Bu durumu engellemek için alternatif işleme teknolojilerinin (yüksek basınç, radyasyon, elektrik akımı uygulamaları gibi non-termal teknolojiler) kullanılması tavsiye edilmektedir. Ancak yeni teknolojiler ile yaratılabilecek zayıf stres ortamlarına karşı da, bakterilerin adaptiv yanıt oluşturulabilme ihtimalleri unutulmamalıdır. Bu konuda yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır (95).

Gıda kaynaklı bakterilerin stres koşullarına adapte olmalarının olumlu tarafları da bulunmaktadır. Probiyotik bakteriler (*Bifidobacterium* spp.,

Lactobacillus acidophilus vb.) yoğurt ve benzeri asidik ürünlere bilinçli olarak katılmaktadır. Kendilerinde bulunan mevcut adaptiv yanıt uyarılarak üründe canlı kalması, hatta mideden geçerek bağırsaklara kadar ulaşması istenmektedir. Bu gıda ortamından, bağırsaklara kadar gelişi esnasındaki letal asitli (mide, pH 1.5) ortamlardan asit adaptasyon mekanizmaları sayesinde geçmektedir (95).

3.4. Strese Karşı Meydana Gelen Yanıtın Mekanizması

Strese karşılık bakterilerde oluşan tepkiler, ani (şok) yanıtlar ve/veya uzun süreli adaptasyonlar şeklinde olmaktadır. Pek çok durumda ani ve uzun süreli adaptasyon yanıtları benzer şok proteinler aracılığı ile meydana getirilmektedir. Ayrıca genel stres yanıtları bazı özel streslere karşı korunmada yardımcı olabildiği gibi, pek çok strese karşı da çapraz koruma sağlayabilmektedir. Bu durum pek çok özel ve genel stres yanıtlarının oluşması için gerekli olan proteinlerin birbirine benzemesinden kaynaklanmaktadır (95).

Bakteri hücresi bir stres faktörüne maruz kaldığında eğer genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Uygulanan stres neticesinde bakteri DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta ve bu mRNA ribozomlarda translasyon sonucunda ilgili stresi düzenleyici şok proteinini sentezlemiş olmaktadır. Sentezlenen düzenleyici şok proteini bakterinin fizyolojisini etkileyerek, uygulanan stres ile mücadele etmesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktörüne karşıda etkili olabilmektedir. Ayrıca her bakterinin bir strese karşı aktive ettiği direnç mekanizmaları aynı olabildiği gibi farklı da olabilmektedir. Hatta aynı bakterinin farklı gelişim evrelerindeki (lag faz,

log faz, istasyonier faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (95).

3.5.Genel Stres Yanıtı

Genel stres yanıtı çeşitli stres faktörleri ile aktive edilebildiği gibi çoklu stres faktörleri tarafından da uyarılabilir. Genel stres yanıtının aktive edilmesi, genellikle gelişme oranındaki yavaşlama veya istasyonier faza geçiş esnasında meydana gelmektedir (6). *E. coli* ve diğer Gram (-) bakterilerde en iyi bilinen genel stres yanıtı sistemleri, alternatif sigma faktör (σ^S) tarafından kontrol edilmektedir. Gram (+) bakterilerde ise σ^B tarafından kontrol edilmektedir. Alternatif sigma faktör ve σ^B tarafından uyarılmış genlerin DNA onarımına ve osmoprotektan alımını sağladığı ve böylece ozmotik ve oksidatif streslere hücreyi hazırladığı bildirilmiştir (29,48).

3.6. Özel Stres Yanıtları

3.6.1. Sıcaklık

Gıda kaynaklı bakteriler gıdaların işlenmesi veya korunması amacıyla yapılan işlemler sırasında sık sık ısıya maruz kalmaktadır. Sıcaklık hücrenel komponentlerde makro moleküler hasar meydana getirmektedir. Sıcaklık ile sentezlenen proteinler, oluşan hasarı onarır veya hasarlı komponentleri yıkımlar. Pek çok ısıl işlem ile uyarılmış stres proteinleri, ısı hasarına uğramış proteinleri toplamakta ve hücrenin bu hasarlı proteinler ile mücadele etmesine yardımcı olmakta (*GroEL* ve *DnaK* vb.) veya hasara uğramış protein miktarını (*Lon* ve *ClpAP* vb.) azaltmaktadır (6,48). Bu değişikliklere ek olarak bazı bakterilerde hücre membranında trans-cis yağ asiti oranı değişmektedir. Bu yapısal değişiklik ortam sıcaklığı arttığında membran akışkanlığı azaltmaktadır (29).

E. coli'de en fazla ısı ile uyarılan genleri kontrol eden mekanizma alternatif sigma faktördür (σ^{32}). Sitoplazmada proteinler denatürasyona uğradığı zaman σ^{32} tarafından yaklaşık 50 gen uyarılmaktadır (98). Isı stresi bulunmadığında düşük seviyelerde bulunurken, ısı arttırıldığında dramatik olarak artış göstermektedir (6,98).

3.6.2. Soğuk

Soğuk stresi sonucu bakterilerde, membran akışkanlığını optimize etmek için membran yağ asiti kompozisyonunda değişiklikler (77), çift zincirli nükleik asit üzerindeki soğuk etkisini stabilize eden DNA ve RNA' ya bağlı proteinlerin sentezi (71) ve sitoplazma ile uyumlu maddelerin hücre içine transferi (4) şeklinde fiziksel değişiklikler meydana gelmektedir.

Soğuk yanıtında meydana gelen protein sentezi, *Csps* (Soğuk şoku proteinleri - Cold shock proteins) veya *Caps* (Soğuk şoku alıştırmaya proteinleri - Cold shock acclimation proteins) diye sınıflandırılmaktadır. *Csps* hızlı, fakat soğuk yanıtında geçici olarak sentezlenir. *Caps* düşük sıcaklıklarda çoğalma esnasında sentezlenir ve çabuk uyarılırlar (71).

Sıcaklık düşürüldüğü zaman bütün hücrelerde çift katmanlı fosfolipid membranların akışkanlığı azalmaktadır. Optimum akışkanlığı sürdürmek için hücreler membranlarındaki doymamış yağ asiti miktarını fazlalaştırır veya membran yağ asitlerinin uzunluklarını azaltarak düşük sıcaklıklarda akışkanlığı arttırırlar (77).

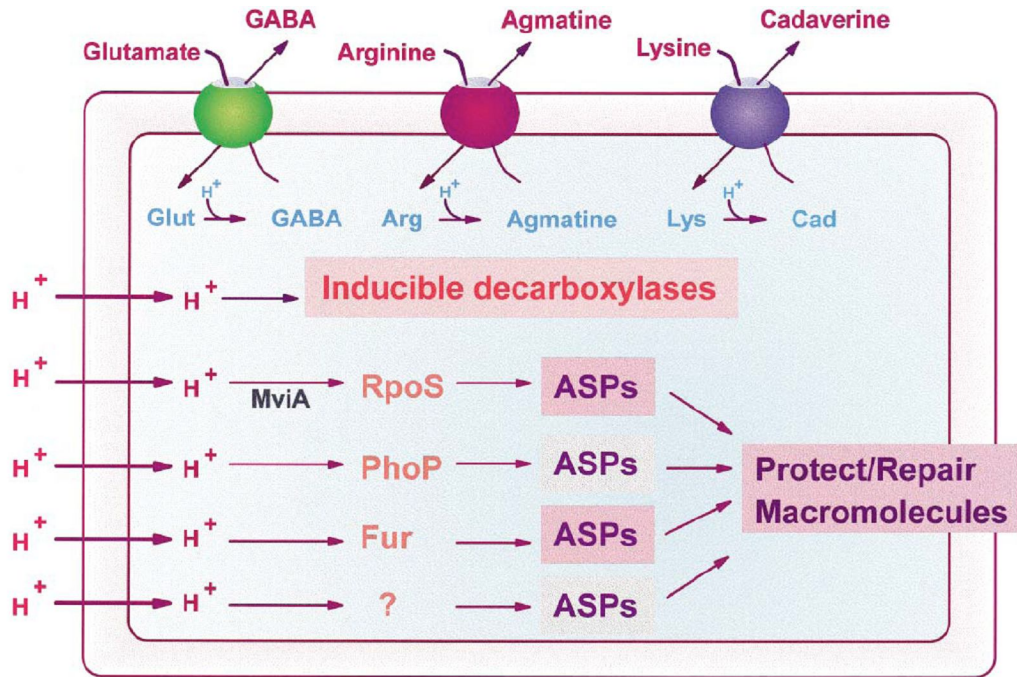
3.6.3. Asit

Gıda kaynaklı bakteriler, konakçı hücrelerde, gastro-intestinal kanalda ve gıdalarda organik veya inorganik asitler ile karşılaşmaktadır. Bakteriler asit stresine karşılık DNA'yı tamir eden enzimlerin uyarılması, amino asit katabolizmasının arttırılması, proton pompasının (proton efflux) arttırılması ve hücre membranındaki kompozisyon değişikliklerini içeren pek çok yolla karşılık vermektedirler (95). Pek çok bakteri subletal bir pH' da uyarılan (koruyucu proteinlerin sentezlenmesi) ve düşük pH' larda yaşamı sağlayan asit tolerans yanıtı (Acid Tolerance Response – ATR) olarak adlandırılan bir fenomene sahiptir. ATR, bakteri türleri arasında çok farklı düzeylerde olduğu gibi, aynı bakterinin fizyolojik fazları (gelişim-istasyonier faz) arasında bile farklılık bulunmaktadır. Asit şoku ile indüklenen yanıt, hücre içi veya hücre dışı pH' nın değişimiyle uyarılabilir.

Salmonella Typhimurium gıda kaynaklı patojenlerin en önemlilerinden biri olup, hem gelişim (log) hem de istasyonier fazda asit tolerans yanıt mekanizmasına sahiptir (43). Adaptasyonun olduğu subletal pH'da ATR mekanizması uyarılan *S. Typhimurium*, çok düşük pH derecelerinde ATR mekanizması sayesinde korunur. *S. Typhimurium*'un indüklenen ATR mekanizması, bakterileri pH 3'te birkaç saat koruyabilir (10). Gelişim fazındaki (minimal medyumda) *Salmonella* hücrelerinin pH 5.8'deki adaptasyonu, pH homeostasis sistem tarafından meydana getirilir ve böylece sonradan oluşabilecek letal asidik pH ile karşılaşan hücreler, yaşamlarını devam ettirebilecekleri seviyede internal pH ile yaşamlarını sürdürebilirler (43). Adaptiv pH'nın 4.5 seviyesine düşürülmesi ile *S. Typhimurium*'da 50 adet asit şok proteininin aktif hale geldiği ve aside toleransa

katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Asit toleransına katkıda bulunan bazı Asit Şok Proteinlerin (ASP) uyarılmasının hücre içi pH ile meydana geldiği anlaşılırken, diğer yanıtların hücre dışı pH ile oluştuğu anlaşılmıştır (43). Asit toleransın aktif hale gelmesiyle *S. Typhimurium* hücrelerinin yüksek sıcaklık, osmolarite ve oksidatif zarara karşı da çapraz koruma sağladığı görülmüştür (43).

S. Typhimurium'un log fazındaki ATR'sinde, alternatif sigma faktör (σ^S), *rpoS* tarafından kodlanan Fe^{++} düzenleyici *Fur* ve iki ögeli sinyal transdüksiyon sistem *PhoPQ*'yu içine alan birkaç düzenleyici gen rol oynamaktadır. Her bir gen ASP'lerin sentezini kontrol etmektedir. Asit şoku esnasında alternatif sigma faktörün seviyesi artmaktadır. Alternatif sigma faktör, inorganik asitlerden kaynaklanan streslere karşı oluşan toleransta da katkıda bulunur (47,92).



Şekil 1. Enterik patojenlerin bilinen asit tolerans yanıtları (10).

Bir diğer düzenleyici faktör olan *Fur*'un tanımlanabilmesi için kullanılan mutasyonlarda, asit tanımayan/demir tanıyan ve asit tanıyan/demir tanımayan

fenotipler tanımlanmıştır (43). Bu sonuçlar *Fur*'un asit ve demiri ayrı ayrı tanımladığını göstermiştir.

Log fazındaki ATR'de üçüncü düzenleyici sistem olan iki ögeli sinyal transdüksiyon, *PhoPQ*'dur. Bu iki öge *PhoP* ve *PhoQ*'dur. *PhoP* ve *PhoQ*'daki mutasyonlar, *rpoS* mutant inorganik aside duyarlı hücreler ile sonuçlanır (43). Ayrıca *PhoQ* mutant suşlar pH'ya duyarlı olduğu gibi magnezyuma da duyarlı olabileceği tahmin edilmektedir (43).

E. coli hücreleri *Salmonella* hücreleri gibi log ve istasyonier fazda ATR mekanizmalarına sahiptir. Ancak bu iki türün asit rezistanslık mekanizmalarının arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (10). Her iki türün istasyonier fazdaki hücrelerinin düşük pH'da kompleks medyumda aside dirençleri karşılaştırıldığında, *E. coli* hücrelerinin asit direncinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. *Salmonella* hücrelerinin pH 3'ün altında yaşayabilmeleri oldukça zayıfken, *E. coli* hücreleri pH 2'de saatlerce yaşayabilmektedir. Ancak bu farklılık sadece kompleks medyumda bu şekilde gözlenirken, minimal medyumda asit rezistanslıkta çok ciddi bir farklılık görülmemektedir. *E. coli*'nin istasyonier fazda asit direnç mekanizmaları, üç farklı sistemden oluşmaktadır. *E. coli*'nin asit rezistanslık sistemi alternatif sigma faktör ve cAMP reseptör protein bağımlı bir sistemi içine almıştır ve bu sistem minimal medyumda hücreleri pH 2'ye kadar koruyabilir. Bu sistem glikoz yokluğundaki oksidatif sistemin bir parçasıdır (56). Sistem hem cAMP'ye hem de reseptör proteini *CRP*'ye ihtiyaç duymaktadır (24). Oksidatif sistem *rpoS* bağımlı, glikoz yokluğunda, kompleks medyumda, pH 5.5'de, istasyonier fazda meydana gelmektedir. İkinci sistem glutamat ve glutamat / gama amino bütirik asit antiportere (*gadC*) ihtiyaç duymaktadır. Bu sistem

glutamat bağımlı olarak çalışır. Asit rezistanslıkta üçüncü sistem ise *Adi* tarafından kodlanan arjinin dekarboksilaz sistemidir ve bu sistem arjinin bağımlı olarak çalışır (43).

Son zamanlarda glutamat dekarboksilaz sistemini kodlayan iki gen, *gadA* ve *gadB* bulunmuştur. Bu iki genden herhangi birisi *gadC*'nin varlığında pH 2.5'da aside dirençlilik sağlarken, pH 2'de asit rezistanslığı sağlamak için her ikisine de ihtiyaç duymaktadır (43). İstasyoner fazda aktif hale gelen *gad* genlerinin, alkali pH'da alternatif sigma faktöre bağımlıyken, asit pH'da ise aktif hale gelirken alternatif sigma faktörden bağımsız olduğu belirlemiştir (24,43). Glutamat ve arjinin dekarboksilaz metabolizmasının, arjinin yada glutamat dekarboksilasyonu esnasında proton harcadığı tahmin edilmektedir. Glutamat dekarboksilazın son ürünü olan γ -amino bütirik asit (GABA), *gadC* tarafından kodlanan bir antiporter tarafından hücre dışına taşınır ve hücre dışındaki glutamat ile değiştirilir (24). Arjinin dekarboksilazın son ürünü olan agmatin, henüz hangi gen tarafından kodlandığı bilinmeyen bir antiporter ile hücre dışına taşınır (24). Böylece internal pH'nın ölümcül seviyelerin altına düşmesi engellenerek, hücreye alınan protonlar tüketilip tekrar hücre dışına atılır (24).

E. coli'nin log fazındaki ATR'sinin, *Salmonella*'nın log fazındaki ATR'sinden farklı olduğu düşünülmektedir. *Salmonella*'nın (minimal medyumda gelişen) log fazındaki ATR sistemi, alternatif sigma faktör ve *Fur* bağımlıyken, *E. coli*'nin (nutrient brotunda gelişen) log fazındaki ATR sistemi *CysB* bağımlıdır (76). *CysB*, arjinin dekarboksilaz sisteminin düzenleyicisidir (24).

E. coli'nin sahip olduğu arjinin dekarboksilaz ve glutamat dekarboksilaz sistemi arasında bazı farklıklar vardır. Glutamat dekarboksilaz sistemi, hücrelerin

gelişimi esnasında kompleks medyumun indüksiyonuna ihtiyaç duymamaktadır. Ancak arjinin dekarboksilaz sistemi adaptasyonda kompleks medyuma ihtiyaç duymaktadır (56). Bir diğer fark ise glutamat dekarboksilaz sistemi, aktif hale gelmek için düşük pH'ya ihtiyaç duymazken, arjinin dekarboksilaz sistemi aktif hale gelebilmek için düşük pH'ya ihtiyaç duymaktadır (56).

Arjinin ve glutamat dekarboksilaz sistemlerinden, glutamat dekarboksilazın, arjinin dekarboksilaz sistemine göre daha baskın olduğu saptanmıştır (43). Son yıllarda yapılan bir çalışmada birçok gıdaya inoküle edilen patojen ve non-patojen *E. coli* suşlarının asit toleransı ve *gad* mRNA seviyelerine bakılmıştır (94). Sonuçlar, domates (pH 4.6) ve zencefilde (pH 4.5) asit toleransın geliştiği görülmüş ve bu iki gıdanın asidik olmasıyla açıklanmıştır (94). Asit toleransın geliştiği hücrelerde *gad* mRNA (*gadA* ve *gadB*) seviyesinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (94).

L. monocytogenes gıda kaynaklı listeriozise neden olan, Gram (+) intraselüler bir patojendir. *L. monocytogenes*'in sahip olduğu ATR mekanizması uzun yıllardan beri bilinmektedir, fakat son zamanlarda suşları arasındaki aside dirençlilik minimum bazal seviyeleri arasında önemli derecede fark olduğu anlaşılmıştır (36).

Diğer Gram (+) bakteriler gibi *L. monocytogenes* de, hücre içi pH dengesini koruyabilmek için F_0F_1 -ATP_{ase} proton pompası mekanizmasını kullanıp, sitoplazmasından protonları pompalayarak sağlamaktadır (61). *L. monocytogenes*'in istasyonier fazdaki hücreleri, pH 3.5'deki ortamlara karşı doğal dirence sahiptir. Ancak log fazında bulunan hücrelerinin pH 3.5'e dirençli olabilmeleri için, asit adaptasyonun zayıf pH'da indüklenmesi gerekir (67). Tüm

adaptasyonlarda olduğu gibi, buradaki adaptasyonda da protein sentezine (şok proteinleri) gereksinim vardır. Aynı zamanda asit adaptasyonun uyarılması, *L. monocytogenes* hücrelerini birçok çevresel faktöre karşı da korumaktadır. Aside adapte hücrelerde termal stres, ozmotik stres, kristal violet ve etanole karşı toleransın arttığı saptanmıştır (67). Ayrıca aside adapte ve sahadan elde edilen *L. monocytogenes* suşlarının farelere intraperitoneal enjeksiyonu sonucu, asit adapte suşların, adapte olmayan suşlara göre virulensinin arttığı bildirilmiştir (67).

L. monocytogenes, *E. coli* tarafından kullanılan glutamat dekarboksilaz mekanizmasına benzer bir ATR sisteminden yararlanmaktadır (28). *E. coli*'de olduğu gibi burada da *gadA*, *gadB*, *gadC* genleri bu mekanizmayı kodlamaktadır. Glutamat dekarboksilaz mekanizmasını kodlayan *gadB*, asitle uyarılması sonucu mekanizmayı başlatır. Her ne kadar *E. coli*'deki glutamat dekarboksilaz metabolizmasına benzetilse de, *E. coli*'nin glutamat mekanizması asit ile uyarılmamaktadır (43). Bu mekanizmadaki bir diğer gen olan *gadA*'da, glutamat dekarboksilazı kodladığı saptanmıştır. Diğer gen *gadC*'nin ise hücre içine yetecek kadar glutamat dekarboksilaz sentezini kodladığı belirlenmiştir. Bu gen (*gadC*) asit ile indüklenmez ve her zaman düşük seviyelerde mekanizmayı çalıştırır (61). Glutamat dekarboksilaz metabolizmasını kodlayan bu üç gende yapılan mutasyonlar sonucu, *L. monocytogenes* hücrelerinin sentetik mide sıvısından geçerken (yaklaşık 4 saatte) yaşama kabiliyetinin kaybolduğu saptanmıştır (61). Bu sonuç, *L. monocytogenes*'in mideden geçişi esnasında ve çok düşük pH şartlarında hayati fonksiyonlarını kaybetmemesi için, glutamat dekarboksilaz metabolizmasının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (61).

L. monocytogenes üzerine yapılan son çalışmalarda, *lisRK* geni tarafından kodlanan iki ögeli sinyal transdüksiyon sistemi tanımlanmıştır ve bu sistemin *L. monocytogenes*'in virulensi ve strese toleransı için çok önemli olduğu belirlenmiştir (27). İki ögeli sinyal transdüksiyon sistemini kodlayan *lisRK* geninin çıkarılması, *L. monocytogenes* suşlarının log fazında asit strese duyarlılığıyla sonuçlanmıştır (61).

3.6.4 Ozmotik Stres

Bakteriler gıdaların içerisinde yüksek şeker ve tuz gibi veya kurutulmuş ürünlerde olduğu gibi çeşitli ozmotik streslere maruz bırakılırlar. Bu durumlarda özellikle turgor basıncı (şişme) ve de hidrasyon (su kaybetme) bakteriler için çok önemlidir. Bu mekanizma bakterilerde ara sıra oluşan hiperozmotik durumlarda veya orta şiddetli ozmotik şartlarda ortaya çıkmaktadır (95).

Hiperozmotik şartlar altındaki bakterilerde en iyi karakterize edilen metabolizma hücre içi ozmolit olarak adlandırılan maddelerin birikimidir. Uyumlu sıvıların birikimi, sentez yoluyla sağlandığı gibi, hücre dışından transfer şeklinde de gerçekleşebilmektedir. Bu sıvılar polar (kutupsal) yapıdadır ve yüksek derecelerde hücre içinde çözülebilen bileşiklerdir. Çok yüksek konsantrasyonlarda bile hücre fonksiyonları etkilemeden ozmotik basınç ile mücadele edebilirler. Glycine betain, proline, ectoine, carnitine, choline ve trehalose en yaygın bilinen uyumlu maddelerdir. Bu bileşiklerin sitoplazma içinde birikimi direkt olarak değişmiş enzim aktivesiyle veya gen transkripsiyon seviyesi ile düzenlenir (16).

E. coli'de σ^S ve *B. subtilis*'de ise σ^B ozmoprotektan sentezini veya transportu için gerekli bazı proteinlerin sentezlenmesini kontrol etmektedir (30).

Ayrıca yüksek tuz konsantrasyonlarında bakteri hücreleri membran yağ asiti kompozisyonlarında, trans-cis doymamış yağ rotasyonunu artırmaktadırlar (29).

3.6.5. Oksidatif Stres

Gıdalarda bakteriler, süper oksit, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi artmış reaktif oksijen türlerine maruz kalabilirler. Bu gibi çeşitli oksidantlar nükleik asit, lipid, hücresel proteinlerde zarara neden olurlar. Oksidatif stres tarafından induklendiği bilinen pek çok protein antioksidant rol oynarlar. Diğerleri ise özellikle nükleik asit hasarı başta olmak üzere oksidatif hasarı onarmak için gereklidirler (95).

E. coli'de hidrojen peroksit ve super oksit ile uyarılan en önemli düzenleyici genler *oxyR* ve *soxRS* dir (85). Ayrıca $\sigma^{S'}$ de ozmotik stres hasarının onarılmasında kullanılan proteinlerin düzenlenmesinde, sorumlu olduğu öne sürülmüştür.

3.7. Çapraz Koruma

Strese adapte bakteriler benzer veya farklı streslere karşı da adaptasyon kazanabilirler. Bir strese karşı adaptasyon esnasında, başka bir strese karşı da dirençlilik oluşmasına çapraz koruma (cross protection) olarak adlandırılmaktadır. Bu çapraz korumaya, erken dönemlerde maruz kalındığı durumda, *rpoS* geni tarafından aracılık edilebileceği belirlenmiştir. Yani ısı şokuna maruz bırakılmış bakteriler, diğer stres uygulamalarına karşı daha rezistans hale gelebilmektedir. Wang ve Doyle (91), subletal ısı işlemi uygulanmış *E. coli* O157:H7 hücrelerinde asitliğe karşı toleransın arttığını tespit etmişlerdir. Isı stresi ile uyarılmış *Listeria monocytogenes* hücrelerinde ısının, asit toleransına neden olmadığı fakat

hücrelerin düşük pH'da ısı, tuz konsantrasyonu ve antimikrobiyal peptidlere daha rezistans hale getirdiği anlaşılmıştır (49). Lou ve Yousef (58), gelişim fazındaki *Listeria monocytogenes* hücrelerinin belirli çevresel stresler üzerine subletal ısının (45 °C' de 1 saat) etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda subletal ısı uygulanmış hücrelerin, normalde letal dozda olan hidrojen peroksit, etanol ve NaCl'ye karşı rezistanslığının arttığını ve böylece çapraz koruma sağladığını bulmuşlardır (58). Lou ve Yousef (1996) stres katılaşmasını (stres hardening), hurdle konsepti (çoklu bariyer koruma sistemi) içerisinde bir parça olarak ilk olarak kullanmış ve bariyer yaklaşımının yararlarını, stres adaptasyonun dengeleyebileceğini ilk defa ortaya atmışlardır (58).

Minimal gıda işleme teknolojilerinde mikrobiyel güvenlik amacıyla yapılan farklı kombinasyonlar uygulanmadan önce, mutlaka spesifik patojenlerin bütün çapraz koruma adaptasyonları da göz önüne alınmalıdır. *Salmonella* ile yapılan çalışmalarda aside karşı dirençli hale getirilen *Salmonella* suşlarının aynı zamanda yüksek ısı, osmolarite, oksidatif streslere karşıda toleranslık kazandığı ortaya çıkmıştır (38). *Campylobacter* ile yapılan bir başka çalışmada ise oksidatif strese karşı dirençli hale getirilen suşların, aynı zamanda asit stresine karşı da dirençli hale geldiği görülmüştür (64). Bu çapraz koruma, bakteri için çoklu bariyer koruma sistemine karşı büyük bir avantaj sağlamaktadır. Böylece halk sağlığını tehdit eden potansiyel risklerinin daha da arttığı görülmüştür.

Listeria monocytogenes'den korunmak amacıyla laktik asit bakterileri tarafından üretilen nisin, pediocin gibi isimler verilmiş bakteriyosinler kullanılmaktadır. Bonnet ve Montville (2005) ATR sistemine sahip olan ve olmayan *Listeria monocytogenes* suşlarını, nisin üreten laktik asit bakterileri ile

fermantasyona tabi tuttuklarında, ATR sistemine sahip olan suşların (2 suş) 60. güne kadar canlı kalırken (ort 2.00 log₁₀ kob/g), ATR sistemine sahip olmayan suşların 3 gün içerisinde tespit edilebilir seviyenin altına düştüklerini saptamışlardır (13).

3.8. Stres ve Virulens Arasındaki İlişki

Gıda kaynaklı bakteriler, gıdalar ile mideden geçişleri sırasında, ince bağırsaklardaki geçici kolonizasyonları esnasında ve konakçı hücre fagozomları içerisinde organik ve inorganik asitlere maruz kalmaktadırlar (45). Daha önceden maruz kaldıkları subletal streslerle aktif hale gelen adaptasyon mekanizmaları, bu bakterilerin hayatta kalma şanslarını arttırmaktadır. Oluşan yanıt sonucunda *S. Typhimurium* (42) ve *L. monocytogenes* (67) gibi gıda kaynaklı bakterilerin düşük pH'larda ki gıdalarda yaşamına katkıda bulunmaktadır. Çalışmalarda düşük pH'da yaşama yeteneğinin, virulens potansiyeline de katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Örneğin asit tolerant *Salmonella Typhimurium* mutant suşlarının, fare tifoid modelinde virulens potansiyelinin artışında bir miktar rol oynadığı araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir (93). Ek olarak aside toleranslık kazanmış *Salmonella Enteritidis* suşlarının normal referans suşlara göre daha virulent olduğu anlaşılmıştır (51).

Listeria monocytogenes üzerine yapılan bir çalışmada, aside adapte edilmiş suşların biyofilm oluşturma yeteneklerinin, adapte olmayanlara göre çok arttığı ve bu suşların Caco-2 hücrelerine (insana ait kolon karsinoma hücresi) invazyon yeteneğinin arttığını rapor edilmiştir (25). Ayrıca süt ürünleri içerisindeki tuz oranının invazyon etkisini azalttığı, fakat aside adapte *L. monocytogenes* suşlarının %10 tuzlu süt ürünlerdeki düşük invazyon etkisinin bile

adapte olmamış suşlara göre çok yüksek olduğunu saptanmıştır (25). Bu veriler ışığında asit adaptasyonun virulens potansiyeli üzerine etkisinin önemli olduğu anlaşılmıştır.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada antibiyotiklere dirençlilik kazanmış patojenlerin (*E. coli* O157:H7), daha fazla virulens faktörü ürettikleri anlaşılmıştır (8,9).

3.9. Gıdalarda Patojenlerin Stres Adaptasyonu

Mikroorganizmalar üzerine laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, halen tartışılmaktadır. Çünkü genellikle tek veya birkaç stres tipine karşı bakterilerin davranışı incelenmektedir. Halbuki gıda ortamında mikroorganizmalar, birden daha fazla stres faktörü ile karşı karşıya kalmaktadırlar.

Faleiro ve arkadaşları (38), Portekiz peynirinden elde edilen (pH 5.1-6.2, %2 NaCl(w/v)) 4, etten elde edilen 2 ve balıktan elde edilen 1 adet listeriozise neden olmuş toplam 7 klinik izolatın, dış etkilere karşı vermiş oldukları tepkiyi araştırmışlardır. Araştırma sonucunda NaCl'ye karşı her suşun farklı tepkiler gösterdiği, fakat peynirden elde edilen izolatların diğerlerine göre daha toleranslı olduğu saptanmıştır (38). Ancak suşların tümüne bakıldığında, NaCl duyarlılığıyla gıda maddesinde bulunan NaCl miktarı arasında bir ilişki bulunmamıştır (38). Peynir yapımı aşamasında ilk olarak pH'nın düşmesi, NaCl'ye karşı da bir tolerans oluşmasına neden olabilir (38). Yapılan çalışmada buna dayanarak peynir örneklerinden alınan 4 izolata pH 5.5'de asit stresi uygulandıktan sonra %20 NaCl solüsyonu içerisine bırakılmıştır (38). Deneyin sonucunda peynirden elde edilen izolatların asit stresi sonrası ozmotik stres koşullarında canlı kalma süreleri, asit

uygulamasından sonra önemli ölçüde ($p<0.05$) artmıştır (38). Ancak etten alınan izolatlarda varyasyon çok fazla bulunmuştur (38). Balıktan alınan izolatın ise asit uygulamasından sonra, diğer suşlara göre daha uzun süre ($p<0.05$) canlı kaldığı deneylerle saptanmıştır (38). Ayrıca peynirden elde edilen izolatların 30 °C ve 8 °C muhafaza sıcaklığında pH 5.5 ve üzerinde gelişebildiği saptanmıştır (38). Çalışmada et ve peynirden elde edilen 4 izolatta, ozmoadaptasyon sayesinde aside dirençliliklerinin arttığı saptanmıştır (38). Ayrıca peynir üretimindeki safhaların *L. monocytogenes* hücrelerini öldürmediği, tam tersine aside ve tuza karşı oluşan toleransı arttırdığı saptanmıştır (38).

Sığır etinden hazırlanan “beef jerky”, baharatla karıştırılıp 24 saat 4°C’de bekletildikten sonra 10 saat 60 °C’de pişirilerek hazırlanan kurutulmuş bir et ürünüdür. Calicioglu ve arkadaşları (21,22,23), beef jerky yapım aşamalarında olabilecek kontaminasyon ihtimaline karşı, aside adapte ve adapte olmayan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* hücrelerinin inaktivasyonunu incelemişlerdir. Araştırmacılar, etlerin baharatla karıştırma aşamasından önce patojen bakterileri inoküle etmişler ve farklı marinasyon uygulamaları yaptıkları beş farklı gruba ayırıp ısı işlemi (60°C’de 10 saat) uygulamışlardır (21,22,23). Araştırma sonucunda kurumaya karşı aside adapte olan *Salmonella*’ların, tüm gruplarda adapte olmayanlara göre önemli ($p<0.05$) derecede ısıya dirençli olduğunu (23), *L. monocytogenes*’in aside adapte ve adapte olmamış suşları arasında tüm gruplarda kurumaya karşı direncinde bir farklılık görülmediğini (21) ve *E. coli* O157:H7’nin aside adapte suşlarının iki grupta (marinasyondan önce asetik asit ve/veya Tween20 uygulaması) adapte olmayan suşlara göre kurumaya karşı direncinin önemli ($p<0.05$) derecede azaldığını saptamışlardır (22).

Araştırmacılar patojenlerin aside adapte olmasının, dirençliliği arttırmaya neden olmadığını, jerkynin yapım aşamalarında antimikrobiyel bir aşamaya ihtiyaç olduğunu ve baharatla karıştırılma aşamasının değiştirilmesiyle, kurutmanın patojen inaktivasyonunu arttırabileceği sonucuna varmışlardır (21,22,23).

Calicioglu ve arkadaşlarının (18,19,20) “beef jerky” üzerine yaptığı diğer çalışmalarda, jerkynin üretim sonrası aynı patojenlerin aside adapte ve adapte olmayan kültürleriyle inokülasyonu durumunda patojenlerin yaşamını incelemişlerdir. Jerkyler başlangıçta beş gruba ayrılmış ve farklı marinasyon yöntemleri uygulanıp kurutulduktan sonra patojen inokülasyonları yapılmıştır. *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş jerkylerin üç grubunda (marinasyondan önce asetik asit ve/veya Tween20 uygulaması veya sadece marinasyon) aside adapte olmuş ve olmamış suşların inaktivasyonu arasında bir farklılık görülmediğini (20), *E. coli* O157:H7'nin aside adapte suşlarının tüm gruplarda adapte olmayanlara göre inaktivasyonunun daha hızlı olduğunu (19), *Salmonella*'nın aside adapte hücrelerinin tüm gruplarda, adapte olmamış hücrelere göre daha hızlı azaldığını saptamışlardır (18). Araştırmacılar, kurutma öncesi marinasyon aşamasında uygulanan antimikrobiyel bir aşamanın (asetik asit, TW20, etanol v.b.) kurutma sonrası oluşabilecek kontaminasyonlara karşı kalıcı koruma sağladığını rapor etmişlerdir (18,19,20).

Pepperoni, sığır etinden hazırlanan (pH 4.8) fermente bir sucuktur. Riordan ve arkadaşları (73), adapte ve adapte olmayan *E. coli* O157:H7 hücrelerini pepperoniye inoküle edip, D (1 log'luk ölüm için gereken zaman birimi) değerini ve farklı pH'lardaki pepperoniye, patojenin inokülasyonundan sonra ısı uygulanması sonucu bakterinin yaşamını incelemişlerdir. Çalışma

sonucunda adapte olmayan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin D değerleri 58.3 °C ve 61 °C’de sırasıyla 12.26 ve 3.58 dakika olarak belirlenmiştir (73). Ayrıca pH 4.8’deki üründe bulunan aside adapte olmayan hücrelerin D değeri, pH 4.5’de bulunan aside adapte olmamış bakterilerden yüksek olduğu saptanmış ve pH 4.8’deki aside adapte olmamış hücrelerin D değerinin, aside adapte olanlardan da yüksek olduğu belirlenmiştir (73). Çalışmada 6 log₁₀ kob/g *E. coli* O157:H7 inoküle edilmiş pepperonilere 58.3 ve 61 °C’de ısı uygulanarak, sırasıyla 61.3 ve 17.9 dakika sonra patojen sayısının tespit edilebilir seviyenin altına indiği saptanmıştır (73). Çalışmada pepperoni gibi fermente bir et ürünündeki aside adapte hücrelerin, aside adapte olmamış hücrelere göre ısıya daha duyarlı olduğu saptanmıştır (73).

Bir grup araştırmacı (79), et kombinasında bulunan doğal floranın, aynı ortamda bulunan patojenlerin hayatta kalmasını, gelişimini ve aside dayanıklılık tepkisini etkileyebileceğini düşünmüşlerdir. Bu varsayımı araştırmak için, yıkama suyuna inoküle edilmiş (5.00 log kob/ml) *L. monocytogenes* popülasyonundaki değişimler ve ATR’leri, önceden filtre ile sterilize edilmiş veya edilmemiş 35 °C suda veya patojenle kontamine %2 asetik/laktik asitli suyla karkas yıkanması yoluyla değerlendirilmiştir (79). İnoküle edilmiş *L. monocytogenes*’lerin asitli yıkama suyunda 24 saat içinde öldüğü saptanmıştır (79). Asitsiz yıkama suyunda patojenlerin, hakim olan doğal florayla (>8 log₁₀ kob/ml) ilgisi olmaksızın ortalama 1-2 log₁₀ kob/ml sayısının arttığı saptanmıştır. Doğal florada bulunan yada bulunmayan, patojenle kontamine yıkama sularının pH’sının artmış veya azalmış olduğu saptanmıştır. Ancak bu pH değişimlerinin *L. monocytogenes*’in ATR’sini zayıflattığı anlaşılmıştır (79). Filtre edilmeyen yıkama suyunda patojen

1. gün aside dayanıklılık gösterirken, 8. günde aside duyarlı hale geldiği belirlenmiştir (79). Filtre edilerek yapılan yıkamalar sonucunda patojenlerin yaşamının (1. günden 8. güne kadar) ortalama 1 log₁₀ kob/ml arttığı ve ATR' sinin değişmediği saptanmıştır (79). Bu çalışmalarla araştırmacılar, aerobik taze et işleme ortamına hakim olan Gram (-) floranın, bakteriyel patojenleri aside karşı duyarlı hale getirebileceğini öne sürmüşlerdir (79).

Berry ve arkadaşları (12) sığır karkaslarından izole ettikleri 39 *E. coli* O157:H7 ve 20 non-O157 suşlarının asit rezistanslığını incelemiştir. Suşlar glikoz bulunmayan ortamda gelişip istasyonere faza geldiklerinde, önceden asit adaptasyonu yapılmadan 6 saat pH 2.5'e bırakılmaları sonucu 1-2 log₁₀ kob/ml azaldıkları saptanmıştır (12). Ancak glikoz bulunan ortamda gelişip istasyonere faza gelen suşların, asit adaptasyondan sonra letal aside maruz bırakılmaları sonucu, 59 izolatın 57'sinde 0.5 log'luk bir azalma meydana geldiği ve varyasyonun azaldığı belirlenmiştir (12). Böylece *E. coli* O157:H7 ve non-O157 suşları arasında, asidik durumlara adaptasyon yeteneği veya asit dirençliliğinde bir farkın varlığı saptanamamıştır (12). Araştırmacılar, düşük pH ile gıdaları korumak için mikrobiyel gıda stratejileri planlanırken, bu patojenlerin önceki ortamlarının göz önünde bulundurulmaları gerektiği sonucuna varmışlardır (12).

Gahan ve arkadaşları (46), cottage peyniri (pH 4.71), yoğurt (pH 3.9), az yağlı (pH 5.25) ve yağlı (pH 5.16) çedar peyniri gibi asidik gıdalarda, aside adapte ve adapte olmayan *L. monocytogenes* hücrelerinin (LO28, ATM56 suşları) yaşamlarını araştırmışlardır. Her üç asidik süt ürünüde de *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonunun arttığı saptanmıştır (46).Yapılan çalışmada, cottage peyniri (pH 4.71), yoğurt (pH 3.9), yağlı çedar peyniri (pH 5.16) ve az yağlı çedar

peynirinde aside adapte olmayan *ATM56* suşunun daha dayanıklı olduğu saptanmıştır (46). Az yağlı çedar peynirinin 70 günlük muhafaza sonrasında, patojen suşlar arasında sadece *ATM56*'nın varlığı tespit edilmiştir (46). Daha öncede belirtildiği gibi, fermente ürünlerde asit dışında diğer faktörler devreye girdiğinde, asit adaptasyonun bakteri için yetersiz olduğu bu çalışma sonucunda da saptanmıştır. Mozzarella peynirinde de (pH 5.6) *Listeria* suşlarının aside dayanıklılığının arttığı belirlenmiştir (46).

E. coli O157:H7 diğer bakteriler gibi optimum pH 7'de gelişirken, pH 4.5-9 aralığında da gelişebilir (50). Bu patojen elma suyu (pH 3.7) (62), hardal (pH 3.1), taze turşu (pH 2.8) (50), ketçap (pH 3.65) (88), mayonez (pH 3.65) (92) gibi bazı asidik gıdalarda değişen sürelerde yaşayabilirler. Bunu sahip oldukları aside dirençlilik mekanizması ile yaparlar ve halk sağlığı açısından çok ciddi potansiyel tehlikeler oluştururlar.

Hsin-Yi ve Chou tarafından yapılan çalışmada (50), yakult (fermente bir süt içeceği) (pH 3.6), mango (hint kirazı) suyu (pH 3.2), kuşkonmaz suyu (pH 3.6) ve az yağlı yoğurt (pH 3.9) üzerine asit adapte ve adapte olmayan *E. coli* O157:H7 eklenerek, farklı muhafaza sıcaklıklarında (7 ve 25°C) davranışları incelenmiştir. *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 suşunun adapte ve adapte olmayan hücrelerinin kuşkonmaz suyunda 7°C'de muhafazası esnasında yaşamlarında belirgin bir fark görülmediği belirtilmiştir (50). Ancak *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 suşunun adapte ve adapte olmayan hücrelerinin kuşkonmaz suyunda 7°C'de muhafazası esnasında yaşamlarında belirgin bir farklılık ($p<0.05$) görülmüş ve adapte hücrelerin yaşama potansiyelinin daha fazla olduğu belirlenmiştir (50). *E. coli* O157:H7 suşlarının kuşkonmaz suyundaki 25°C'de

muhafaza esnasındaki yaşamları ise, ATCC 43889'un adapte ve adapte olmayan hücrelerinin 25°C' deki muhafaza esnasında, muhafazanın 14. gününde adapte olmayan hücreler 6 log₁₀ kob/ml'den 2 log₁₀ kob/ml civarına düşmüşken, adapte hücrelerde 6 log₁₀ kob/ml'den 3-4 log₁₀ kob/ml'ye düştüğü belirlenmiştir (50). Mango suyunda ise ATCC 43889 hücrelerinin 25 °C'de muhafazası esnasında, muhafazanın 6. gününde adapte ve adapte olmayan hücrelerin varlığı saptanmazken, 7°C'deki muhafazanın 8. gününde ise 4 log₁₀ kob/ml'nin üzerinde hayatta kaldığı tespit edilmiştir (50). ATCC 43895 hücrelerinin 7°C'deki mango suyunda muhafazaları sırasında sayılarında önemli bir değişme saptanamamıştır (50). Ancak 25°C'deki muhafazanın 6. gününde adapte olmayan hücreler saptanmazken, adapte hücreler 1 log kob/ml üzerinde saptanmıştır (50). Yakult 'da 7°C'de muhafazanın 6. gününde ATCC 43895'in ATCC 43889 hücrelerine göre önemli derecede (p<0.05) canlı kaldığı belirlenmiştir (50). Az yağlı yoğurtta, ATCC 43889 hücrelerinin 7°C' deki muhafazanın 120. saatinden sonra canlı hücre saptanamamıştır (50) Ancak ATCC 43895'in 144 saatlik muhafazası sonrası adapte ve adapte olmayan hücrelerin varlığını koruduğu, fakat sayılarının azaldığı saptanmıştır (50). İlginç olarak araştırmada kullanılan fermente süt ürünlerinde adapte olmayan hücrelerin, adapte olanlara göre daha dirençli olduğu görülmüştür (50). Bunun sebebinin fermente ürünlerde, laktik asit bakterileri tarafından üretilen asidin yanı sıra bakteriosinler, hidrojen peroksit, etanol ve di-asetil gibi antimikrobiyel maddelerin etkisi sonucu oluşan çapraz etki nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (50). Ayrıca çalışmada kullanılan şuşlardan ATCC 43895'in, diğer suşa oranla daha dayanıklı olduğu anlaşılmıştır (50).

Yokoigawa ve arkadaşları (94) tarafından yapılan çalışmada, gıdalarda gelişen, *E. coli* O157 ve *E. coli* O157:H7'nin asit toleransı ile *gad mRNA* seviyesi arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Çalışmada çeşitli gıda örneklerinin (kuşkonmaz, brokoli, havuç, kereviz, salatalık, patlıcan, zencefil, yeşil biber, soğan, patates, turp, domates, sığır eti, inek sütü (10 ml)) 10 gramının yüzeyine yaklaşık 30.000 hücre inoküle edilip, 10 ile 25°C'de depolanmıştır. Zencefil ve domates haricinde diğer gıdalarda, istasyonier fazda spesifik bir asit tolerans gelişmediği saptanmıştır (94). Ancak bu iki gıdada, diğer gıdalara oranla oldukça yüksek bir asit tolerans geliştiği, fakat kontrol olarak kullanılan EC sıvı besi yerinde bulunan hücrelere göre ise oluşan rezistanslığın az olduğu saptanmıştır (94). *E. coli* hücreleri 25 °C' de geliştiği zaman, asit tolerans seviyesi ile glutamat dekarboksilaz mekanizmasını kodlayan genlerin (*gadAB*) mRNA seviyesi arasında bağlantı vardır, fakat 15 °C veya altında geliştiği zaman istasyonier fazda bile bu bağlantı düşüktür (94).

Şavak tulum peyniri, çiğ koyun sütünden üretilen, yapımı esnasında starter kültür ilave edilmeden sütün doğal florası tarafından fermente edilen ve yaklaşık 90 gün süreyle olgunlaştırılan geleneksel bir peynir çeşidimizdir. Üretiminde hiçbir aşamasında ısıl işlem uygulanmamaktadır. Ürünün yaygın olarak muhtemel kontamine çiğ süttten yapılması, pastörizasyon uygulanmaması, starter kültürlerin kullanılmaması (kontrollü olmaması), çapraz kontaminasyon riskinin yüksek olması ve bilinçsiz üreticiler tarafından üretilmesi, gıda güvenliği açısından problemleri beraberinde getirmektedir. Uygulanan yapım ve olgunlaştırma aşamalarının patojen bakteriler üzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir. Klasik gıda güvenliği anlayışına göre, gıdaların üretim ve olgunlaşmaları esnasında

zamana bağlı olarak patojen bakterilerin sayılarında meydana gelen azalma, güvenli bir üretim olarak kabul edilmektedir. Halbuki, son 10 yıla ait literatür verileri hayatta kalan bakterilerin mide asidi gibi konakçı faktörlerine daha dirençli olacağı ve dolayısı ile daha düşük sayıda olsalar bile enfeksiyon oluşturabileceklerini ortaya koymuştur. Laboratuvar ortamında yapılan çok sayıda çalışmada *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'in asit dirençlilik sistemlerine sahip oldukları kanıtlanmıştır (46, 52, 56). Ancak laboratuvar ortamında sadece tek bir stres faktörü (laktik, asetik asit, HCl vb.) üzerinde durulurken, gıda ortamında bu stres faktörleri çoğunlukla birlikte bulunmaktadır (46). Bakterilerin gıdalardaki çok sayıdaki stres faktörlerine karşı oluşturdukları tolerans mekanizmalarının, mide ortamında patojenleri ne kadar koruyacağı bilinmemektedir (65). Bu konuda yapılmış sınırlı sayıdaki et, et ürünü, meyve suyu gibi ürünler üzerindeki çalışmalarda, dirençlilik mekanizmalarının aktif hale gelebildiği ve bu mekanizmaların sentetik mide sıvısında patojenlerin yaşam oranlarını artırdığı görülmektedir (41, 65, 74, 83, 84, 97) . Ancak gıdalarda yapılan çalışmalar sınırlıdır ve özellikle de süt ürünleri ile ilgili uluslararası literatürlerde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, ve *Salmonella'* nın Şavak tulum peynirinin üretim ve olgunlaşma (6 °C) koşullarındaki yaşamlarını ve sentetik mide sıvısındaki aside dayanıklılıklarını incelemektir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Elazığ bölgesinde Şavak tulum peynirinin üretim prosedürleri ortaya konarak en kısa yapım prensibine göre deneyler yapıldı. Amaca bağlı olarak en kısa yapım senaryosuna göre peynirin yapım ve olgunlaştırılması safhalarında yaşam kabiliyeti ve asit adaptasyon yetenekleri incelendi.

Bu amaçla ön çalışma olarak Elazığ bölgesindeki tulum peyniri işletmeleri ziyaret edilmiş ve tulum peyniri üretim prosedürleri incelenmiştir. İncelemeler neticesinde, üreticilerin tulum peyniri üretimi amacıyla süt üreticilerinden süt yerine, teleme (kelle peyniri) aldıkları saptanmıştır. Yani süt üreticisi tarafından koyunlardan sağılan süt, soğuk zincirde muhafaza edilemediğinden dolayı sağım sonrası rennin enzimi ilave edilerek teleme haline getirildiği belirlenmiştir. Peynir üreticilerinin aldıkları telemeleri büyük çuvallarda güneşsiz bir ortamda sularının süzülmesi amacıyla yaklaşık 1-7 gün beklettikleri, daha sonradan telemeyi ufalayıp yaklaşık %2.5 oranında tuz ilave ederek tekrar aynı ortamda 1-7 gün beklettikleri saptanmıştır. Bu işlemlerin hepsinin oda sıcaklığında yapıldığı ve her gün çuvalların alt-üst edildiği belirlenmiştir. Bu bekletme süreleri ortamın sıcaklığına, sipariş miktarına ve depodaki ürünün miktarına göre değişmektedir. Tüm bu işlemlerin ardından çuvallardan çıkartılan tulum peyniri örnekleri küçük parçalara ufalandıktan sonra, farklı ebatlardaki bidonlara hava almayacak şekilde doldurulduğu saptanmıştır. Ancak gözlemlerimiz esnasında üreticilerin çoğunun soğuk zincirde bekletilmesi gereken 90 günlük süreye riayet etmedikleri anlaşılmıştır.

Bu çalışma sahada üretilen geleneksel üretim prosedürleri uygulanarak yapılmıştır. Gözlemler esnasında üretim süresinin 3 ile 15 güne kadar değiştiği gözlemlenmiştir. Bu amaçla çalışmada tulum peyniri yapım süresi olarak, en kötü senaryoya göre en kısa yapım süresi olan 3 gün alınmıştır.

4.1 Gereç

4.1.1. Süt Örnekleri

Deneysel tulum peyniri amacıyla kullanılan koyun sütleri Kaplan Gıda Şti. (Elazığ) aracılığı ile elde edildi. Sabah sağımını müteakip sütler en kısa sürede soğuk zincir altında (30-45 dakika) laboratuvara getirildi ve hemen analizlere başlandı. Her deneysel grup için toplam 15 lt süttten yaklaşık 3-4 kg peynir yapılıp, toplam çalışma boyunca ise yaklaşık 135 lt süttten 27-36 kg peynir yapıldı. Üretimde kullanılacak sütlerin kimyasal özelliği analizatörde (Lactoscan, Milkotronic, Europa) belirlendi (Tablo 2). Ayrıca sütlerin mikrobiyolojik kalitesini belirlemek amacıyla yaklaşık 500 ml süt ayrılıp analiz edilinceye kadar 4 °C’de muhafaza edildi.

Tulum peyniri üretiminde kullanılacak koyun sütü içine her üç patojenden 5 farklı suş ilave edildi ve bunlar bir karışım haline (mix) getirilip, tüm suşlar birlikte inoküle edildi. İnokülasyon seviyesi $7.00 \pm 1.00 \log_{10} \text{kob/g}$ hedeflendi. Toplamda 3 deneysel grup oluşturuldu. Her deneysel grup ise 3 kere tekrar edildi.

4.1.2. Deneysel gruplar

- **1. grup:** *Salmonella* ile inokule edilmiş 6 °C’ de olgunlaştırılan tulum peyniri.
- **2. grup:** *E.coli* O157:H7 ile inokule edilmiş 6 °C’ de olgunlaştırılan tulum peyniri.

- **3. grup:** *L. monocytogenes* ile inokule edilmiş 6 °C' de olgunlaştırılan tulum peyniri.

4.1.3. Deneyde Kullanılan Patojen Suşları

Salmonella suşları:

Salmonella enteritidis RSKK 96046

Salmonella enteritidis RSKK 91

Salmonella enteritidis RSKK 92

Salmonella typhimurium RSKK 1017

Salmonella typhimurium ATCC 14028

E.coli O157:H7 suşları:

E. coli O157:H7 ATCC 43890

E. coli O157:H7 ATCC 43894

E. coli O157:H7 ATCC 51657

E. coli O157:H7 ATCC 43895

E. coli O157:H7 ATCC 35150

Listeria monocytogenes suşları:

Listeria monocytogenes 3a N 7143

Listeria monocytogenes 1/2b N 7144

Listeria monocytogenes 1/2b RSKK 472

Listeria monocytogenes 3a RSKK 474

Listeria monocytogenes 4b RSKK 475

Kullanılan patojenlerden RSKK kodlu olanlar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü, ATCC ve N kodlu olanlar ise Colorado Eyalet Üniversitesi'nden (Colorado, USA) temin edildi.

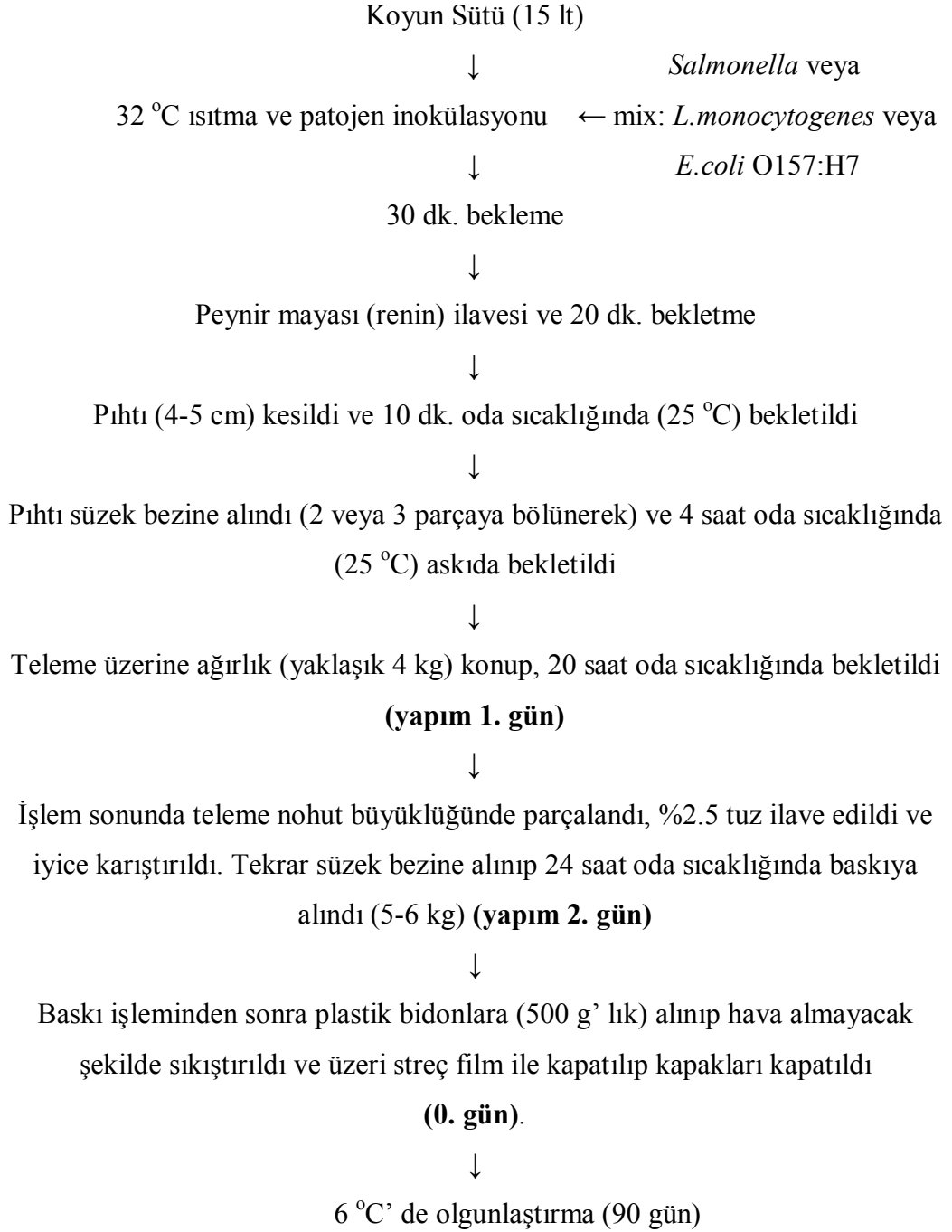
4.2. Yöntem

4.2.1. İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon

Her patojenin 5 suşu – 70 °C’den çıkarılarak Triptik Soya sıvı besiyerinde (TSP, LABM, Lancashire, UK) *Listeria monocytogenes* 30 °C’de, *Salmonella* 35 °C’de, *E. coli* O157:H7 35 °C’de 1 gece bekletildi. Patojenler 3 kez pasajlandı. Daha sonradan her patojenin 5 suşu santrifüj (4200 rpm/15 dk.) edilerek (Nüve NF 800R, Ankara, Türkiye) üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve yaklaşık 9 ml %0.9 ‘luk NaCl (serum fizyolojik) ilave edilerek pelet yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatant tekrar alınıp yine 9 ml %0.9 ‘luk NaCl (serum fizyolojik) ilave edilerek pelet parçalandı. Serum fizyolojik ile yıkama işlemi, patojenlerin sıvı besiyerinde üretilmeleri sırasında kendilerinin ürettikleri zararlı metabolitlerin ve organik maddelerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen peletler birleştirildi ve suşlar inokülasyon için hazır hale getirildi.

İnokülasyon işlemi, Şekil 1’de belirtildiği gibi sütün mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesinin incelenmesinden sonra 32 °C’ ye ısıtıldıktan sonra yapıldı.

4.2.2. Deneysel Tulum Peyniri Üretim Prosedürü



Şekil 2. Deneysel kontamine Şavak tulum peyniri üretim prosedürü.

Aşağıdaki tabloda analiz günleri ve her analiz gününde yapılmış olan kimyasal ve mikrobiyolojik analizler ayrıntısıyla verildi (Tablo 1).

Tablo 1. Deneysel Şavak tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırması numune alma günleri ve yapılan analizler.

Günler	Mikrobiyolojik analizler		Asit adaptasyon deneyleri	Kimyasal analizler						
	Patojen analizi	Diğer mikrobiyolojik analizler ^b	<i>E.coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i>	pH	Asitlik	Rutubet	Tuz	a _w	Yağ	Protein
Çiğ süt		+		+	+				+	
İnokülasyon sonrası	+									
Yapım1. gün	+	+		+	+	+				
Yapım 2. gün	+	+	+	+	+	+	+	+		
0. gün	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15. gün	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30. gün	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45. gün	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60. gün	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90. gün	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a : Zenginleştirme işlemi yapıldı.

b: *Lactobacillus* spp., *lactococcus* spp, toplam mezofil aerob bakteri, aerob psikrofil bakteri, *enterococcus* spp., maya, *staphylococcus* spp. sayımını içerir.

4.2.3. Mikrobiyolojik Analizler

Peynir örnekleri aseptik şartlar altında 2 x 25g örnekler alındı ve 225 ml %0.1'lik steril peptonlu su (LABM, Lancashire, UK) ilave edildi. Daha sonradan 2 dak. karıştırıcıda (Stomacher 400) homojenize edildikten sonra desimal dilüsyonları yapıp (10^{-8} 'e kadar) plaklara çift seri ekim yapıldı. Mikrobiyolojik analizler, yayma plak yöntemi (koliform, mezofil aerob bakteri ve psikrofil aerob bakteri sayımı hariç) ile yapıldı ve patojenler tespit edilebilir seviyenin ($1.0 \log_{10}$ kob/g) altına düştüğü durumlarda ise zenginleştirme yöntemi uygulandı.

Analiz günleri Tablo 1'de belirtilen günlerde yapıldı.

4.2.3.1. *Salmonella* Sayımı

Salmonella ekimi Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (LABM-032, Lancashire, UK) besiyerine yapıldı ve 35 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 30–300 arasındaki siyah renkli koloniler sayıldı (3).

Doğrulama işlemi polivalan *Salmonella* latex aglutinasyon test kiti (Eurobio, 7. Av de Scandinavie- F 91953 Les Ulis Cedex B, France) ile yapıldı (3).

Zenginleştirme işlemi ise 25 g peynir örneği tamponlanmış peptonlu suda 35 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra sırasıyla 9.9 ml Rappaport-Vasilidas broth sıvı besiyerine (Oxoid CM0866, Basingstoke, Hants., England) 0.1 ml ve 9 ml Tetrathionate broth sıvı besiyerine (iodin solüsyonu ilave edilmiş) (Merck 1.05285, E. Merck, Darmstadt, Germany) ise 1 ml homojenat ilave edildi. Her iki sıvı besiyeri de 42 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra XLD agar besiyerine ekimi yapıldı ve 35 °C'de 24 saat inkübe edildi (3).

4.2.3.2. *E. coli* O157:H7 Sayımı

E. coli O57:H7 ekimi Cefixim Tellurite (cefixim 0.05 mg/l, potasyum tellurite 2.5 mg/l) ilaveli Sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) (LABM, Lancashire, UK) besiyerinde yapıldı ve 35 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra 30–300 arasındaki beyaz renkli koloniler sayıldı (54).

Doğrulama işlemi O157 antijenine spesifik *E. coli* O157 latex aglutinasyon test kiti (Microscreen *E. coli* O157, Microgen Bioproducts, Camberley, UK) ile yapıldı (54).

Analizler esnasında yayma plak yönteminin tespit edilebilir seviyesi olan 1 log₁₀ kob/g seviyesinin altına düştüğünde ise zenginleştirme işlemi yapıldı. Zenginleştirme işlemi 9 ml novobiocinli (0.02 g/l) eklenmiş EC broth sıvı besiyerine (LABM, Lancashire, UK) 1 g numune ilave edilip 35 °C’de 24 saat inkübasyonun ardından CT-SMAC agara ekilip 24–48 saat inkübe edilerek yapıldı (54).

4.2.3.3. *Listeria monocytogenes* Sayımı

Listeria monocytogenes ekimi PALCAM agar (Oxoid CM0877, Basingstoke, Hants., England) (Palcam selective supplement, SR0150E, Oxoid, Basingstoke, Hants., England) besiyerinde yapıldı ve 30 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra 30-300 arasındaki kahverengi-zeytuni renkli koloniler sayıldı (20).

Doğrulama işlemi listeriolysin genini kodlayan primerler kullanılarak PCR ile yapıldı. Primer olarak LM1 (5'- CCT AAG ACG CCA ATC GAA - 3') ve LM2 (5'- AAG CGC TTG CAA CTG CTC - 3') baz dizilimine sahip primerler (IDT, Integrated DNA Tech. Inc., Coralville, USA) kullanıldı (14). PCR

reaksiyonu 30 siklus olarak gerçekleştirildi ve her siklus 95 °C’de 1dk. denaturasyon (ilk siklus da 4 dk.), 50 °C’de 2 sn. hibridizasyon ve 72 °C’de 1 dk. (son siklusda 8 dk.) sentez aşamasından oluşmuştur (14).

Zenginleştirme işlemi 9 ml Listeria Enrichment broth sıvı besiyerine (Merck 1.09628, E. Merck, Darmstadt, Germany) (Listeria selective enrichment supplement, Merck 1.11781, E. Merck, Darmstadt, Germany)1 g numune ilave edilip 35 °C’de 24 saat inkübasyonun ardından PALCAM agara ekilip 24–48 saat inkübe edilerek yapıldı (20).

4.2.3.4. *Lactobacillus* spp. Sayımı

Mezofil *Lactobacillus* spp. sayımı için örnekler Lactobacillus agara (de Man, Rogosa and Sharpe agar-MRS) (LABM, Lancashire, UK) yüzey yayma tekniğiyle ekimi yapıp, 30 °C’de 72 saat inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.5. *Lactococcus* spp. Sayımı

Mezofil *Lactococcus* spp. sayımı için örnekler M17 agara (LABM, Lancashire, UK) yüzey yayma tekniğiyle ekimi yapıp, 22 °C’de 72 saat inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.6. Toplam Aerob Mezofil Bakteri Sayımı

Toplam Aerob Mezofil Bakteri sayımı için örnekler Plate Count agar (PCA) agara (LABM, Lancashire, UK) plak dökme tekniğiyle ekimi yapıp, 35 °C’de 48-72 saat inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.7. Psikrofil Aerob Bakteri Sayımı

Psikrofil Aerob Bakteri sayımı için örnekler Plate Count agar (PCA) agara (LABM, Lancashire, UK) plak dökme tekniğiyle ekimi yapıp, 7 °C’de 7 gün inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.8. *Enterococcus* spp. Sayımı

Enterococcus spp. sayımı için örnekler Kanamycin Esculin Azide (KEAA) agara (LABM, Lancashire, UK) yüzey yayma tekniğiyle ekimi yapıp, 37 °C'de 48 saat inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.9. Maya Sayımı

Maya sayımı için örnekler Rose Bengal Chloramphenicol agara (Merck, E. Merck, Darmstadt, Germany) yüzey yayma tekniğiyle ekimi yapıp, 22 °C'de 5 gün inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.10. *Staphylococcus* spp. Sayımı

Staphylococcus spp. sayımı için örnekler Baird-Parker agara (E. Merck, Darmstadt, Germany) yüzey yayma tekniğiyle ekimi yapıp, 35 °C'de 24 saat inkübe edildi ve sayıldı (75).

4.2.3.11. Koliform Sayımı

Koliform analizi için örnekler (sadece çiğ süt) VRB agara (LABM, Lancashire, UK) plak dökme tekniğiyle ekimi yapıp, çift kat agar döküldükten sonra 35 °C'de 24 saat inkübe edildi ve sayıldı (72). 3. grupta koliform grubuna ait bir bakteri (*E. coli* O157:H7) olduğundan dolayı ilerleyen analiz günlerinde ekimler yapılmadı.

4.2.4. Sentetik Mide Sıvısında Aside Dayanıklılık Deneyleri

Sentetik mide sıvısı Molly ve ark. (63) tanımladığı şekilde hazırlandı. Kısaca, 8.3 g proteose peptone (E. Merck, Darmstadt, Germany), 3.5 g d-glucose (dextrose, anhydrous) (LABM, Lancashire, UK), 2.05 g sodyum klorid (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0.6 g potasyum fosfat (monobazik, anhydrous) (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0.11 g kalsiyum klorid (dehydrate) (E. Merck, Darmstadt,

Germany), 0.37 g potasyum klorid (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0.1 g lizozim (yumurta akı orijinli, kristalize) (Fluka, D-89552 Steinheim, Germany), 50 mg safra tuzu (sığır orijinli) (Fluka, D-89552 Steinheim, Germany), ve 13.3 mg pepsin (Pepsin A, domuz orijinli) (Sigma, D-89552 Steinheim, Germany) 1 litre distile suda çözüldürüldü ve 1.0N HCl (E. Merck, Darmstadt, Germany) ile pH 1.0 ayarlandı.

Her analiz gününde 10'ar g 3 peynir numunesi alınıp 30 ml steril % 0,9'luk NaCl (E. Merck, Darmstadt, Germany) eklendi ve karıştırıcıda (Stomacher 400, France) 3 dakika homojenize edildikten sonra mevcut patojen bakteri sayımı yapıldı. Daha sonradan 40 ml sentetik mide sıvısı (HCl ile pH 1'e ayarlı) eklenip 37 °C' deki etüve konup 0., 30., 60., 90. dakikalarda yayma plak tekniğine uygun olarak ekim yapıldı.

SMS deneylerinin 0. dakikasında dilüsyon oranı 1/4 olduğu için tespit edilebilir sayı 4 bakteriden ($0.6 \log_{10}$ kob/g) başlamaktadır. Diğer analiz sürelerinde (30.,60., 90. dk.) dilüsyon oranı 1/8 olduğu için tespit edilebilir sayı 8 bakteriden ($0.9 \log_{10}$ kob/g) başlamaktadır.

Sentetik mide sıvısı ilave edildikten sonra peynirin tamponlama etkisinden dolayı meydana gelen pH değişimi her ekim aşamasında takip edildi ve pH 2.5'in üzerine çıktığı durumlarda deney tekrarlandı.

Asit deneyleri yapım 2. gün ve olgunlaşmanın 0., 15., 30., 45., 60. ve 90. günlerinde yapıldı (Tablo 1). Ekimler yayma plak yöntemine göre, her patojen için uygun selektif besiyerine yapıldı.

4.2.5. Kimyasal Analizler

Kimyasal analiz günleri Tablo 1’de verilmiştir.

4.2.5.1. pH Tayini

pH tayini, pH metre ile (Selecta pH 2001,Spain) daldırma yöntemi ile yapıldı (54).

4.2.5.2 Peynirde Toplam Asitlik Tayini

Peynirde toplam asitlik tayini, AOAC 920.124’ a göre yapıldı (5).

4.2.5.3. NaCl Tayini

NaCl tayini, AOAC 983.14’e göre yapıldı (5).

4.2.5.4. Su Aktivitesi Tayini

Su aktivitesi, su aktivitesi cihazı (Testo 650) ile tespit edildi.

4.2.5.5. Protein Tayini

Peynirde protein tayini, AOAC 920.123’e göre Kjeldahl yöntemi ile yapıldı (5).

4.2.5.6. Rutubet Tayini

Rutubet tayini, AOAC 948.12’ye göre yapıldı (5).

4.2.5.7. Yağ Tayini

Peynirde yağ tayini, TS 3046’a göre yapıldı (89).

4.2.5.8. Çiğ Sütte Asitlik Tayini

Çiğ sütte asitlik tayini AOAC 947.05’e göre yapıldı (5).

4.2.5.9. Çiğ Sütte Yağ Tayini

Çiğ sütte yağ tayini, TS 8189’a göre yapıldı (90).

4.2.6. İstatistiksel Analizler

Bakteri sayıları \log_{10} kob/g' a çevrildi. Her patojene ait veriler tekerrür x örnek sayısı x zaman modeline uygun olarak ANOVA testine tabi tutuldu ve değişkenler arası interaksyonlar hesaplandı. Ortalamalar General Linear Models (GLM) prosedürlerine göre Fisher'in en küçük kareler metodu kullanılarak ayrıldı ve bunda istatistiksel önem seviyesi %5 olarak kabul edildi. SMS deneylerinde canlı kalan patojenlerin sayıları, örnekleme günleri arasında karşılaştırıldı. Verilerin analizi, Statistical Analysis System (SAS) kullanılarak yapıldı (80).

5. BULGULAR

5.1. Deneysel Tulum Peyniri Yapımında Kullanılan Çiğ Koyun Sütünün Kimyasal Özellikleri

Deneysel tulum peyniri üretiminde kullanılan çiğ sütün kimyasal özellikleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Deneysel tulum peyniri üretiminde kullanılan çiğ sütün kimyasal ve fiziksel özellikleri.

Parametre	Tekerrürler			X \pm Sd
	1	2	3	
pH	6.26	6.23	7.03	6.51 \pm 0.45
Asitlik (SH cinsinden)	7.48	7.85	7.65	7.66 \pm 0.18
Yağsız Kuru Madde (%)	9.50	9.20	9.50	9.40 \pm 0.17
Yağ (%)	6.68	5.58	6.22	6.16 \pm 0.55
Protein (%)	3.47	3.36	3.48	3.44 \pm 0.07
Laktoz (%)	5.20	5.04	6.02	5.42 \pm 0.53
Özgül Ağırlık	1.031	1.031	1.031	1.031
Mineral Madde (%)	0.78	0.76	0.69	0.74 \pm 0.05

Deneysel tulum peyniri yapımında kullanılan sütün asitliği (SH) ortalama 7.66 \pm 0.45, pH’sı ise ortalama 6.51 \pm 0.45 olarak bulundu. Yağsız kurumadde oranı ort. 9.40 \pm 0.17, yağ miktarı ort. % 6.16 \pm 0.55, protein oranı ort. % 3.44 \pm 0.07, laktoz oranı ort. % 5.42 \pm 0.53, özgül ağırlık ort. 1.031, mineral madde ort. % 0.74 \pm 0.05 tespit edildi (Tablo 2).

5.2. Deneysel Tulum Peynirinin Yapım ve Olgunlaştırma Aşamalarında Saptanan Mikrobiyolojik ve Kimyasal Değerler

5.2.1. Mikrobiyolojik Değerler

Deneysel tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması esnasındaki mikrobiyolojik değişiklikler Tablo 3, 4, 5’de verildi.

5.2.1.1. *Salmonella* Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *Salmonella* üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 3 incelenecek olursa inokülasyon miktarı yaklaşık $6.63 \pm 0.32 \log_{10}$ kob/ml bulundu. Deneysel tulum peyniri yapımının 1. gününde *Salmonella* sayısında bir miktar artış ($7.95 \pm 0.024 \log_{10}$ kob/g) olup, istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$). Ancak yapımın 2. gününde sayı $3.82 \pm 1.12 \log_{10}$ kob/g bulundu ($p<0.001$). Yapımın 3. gününe yani olgunlaştırmanın 0. günde ise *Salmonella* sayısı $5.29 \pm 1.56 \log_{10}$ kob/g tespit edildi. Daha sonraki olgunlaştırma günlerinde ise sürekli azaldı. Olgunlaştırmanın 60. gününde deneysel tulum peyniri örneklerinin 2 tekrarında zenginleştirme işlemi sonucu negatif bulunurken 1 tekrarda pozitif bulundu. Fakat 90. güne gelindiğinde ise tüm tekraralarda zenginleştirme işlemi sonrası negatif bulundu. Tulum peynirinin yapım ve olgunlaştırma işlemleri sırasında *Salmonella* sayısında yaklaşık $6 \log_{10}$ kob/g azalma meydana gelerek tespit edilebilir seviyenin altına düştü.

5.2.1.2. *E. coli* O157:H7 Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *E. coli* O157:H7 üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 4’de görüldüğü gibi inokülasyon sonrası patojen seviyesi yaklaşık $7.08\pm 0.29 \log_{10}$ kob/ml bulundu. Yapımın 1. gününde, çiğ sütteki inokülasyon miktarı ile kıyaslanacak olursa, *E. coli* O157:H7 sayısında istatistiksel anlamda bir artış ($7.64\pm 0.12 \log_{10}$ kob/g) meydana gelmedi ($p>0.05$). *E. coli* O157:H7 sayısı yapımın 2. gününden, olgunlaştırmanın 90. gününe kadar sürekli bir azalış izledi ve 90. gün $3.15\pm 0.51 \log_{10}$ kob/g ile olgunlaştırma süresini tamamladı. Yapımın 2. günü, olgunlaştırmanın 0., 30., 60. ve 90. günleri arasında istatistiksel azalma önemli ($p<0.05$) bulundu (Tablo 4). Çiğ süte inokülasyondan, olgunlaştırmanın 90. gününe kadar *E. coli* O157:H7 sayısında yaklaşık $3.93 \log_{10}$ kob/g’lık azalma meydana geldi.

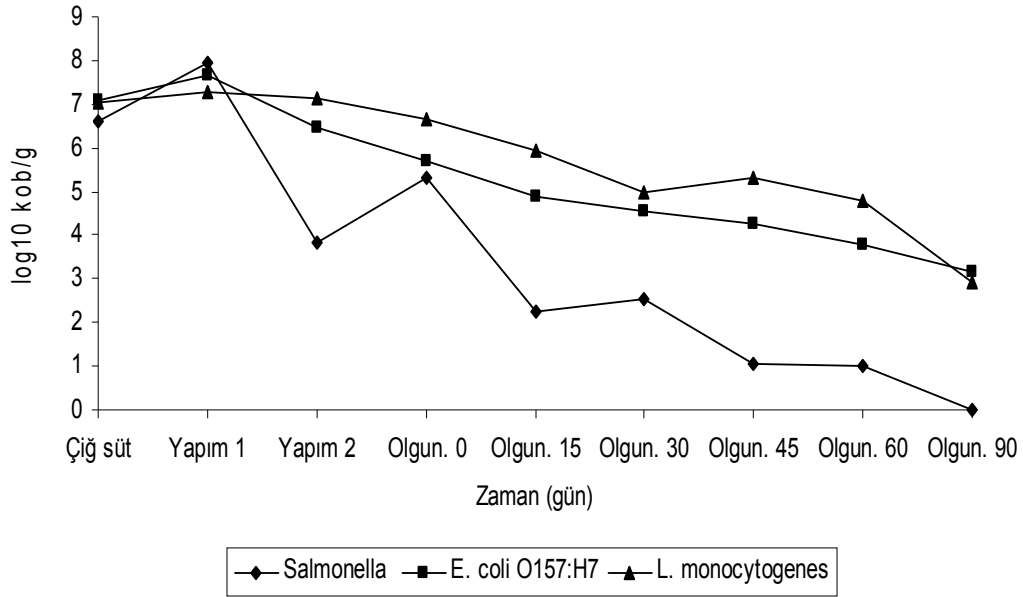
5.2.1.3. *Listeria monocytogenes* Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 5 incelenecek olursa, inokülasyon miktarı yaklaşık $7.03\pm 0.37 \log_{10}$ kob/ml bulundu. Tulum peynirinin yapımı esnasında 1. günde *L. monocytogenes* sayısında artış olsa da istatistiksel anlamda bir farklılık saptanmadı. Olgunlaştırmanın 0. gününden ($6.67\pm 0.31 \log_{10}$ kob/g) 90. gününe ($2.91\pm 0.27 \log_{10}$ kob/g) kadar sürekli bir azalma gözlemlendi. Olgunlaştırmanın 15., 30., 60., ve 90. günleri arasında istatistiksel anlamda önemli azalma görüldü ($p<0.05$). Çiğ

süte inokülasyondan, olgunlaştırmanın 90. gününe kadar *Listeria monocytogenes* sayısında yaklaşık 4.12 log₁₀ kob/g'lık azalma meydana geldi.

Şekil 3. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki patojen bakterilerin sayısındaki değişimler (log₁₀ kob/g) (n:6).

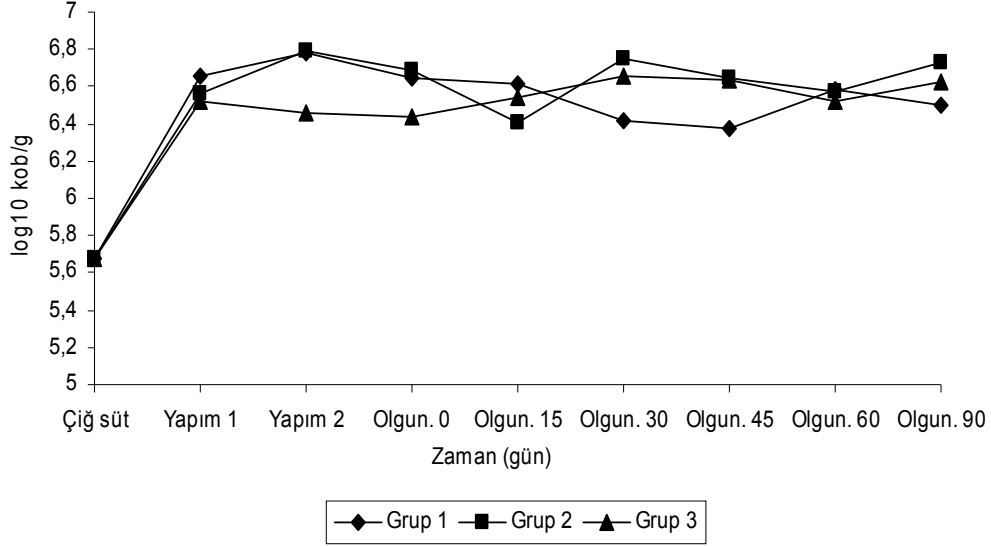


5.2.1.4. *Enterococcus* spp. Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *Enterococcus* spp. sayısı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 5.68 ± 0.24 log₁₀ kob/ml olan *Enterococcus* spp. sayısında, yapımın 1 gününde önemli bir artış saptandı ($p < 0.05$), fakat daha sonraki analiz günlerinde önemli bir artış saptanmadı.

Şekil 4. Kontamine çığ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki *Enterococcus* spp. sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

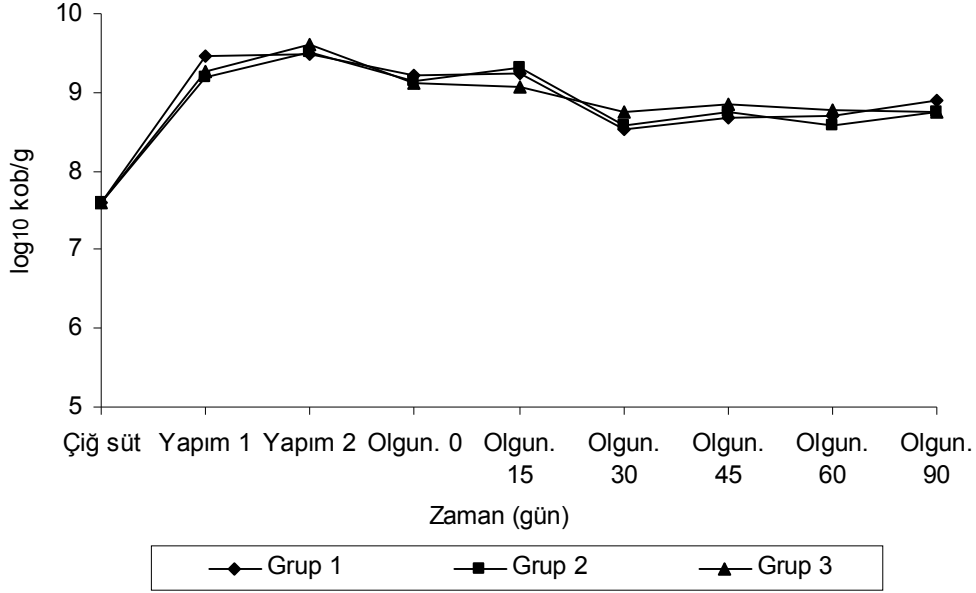


5.2.1.5. *Lactococcus* spp. Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *Lactococcus* spp. sayısı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çığ sütlerde 7.60 ± 0.38 \log_{10} kob/ml olan *Lactococcus* spp. sayısının, yapım aşamalarında her 3 grupta da arttığı ($p < 0.05$), en yüksek sayıya ise yapımın 2. gününde ulaştığı bulundu (1. grup: 9.49, 2. grup: 9.52, 3. grup: 9.61 \log_{10} kob/g). Olgunlaştırma boyunca sayılarında (2. grup hariç) azalma meydana geldiği fakat bunun önemli olmadığı saptandı ($p > 0.005$). 2. grupta 30. gün ile diğer olgunlaştırmanın olduğu günler arasında (45., 60., 90. günler) önemli farklılık bulundu ($p < 0.05$). Fakat olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki *Lactococcus* spp. sayıları birbirine çok yakın bulundu (1. grup: 8.90, 2. grup: 8.74, 3. grup: 8.74 \log_{10} kob/g).

Şekil 5. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki *Lactococcus* spp. sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

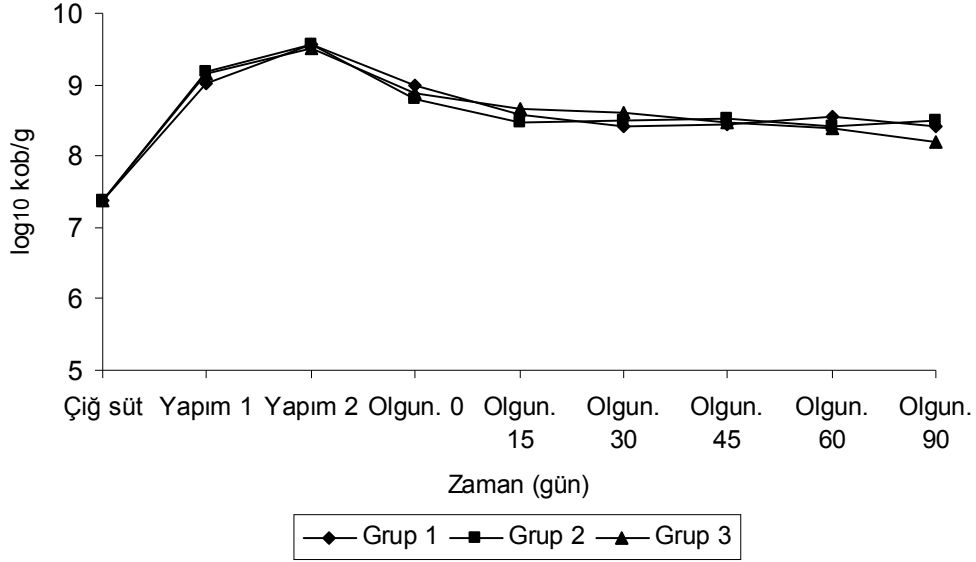


5.2.1.6. *Lactobacillus* spp. Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *Lactobacillus* spp. sayısı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 7.60 ± 0.38 \log_{10} kob/ml olan *Lactobacillus* spp. sayısı, yapım aşamalarında her 3 grupta da arttığı ($p < 0.05$), en yüksek sayıya ise yapımın 2. gününde ulaştığı tespit edildi (1. grup: 9.55, 2. grup: 9.55, 3. grup: 9.52 \log_{10} kob/g). Olgunlaştırma boyunca sayılarında azalma meydana geldiği fakat bunun önemli olmadığı saptandı ($p > 0.005$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki *Lactobacillus* spp. sayıları birbirine yakın bulundu (1. grup: 8.42, 2. grup: 8.50, 3. grup: 8.37 \log_{10} kob/g).

Şekil 6. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki *Lactobacillus* spp. sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

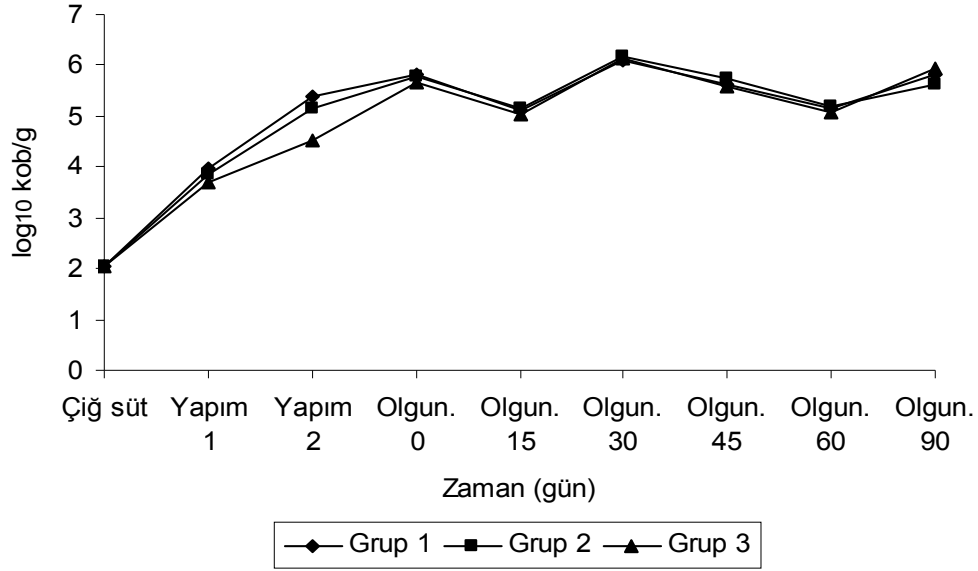


5.2.1.7. Maya Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), maya sayısı üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 2.04 ± 0.24 \log_{10} kob/ml olan maya sayısının, yapım aşamalarının her gününde (3. grup hariç) önemli derecede arttığı ($p<0.05$), ilerleyen olgunlaştırma günlerinde ise sayılarında istatistiksel anlamda önemli bir değişiklik olmadığı saptandı ($p>0,05$). 3. grupta ise yapımın 1. gününde önemli bir artış olduğu ($p<0.05$), ancak ilerleyen yapım ve olgunlaştırma günlerinde önemli bir artış olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki maya sayıları birbirine yakın bulundu (1. grup: 5.83, 2. grup: 5.61, 3. grup: 5.93 \log_{10} kob/g).

Şekil 7. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki maya sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

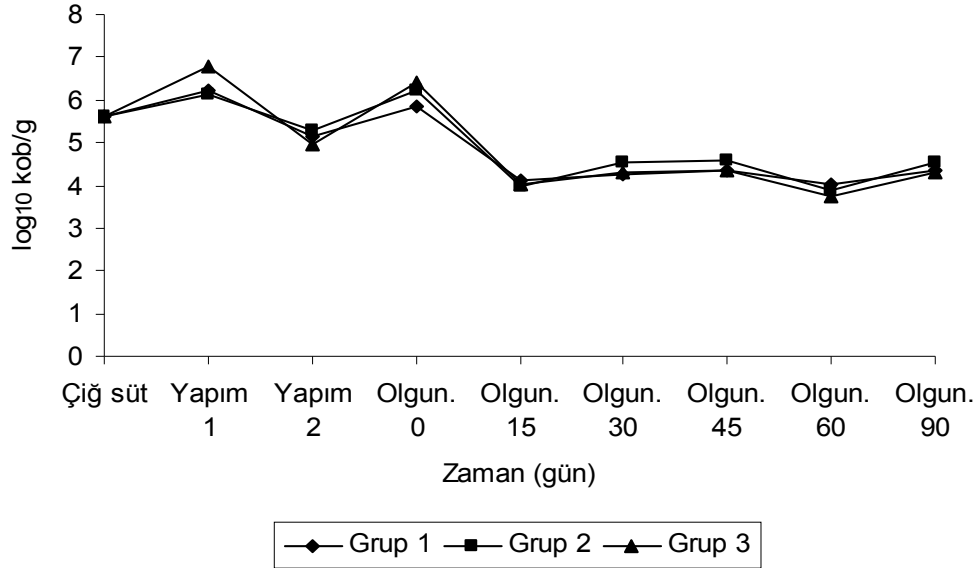


5.2.1.8. *Staphylococcus* spp. Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), *Staphylococcus* spp. sayısı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Her üç grupta da çiğ sütlerde $5.61 \pm 0.24 \log_{10}$ kob/ml olan *Staphylococcus* spp. sayısının, yapım aşamalarının ilk (yapım 1. gün) gününde (2. grup hariç) önemli derecede arttığı ($p < 0.05$), ancak olgunlaştırmanın 15. gününden sonra istatistiki olarak önemli miktarda azaldığı belirlendi. 2. grupta ise *Staphylococcus* spp. sayısı tulum peynirinin yapımı esnasında sayısının değişmediği, olgunlaştırmanın 15. gününden sonra sayısının önemli miktarda azaldığı anlaşıldı ($p < 0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki *Staphylococcus* spp. birbirine yakın bulundu (1. grup: 4.36, 2. grup: 4.52, 3. grup: 4.29 \log_{10} kob/g).

Şekil 8. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki *Staphylococcus* spp. sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

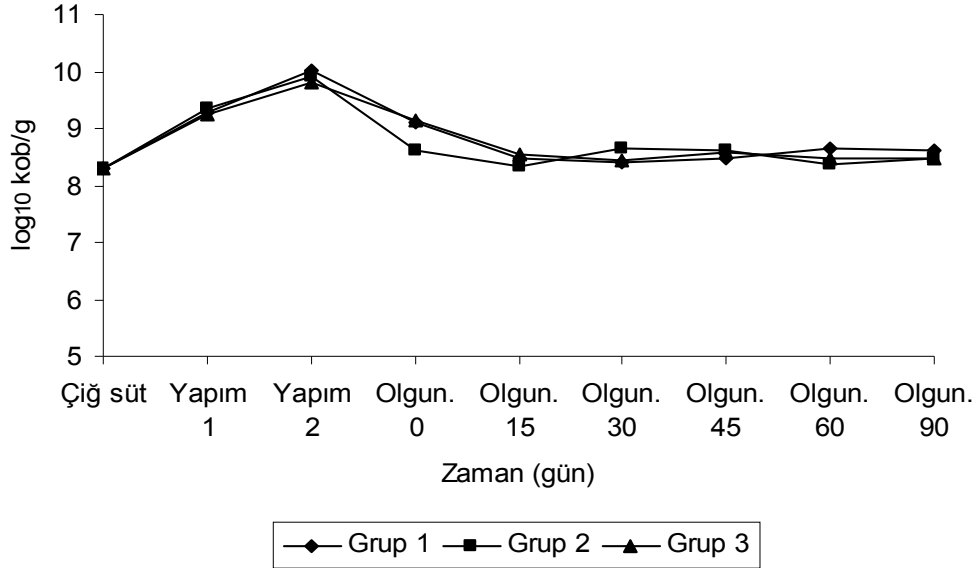


5.2.1.9. Toplam Aerob Mezofil Bakteri Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), aerob mezofil bakteri sayısı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 8.29 ± 0.19 \log_{10} kob/ml olan toplam aerob mezofil bakteri sayısının, yapım aşamalarının her gününde (2. grupta yapımın 2. gününde) önemli derecede arttığı ($p < 0.05$), en yüksek sayıya ise yapımın 2. gününde ulaştığı belirlendi (1. grup: 10.2, 2. grup: 9.91, 3. grup: 9.82 \log_{10} kob/g). Olgunlaştırmanın 0. gününden sonra ise sayılarının önemli derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki toplam aerob mezofil canlı sayısı birbirine yakın bulundu (1. grup: 8.61, 2. grup: 8.48, 3. grup: 8.46 \log_{10} kob/g).

Şekil 9. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki Toplam Aerob Mezofil Bakteri sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

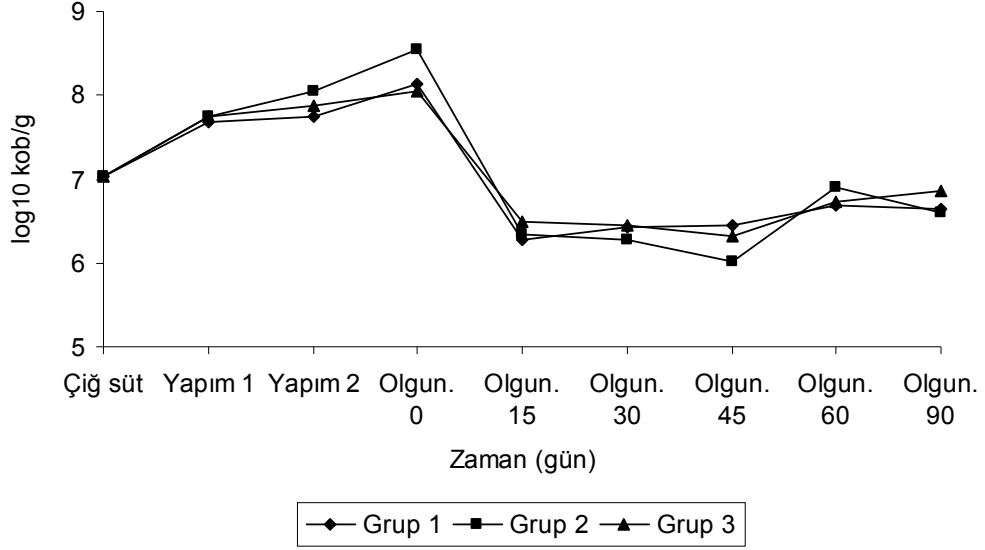


5.2.1.10. Psikrofil Aerob Bakteri Sayısı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), psikrofil aerob bakteri sayısı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 7.04 ± 0.08 \log_{10} kob/ml olan psikrofil aerob bakteri sayısının, yapım aşamaları sırasında önemli derecede arttığı ($p < 0.05$), en yüksek sayıya ise olgunlaştırmanın ilk gününde (0. gün) ulaştığı belirlendi (1. grup: 8.13, 2. grup: 8.54, 3. grup: 8.04 \log_{10} kob/g). Olgunlaştırmanın 15. gününden sonra ise sayılarının önemli derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki psikrofil aerob bakteri sayısı birbirine yakın bulundu (1. grup: 6.65, 2. grup: 6.61, 3. grup: 6.85 \log_{10} kob/g).

Şekil 10. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki Psikrofil Aerob Bakteri sayısındaki değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).



5.2.1.11. Koliform Bakteri Sayısı

Tablo 3,4,5 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 5.22 ± 0.38 \log_{10} kob/ml olan koliform sayısı, daha sonraki analiz günlerinde incelenmemiştir.

Tablo 3: *Salmonella* inoküle edilmiş (grup 1) çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki mikrobiyolojik değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

Mikroorganizma	Yapım Aşamaları (gün)			Olgunlaştırma Süresi (gün)					
	Çiğ Süt*	Yapım 1	Yapım 2	0	15	30	45	60	90
<i>Salmonella</i>	6.63±0.32 ^{ab}	7.95±0.24 ^a	3.82±1.12 ^{bc}	5.29±1.56 ^b	2.24±0.95 ^{cd}	2.54±1.32 ^c	1.03±0.20 ^d	1.02±0.02 ^d	<1.0
<i>Enterococcus</i> spp.	5.68±0.24 ^b	6.66±0.24 ^a	6.78±0.31 ^a	6.65±0.37 ^a	6.61±0.36 ^a	6.42±0.32 ^a	6.38±0.26 ^a	6.58±0.23 ^a	6.50±0.19 ^a
<i>Lactococcus</i> spp.	7.60±0.38 ^c	9.47±0.30 ^a	9.49±0.07 ^a	9.21±0.20 ^{ab}	9.25±0.38 ^{ab}	8.53±0.18 ^b	8.67±0.28 ^b	8.70±0.19 ^b	8.90±0.24 ^b
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.39±0.54 ^c	9.01±0.12 ^{ab}	9.55±0.06 ^a	9.00±0.20 ^{ab}	8.59±0.45 ^b	8.41±0.35 ^b	8.45±0.31 ^b	8.56±0.42 ^b	8.42±0.13 ^b
Maya	2.04±0.24 ^c	3.98±0.95 ^b	5.37±0.32 ^a	5.83±1.36 ^a	5.13±0.57 ^{ab}	6.08±0.95 ^a	5.61±0.92 ^{ab}	5.14±0.82 ^{ab}	5.83±0.19 ^a
<i>Staphylococcus</i> spp.	5.61±0.24 ^{ab}	6.23±0.34 ^a	5.13±0.28 ^b	5.87±0.44 ^{ab}	4.10±0.60 ^c	4.28±0.73 ^{bc}	4.34±0.73 ^{bc}	4.04±0.18 ^c	4.36±0.33 ^{bc}
Toplam aerob mezofil bakteri.	8.29±0.19 ^c	9.28±0.09 ^b	10.2±0.54 ^a	9.10±0.15 ^{bc}	8.46±0.29 ^c	8.40±0.24 ^c	8.49±0.25 ^c	8.65±0.36 ^c	8.61±0.40 ^c
Psikrofil aerob bakteri	7.04±0.08 ^b	7.69±0.45 ^{ab}	7.74±0.29 ^{ab}	8.13±0.65 ^a	6.28±0.41 ^b	6.42±0.47 ^b	6.44±0.35 ^b	6.68±0.29 ^b	6.65±0.31 ^b

*: Patogen seviyesi inokülasyondan sonra tespit edilmiştir.

a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemlidir ($p<0.05$)

n: Analize alınan örnek sayısı.

AY: Analiz yapılmadı

Tablo 4: *E. coli* O157:H7 inoküle edilmiş (grup 2) çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki mikrobiyolojik değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

Mikroorganizma	Yapım Aşamaları (gün)			Olgunlaştırma Süresi (gün)					
	Çiğ Süt*	Yapım 1	Yapım 2	0	15	30	45	60	90
<i>E. coli</i> O157:H7	7.08±0.29 ^{ab}	7.64±0.12 ^a	6.48±0.16 ^b	5.70±0.21 ^c	4.89±0.84 ^{cd}	4.57±0.45 ^d	4.24±0.59 ^{de}	3.76±0.50 ^e	3.15±0.51 ^f
<i>Enterococcus</i> spp.	5.68±0.24 ^b	6.56±0.34 ^a	6.79±0.19 ^a	6.69±0.25 ^a	6.41±0.28 ^a	6.75±0.35 ^a	6.65±0.48 ^a	6.57±0.36 ^a	6.73±0.22 ^a
<i>Lactococcus</i> spp.	7.60±0.38 ^c	9.19±0.29 ^{ab}	9.52±0.11 ^a	9.15±0.32 ^{ab}	9.31±0.29 ^a	8.59±0.30 ^b	8.75±0.36 ^b	8.59±0.24 ^b	8.74±0.19 ^b
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.39±0.54 ^c	9.19±0.08 ^{ab}	9.55±0.08 ^a	8.79±0.27 ^b	8.47±0.34 ^b	8.51±0.19 ^b	8.52±0.28 ^b	8.41±0.27 ^b	8.50±0.27 ^b
Maya	2.04±0.24 ^c	3.87±0.84 ^b	5.16±0.15 ^a	5.78±0.30 ^a	5.16±0.35 ^a	6.16±0.98 ^a	5.73±0.82 ^a	5.21±0.79 ^a	5.61±0.40 ^a
<i>Staphylococcus</i> spp.	5.61±0.24 ^{ab}	6.11±0.28 ^a	5.27±0.45 ^{ab}	6.24±1.01 ^a	3.97±0.61 ^b	4.56±0.94 ^b	4.59±0.76 ^b	3.86±0.17 ^b	4.52±0.41 ^b
Toplam aerob mezofil bakteri.	5.29±0.19 ^b	9.34±0.17 ^{ab}	9.91±0.39 ^a	8.60±1.18 ^b	8.33±0.21 ^b	8.64±0.23 ^b	8.63±0.26 ^b	8.37±0.36 ^b	8.48±0.31 ^b
Psikrofil aerob bakteri	7.04±0.08 ^b	7.74±0.42 ^{ab}	8.05±0.21 ^a	8.54±0.91 ^a	6.34±0.09 ^{bc}	6.28±0.37 ^{bc}	6.01±0.68 ^c	6.91±0.19 ^{bc}	6.61±0.38 ^{bc}

*: Patojen seviyesi inokülasyondan sonra tespit edilmiştir.

a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$)

n: Analize alınan örnek sayısı

AY: Analiz yapılmadı

Tablo 5: *Listeria monocytogenes* inoküle edilmiş (grup 3) çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki mikrobiyolojik değişimler (\log_{10} kob/g) (n:6).

Mikroorganizma	Yapım Aşamaları (gün)			Olgunlaştırma Süresi (gün)					
	Çiğ Süt*	Yapım 1	Yapım 2	0	15	30	45	60	90
<i>Listeria monocytogenes</i>	7.03±0.37 ^a	7.30±0.20 ^a	7.12±0.05 ^a	6.67±0.31 ^{ab}	5.95±0.16 ^b	4.96±0.56 ^c	5.29±0.55 ^{bc}	4.77±0.85 ^c	2.91±0.27 ^d
<i>Enterococcus</i> spp.	5.68±0.24 ^b	6.52±0.27 ^a	6.46±0.12 ^a	6.44±0.53 ^a	6.54±0.33 ^a	6.66±0.37 ^a	6.64±0.40 ^a	6.52±0.33 ^a	6.62±0.24 ^a
<i>Lactococcus</i> spp.	7.60±0.38 ^c	9.26±0.22 ^{ab}	9.61±0.17 ^a	9.11±0.12 ^{ab}	9.08±0.12 ^{ab}	8.76±0.25 ^b	8.86±0.30 ^b	8.77±0.34 ^b	8.74±0.16 ^b
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.39±0.54 ^c	9.16±0.11 ^{ab}	9.52±0.14 ^a	8.89±0.09 ^b	8.65±0.22 ^b	8.60±0.24 ^b	8.47±0.27 ^b	8.40±0.37 ^b	8.37±0.35 ^b
Maya	2.04±0.24 ^c	3.69±0.69 ^b	4.53±0.56 ^b	5.65±0.68 ^{ab}	5.04±0.28 ^{ab}	6.12±1.11 ^a	5.59±1.14 ^{ab}	5.08±0.76 ^{ab}	5.93±0.39 ^a
<i>Staphylococcus</i> spp.	5.61±0.24 ^b	6.77±0.29 ^a	4.98±0.38 ^{bc}	6.39±1.09 ^{ab}	4.02±0.26 ^c	4.30±0.66 ^c	4.36±0.62 ^c	3.76±0.33 ^c	4.29±0.66 ^c
Toplam aerob mezofil bakteri.	8.29±0.19 ^c	9.23±0.11 ^b	9.82±0.58 ^a	9.15±0.12 ^b	8.53±0.22 ^c	8.43±0.27 ^c	8.58±0.26 ^c	8.47±0.15 ^c	8.46±0.17 ^c
Psikrofil aerob bakteri	7.04±0.08 ^b	7.75±0.49 ^{ab}	7.87±0.14 ^a	8.04±0.70 ^a	6.49±0.22 ^b	6.45±0.19 ^b	6.32±0.38 ^b	6.73±0.33 ^b	6.85±0.25 ^b

*: Patogen seviyesi inokülasyondan sonra tespit edilmiştir.

a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$)

n: Analize alınan örnek sayısı

AY: Analiz yapılmadı

5.2.2. Kimyasal Değerler

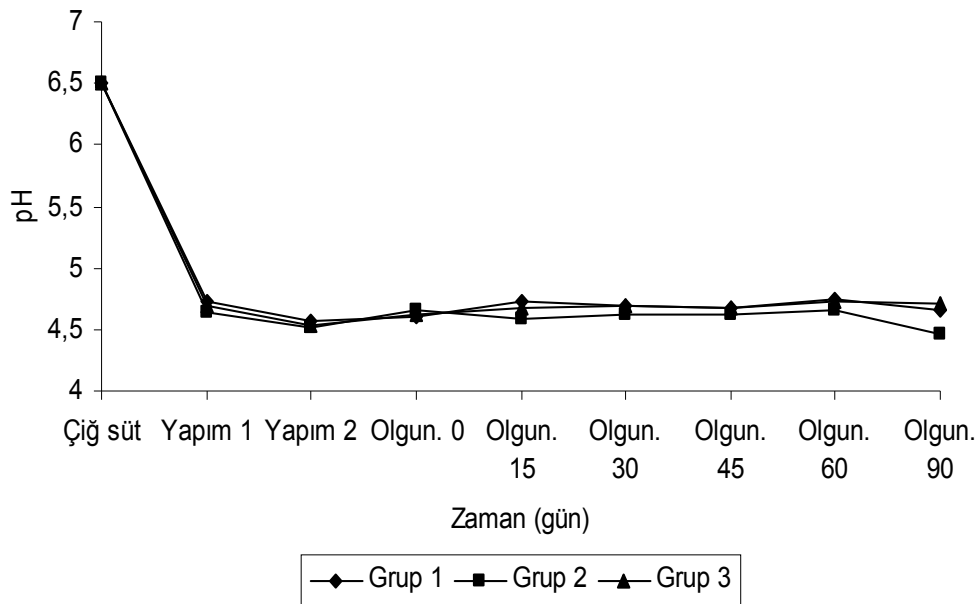
Deneysel tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması esnasındaki kimyasal değişiklikler Tablo 6, 7, 8'de verildi.

5.2.2.1. pH Değeri

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), pH değeri üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 6.51 ± 0.45 olan pH değeri, yapım aşamasının ilk gününde önemli derecede düştüğü ($p<0.05$) (1. grup: 4.73, 2. grup: 4.64, 3. grup: 4.70), diğer yapım aşamaları ve olgunlaştırma günleri arasında istatistiki bir düşüşün olmadığı saptandı ($p>0.05$). Olgunlaştırmanın son gününde pH değerleri 1. grupta 4.65 ± 0.11 , 2. grupta 4.46 ± 0.22 , 3. grupta 4.71 ± 0.14 olarak kaydedildi ve değerler birbirine çok yakın bulundu.

Şekil 11. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki pH değeri değişimleri (n:6).

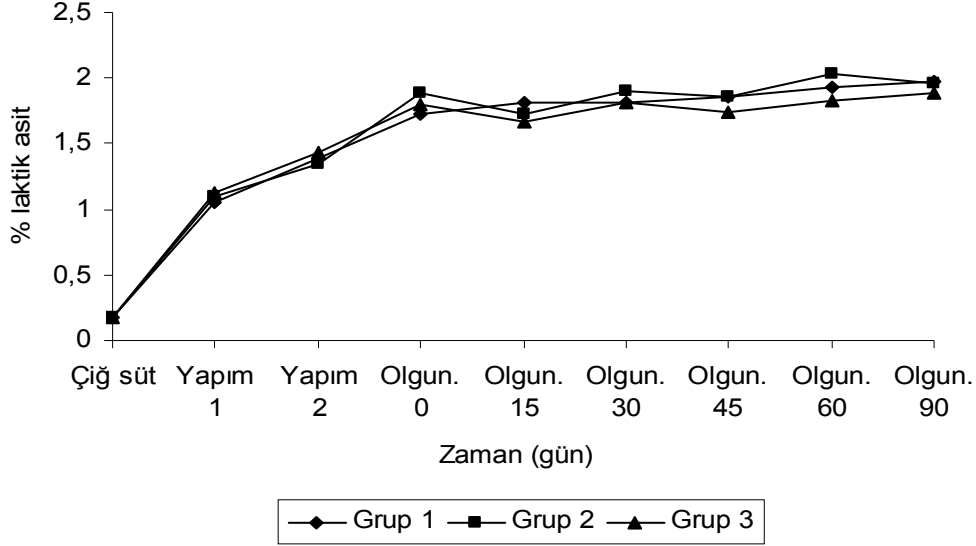


5.2.2.2. Toplam Asitlik Miktarı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), toplam asit değeri (% la.) üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursa, her üç grupta da çiğ sütlerde 0.17 ± 0.11 la. olan toplam asitlik miktarı, yapım aşamasının ilk gününde önemli derecede düştüğü ($p<0.05$) (1. grup: %1.05, 2. grup: %1.09, 3. grup: %1.13), yapım aşamalarının diğer günlerinde ise istatistiki bir artış olmadığı saptandı ($p>0.05$). Olgunlaştırmanın ilk günü olan 0. günde 2. ve 3. gruplarda önemli bir artış olduğu, ancak diğer olgunlaştırma günlerinde istatistiksel derecede önemli bir artış olmadığı bulundu ($p>0.05$). 1. grupta ise yapımın 2. gününden olgunlaştırmanın 45. gününe kadar önemli bir artış olmadığı, ancak 60. günde istatistiksel açıdan önemli bir artış olduğu saptandı ($p<0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde ise 60. gün ile arasında bir değişikliğin olmadığı bulundu. Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki total asitlik değerleri birbirine yakın olduğu belirlendi (1. grup: %1.98, 2. grup: %1.96, 3. grup: %1.89 la.).

Şekil 12. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki % laktik asit miktarındaki değişimler (n:6).

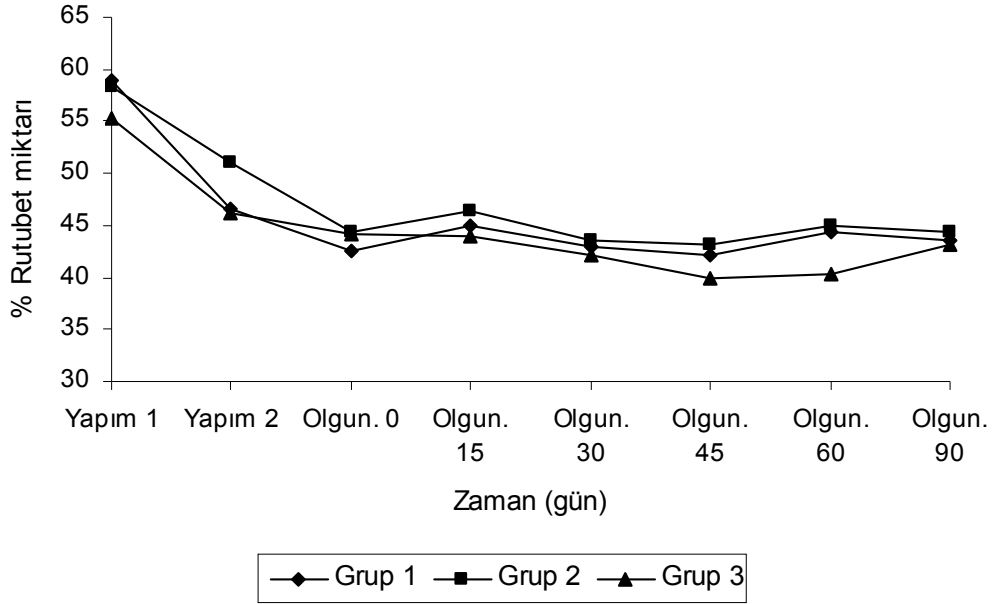


5.2.2.3. Rutubet Oranı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), rutubet oranı (%) üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursa rutubet tayini yapımın 1. gününden itibaren yapılmaya başlandı. Yapımın 1. günü 1. grupta % 58.95 ± 3.40 , 2. grupta % 58.32 ± 1.21 , 3. grupta % 55.20 ± 5.50 olarak bulundu. 1. grupta yapımın 2. günü, 3. grupta ise olgunlaştırmanın ilk günü (0. gün) önemli bir düşüş belirlendi ($p < 0.05$). Ancak olgunlaştırmanın diğer günlerinde istatistiksel anlamda önemli bir düşüş olmadı. 3. grupta ise yapımın 2. günü ve olgunlaştırmanın 30. günü rutubet oranında önemli bir düşüş tespit edildi ($p < 0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki rutubet oranı birbirine çok yakın bulundu (1. grup: %44.34, 2. grup: %43.12, 3. grup: %43.65).

Şekil 13. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki % rutubet miktarındaki değişimler (n:6).

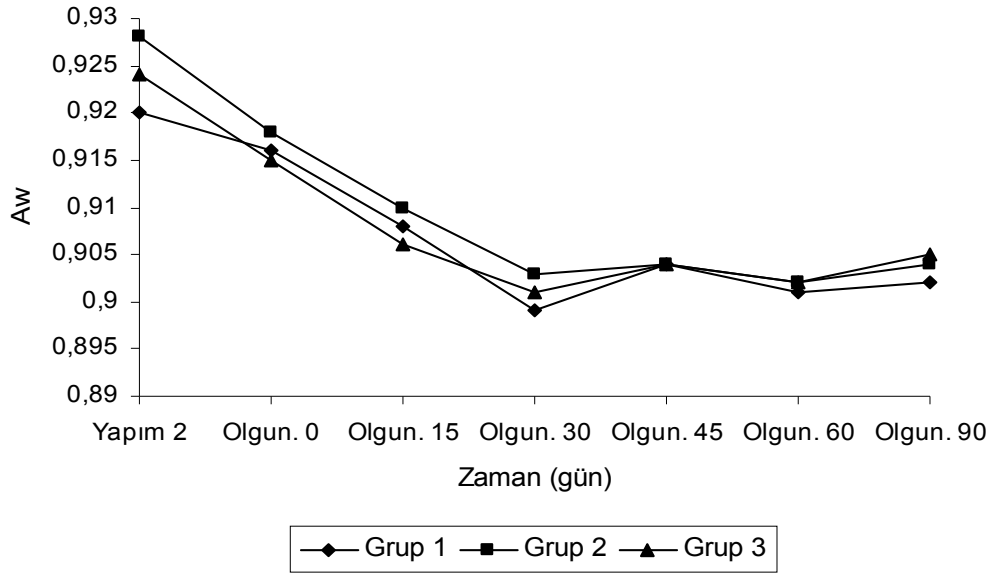


5.2.2.4. Su Aktivitesi Değeri (a_w)

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), a_w miktarı üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursak, su aktivitesi tayini yapımın 2. gününden itibaren yapılmaya başlandı. Yapımın 2. günü 1. grupta 0.924 ± 0.005 , 2. grupta 0.928 ± 0.007 ve 3. grupta 0.924 ± 0.002 olarak bulundu. Her 3 grupta da olgunlaştırmanın 15. günü istatistiksel anlamda önemli bir düşüş bulundu ($p < 0.05$). Olgunlaştırmanın 15. gününden 90. gününe kadar ise önemli bir değişiklik bulunmadı ($p > 0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki su aktivitesi değeri birbirine çok yakın bulundu (1. grup: 0.902, 2.grup: 0.904, 3. grup: 0.905).

Şekil 14. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki a_w miktarındaki değişimler (n:6).

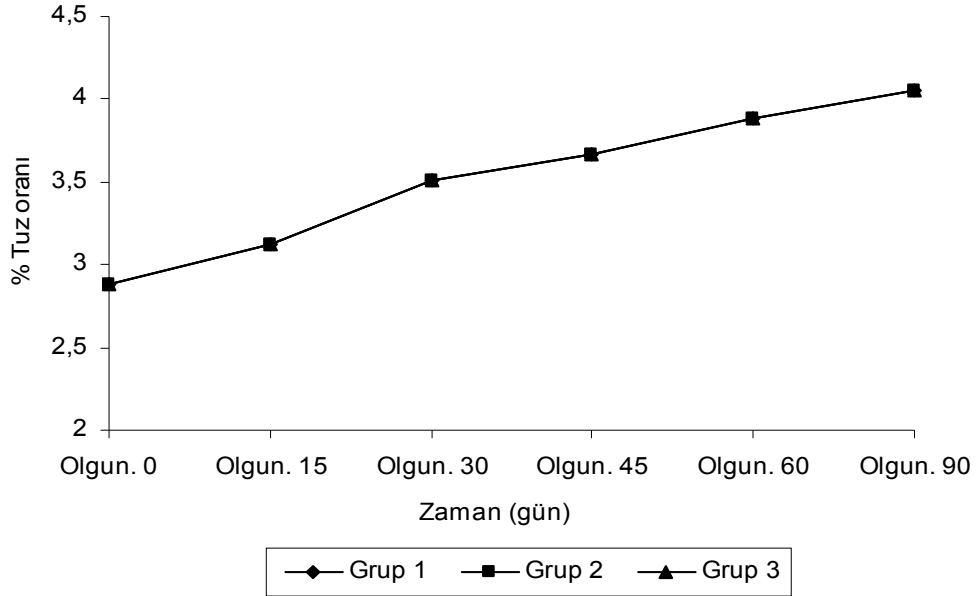


5.2.2.5. Tuz Oranı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), tuz oranı (%) üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursa tuz tayini olgunlaştırmanın ilk gününden (0. gün) itibaren yapılmaya başlandı. Olgunlaştırmanın ilk günü tuz oranı 1. grupta % 2.88 ± 0.13 , 2. grupta % 2.88 ± 0.13 ve 3. grupta % 2.88 ± 0.13 olarak bulundu. Her 3 grupta da olgunlaştırmanın 30. ve 90. günü istatistiksel açıdan önemli artış tespit edildi ($p<0.05$). En yüksek değerler olgunlaşmanın 90. gününde elde edildi. Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki tuz oranı aynı bulundu (1.grup: % 4.05, 2. grup: % 4.05, 3. grup: % 4.05).

Şekil 15. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırılması sırasındaki % tuz oranı miktarındaki değişimler (n:6).

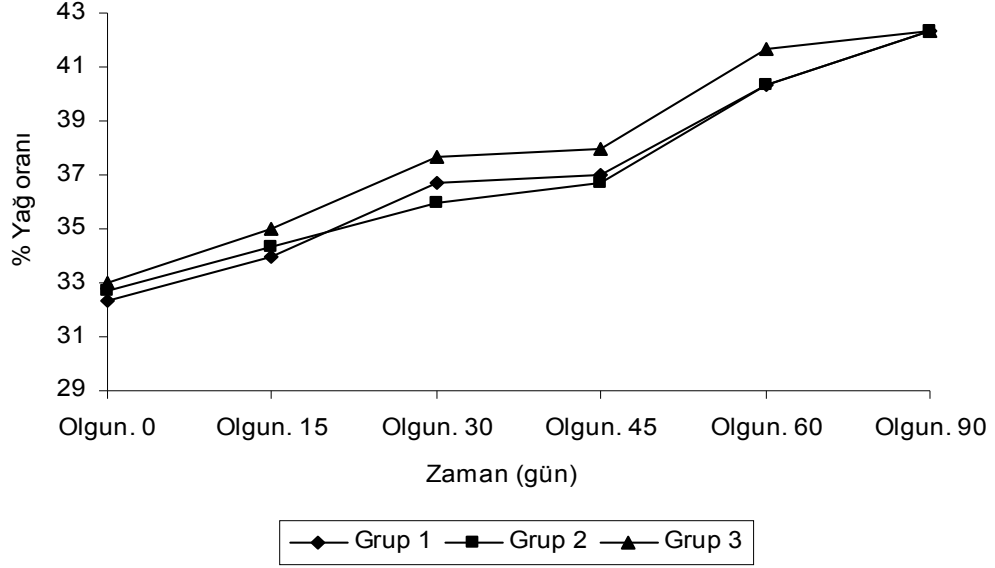


5.2.2.6. Yağ Miktarı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), yağ miktarı (%) üzerine etkisi önemli ($p<0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursa yağ tayini olgunlaştırmanın ilk gününden (0. gün) itibaren yapılmaya başlandı. Olgunlaştırmanın ilk günü yağ miktarı 1. grupta % 32.33 ± 3.51 , 2. grupta % 32.67 ± 1.15 ve 3. grupta % 33.00 ± 3.00 olarak bulundu. Olgunlaştırma periyodu boyunca 1. grupta olgunlaştırmanın 90. günü, 2. grupta olgunlaştırmanın 45. ve 60. günleri ve 3. grupta ise olgunlaştırmanın 60. günü istatistiksel anlamda önemli artış olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki yağ miktarı aynı bulundu (1. grup: % 42.33, 2. grup: % 42.33, 3. grup: % 42.33).

Şekil 16. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırılması sırasındaki % yağ miktarındaki değişimler (n:6).

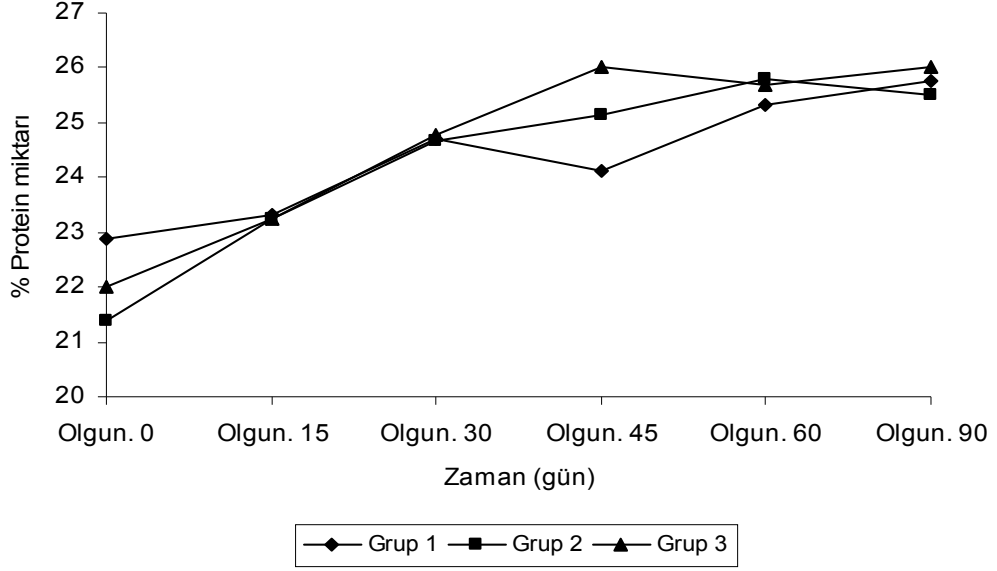


5.2.2.7. Protein Miktarı

Yapılan istatistiksel analizlerde her 3 gruptaki deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırma süresinin (zaman), protein miktarı (%) üzerine etkisi önemli ($p < 0.001$) bulundu.

Tablo 6,7,8 incelenecek olursa protein tayini olgunlaştırmanın ilk gününden (0. gün) itibaren yapılmaya başlandı. Olgunlaştırmanın ilk günü protein miktarı 1. grupta % 22.87 ± 0.83 , 2. grupta % 21.37 ± 1.36 ve 3. grupta % 22.00 ± 0.72 olarak bulundu. Olgunlaştırma periyodu boyunca 1. ve 2. grupta olgunlaştırmanın 90. günleri ve 3. grupta ise olgunlaştırmanın 45. günü istatistiksel anlamda önemli artış olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Olgunlaştırmanın 90. gününde her 3 gruptaki protein miktarı yakın bulundu (1. grup: % 25.77, 2. grup: % 25.50, 3. grup: % 26.00).

Şekil 17. Kontamine çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin olgunlaştırılması sırasındaki % protein miktarındaki değişimler (n:6).



Tablo 6. *Salmonella* inoküle edilmiş (grup 1) çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki kimyasal değişimler (n:6).

Özellik	Yapım Aşamaları (gün)			Olgunlaştırma Süresi (gün)					
	Çiğ Süt	Yapım 1	Yapım 2	0	15	30	45	60	90
pH	6.51±0.45 ^a	4.73 ±0.21 ^b	4.57±0.13 ^b	4.60 ± 0.12 ^b	4.72 ± 0.06 ^b	4.70 ± 0.12 ^b	4.68 ± 0.17 ^b	4.75 ± 0.13 ^b	4.65 ±0.11 ^b
Asitlik* (%)	0.17±0.01 ^c	1.05 ±0.03 ^b	1.39±0.26 ^b	1.72 ±0.07 ^{ab}	1.8 1±0.24 ^{ab}	1.82 ± 0.21 ^{ab}	1.85 ±0.13 ^{ab}	1.93 ±0.25 ^a	1.98 ±0.09 ^a
Rutubet (%)	AY	58.95±3.4 ^a	46.65±1.79 ^b	42.63 ± 3.45 ^b	44.96 ± 2.49 ^b	43.03 ± 2.55 ^b	42.14 ± 2.27 ^b	44.33 ± 3.38 ^b	43.65 ± 3.05 ^b
a_w	AY	AY	0.92±0.005 ^a	0.916±0.006 ^{ab}	0.908 ±0.005 ^b	0.899 ±0.001 ^b	0.904 ±0.004 ^b	0.901 ±0.003 ^b	0.902 ±0.006 ^b
Tuz (%)	AY	AY	AY	2.88 ±0.13 ^c	3.12 ±0.14 ^{bc}	3.51 ±0.01 ^b	3.67 ±0.27 ^{ab}	3.89 ±0.13 ^{ab}	4.05 ±0.14 ^a
Yağ (%)	AY	AY	AY	32.33 ±3.51 ^b	34.00 ±1.73 ^b	36.67 ±0.58 ^b	37.00 ±2.64 ^{ab}	40.33 ±0.58 ^{ab}	42.33 ±0.58 ^a
Protein (%)	AY	AY	AY	22.87 ±0.83 ^b	23.3 ±0.87 ^{ab}	24.70 ±0.17 ^{ab}	24.13 ±1.68 ^{ab}	25.33 ±0.96 ^{ab}	25.77 ±0.50 ^a

*: Asitlik miktarı laktik asit cinsinden hesaplanmıştır.

a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir (p<0.05).

n: Analize alınan örnek sayısı.

AY: Analiz yapılmadı.

Tablo 7. *E. coli* O157:H7 inoküle edilmiş (grup 2) çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki kimyasal değişimler (n:6).

Özellik	Yapım Aşamaları (gün)			Olgunlaştırma Süresi (gün)					
	Çiğ Süt	Yapım 1	Yapım 2	0	15	30	45	60	90
pH	6.51±0.51 ^a	4.64±0.14 ^b	4.51±0.08 ^b	4.66±0.25 ^b	4.59±0.04 ^b	4.62±0.08 ^b	4.63±0.12 ^b	4.65±0.11 ^b	4.46±0.22 ^b
Asitlik* (%)	0.17±0.01 ^c	1.09±0.04 ^b	1.35±0.35 ^b	1.89±0.19 ^a	1.72±0.28 ^{ab}	1.90±0.13 ^a	1.85±0.06 ^a	2.03±0.08 ^a	1.96±0.06 ^a
Rutubet (%)	AY	58.32±1.21 ^a	50.94±3.39 ^b	44.31±1.32 ^{bc}	46.35±1.88 ^{bc}	43.58±1.55 ^c	43.17±1.48 ^c	44.87±2.55 ^c	44.34±3.52 ^c
a_w	AY	AY	0.928±0.007 ^a	0.918±0.003 ^{ab}	0.910±0.003 ^b	0.903±0.005 ^b	0.904±0.006 ^b	0.902±0.003 ^b	0.904±0.005 ^b
Tuz (%)	AY	AY	AY	2.88±0.13 ^c	3.12±0.14 ^{bc}	3.51±0.01 ^b	3.67±0.27 ^{ab}	3.89±0.13 ^{ab}	4.05±0.14 ^a
Yağ (%)	AY	AY	AY	32.67±1.15 ^c	34.33±1.53 ^{bc}	36.00±0.00 ^{bc}	36.67±1.53 ^b	40.33±2.08 ^a	42.33±0.58 ^a
Protein (%)	AY	AY	AY	21.37±1.36 ^b	23.23±1.11 ^b	24.67±0.75 ^{ab}	25.13±0.92 ^{ab}	25.80±0.36 ^{ab}	25.50±0.53 ^a

*: Asitlik miktarı laktik asit cinsinden hesaplanmıştır.

a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

n: Analize alınan örnek sayısı.

AY: Analiz yapılmadı.

Tablo 8. *Listeria monocytogenes* inoküle edilmiş (grup 3) çiğ koyun sütünden üretilen Şavak tulum peyniri örneklerinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki kimyasal değişimler (n:6).

Özellik	Yapım Aşamaları (gün)			Olgunlaştırma Süresi (gün)					
	Çiğ Süt	Yapım 1	Yapım 2	0	15	30	45	60	90
pH	6.51±0.45 ^a	4.70±0.11 ^b	4.53±0.04 ^b	4.62 ±0.01 ^b	4.68 ±0.16 ^b	4.69 ±0.14 ^b	4.68 ±0.07 ^b	4.72 ±0.02 ^b	4.71 ±0.14 ^b
Asitlik* (%)	0.17±0.01 ^c	1.13±0.11 ^b	1.43±0.32 ^{ab}	1.80 ±0.21 ^a	1.66 ±0.44 ^{ab}	1.82 ±0.16 ^a	1.74 ±0.11 ^a	1.83 ±0.07 ^a	1.89 ±0.06 ^a
Rutubet (%)	AY	55.2±5.50 ^a	46.25±1.95 ^{ab}	44.26 ±0.96 ^b	44.02 ±4.37 ^b	42.12 ±2.50 ^b	39.99 ±1.75 ^b	40.25 ±5.24 ^b	43.12 ±3.25 ^b
a_w	AY	AY	0.924±0.002 ^a	0.915±0.004 ^{ab}	0.906 ±0.001 ^b	0.901 ±0.002 ^b	0.904 ±0.001 ^b	0.902 ±0.002 ^b	0.905 ±0.001 ^b
Tuz (%)	AY	AY	AY	2.88 ±0.13 ^c	3.12 ±0.14 ^{bc}	3.51 ±0.01 ^b	3.67 ±0.27 ^{ab}	3.89 ±0.13 ^{ab}	4.05 ±0.14 ^a
Yağ (%)	AY	AY	AY	33.00 ±3.00 ^b	35.00 ±1.00 ^b	37.67 ±0.58 ^{ab}	38.00 ±1.00 ^{ab}	41.67 ±2.08 ^a	42.33 ±2.08 ^a
Protein (%)	AY	AY	AY	22.00 ±0.72 ^b	23.23 ±2.18 ^{ab}	24.77 ±0.91 ^{ab}	26.03 ±0.60 ^a	25.67 ±0.40 ^a	26.00 ±0.36 ^a

*: Asitlik miktarı laktik asit cinsinden hesaplanmıştır.

a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir (p<0.05).

n: Analize alınan örnek sayısı.

AY: Analiz yapılmadı.

5.2.3. Deneysel Kontamine Tulum Peynirleri Örneklerinin Sentetik Mide Sıvısındaki Muameleleri Sonucu Patojen Bakterilerdeki Değişimler

Deneysel kontamine tulum peynirinin yapımı (yapım 2. gün) ve olgunlaştırılması esnasında sentetik mide sıvısı (SMS) ile muamele deneyleri sırasındaki patojen bakterilerdeki sayısal değişiklikler Tablo 9, 10, 11’de verildi.

5.2.3.1. Tulum Peyniri Örneklerinin SMS ile Muamelesi Sonucunda *Salmonella* Sayılarında Meydana Gelen Değişimler

Yapılan istatistiksel analizlere göre, deneysel tulum peyniri yapımı ile olgunlaştırma süresinin (zaman) ve SMS’de uygulanan muamele sürelerinin *Salmonella* sayısına etkisi önemli ($p < 0.0001$) bulundu. Ayrıca tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılma süreleri ile SMS’deki maruz kalma süreleri arasındaki etkileşimler istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.0001$) bulundu.

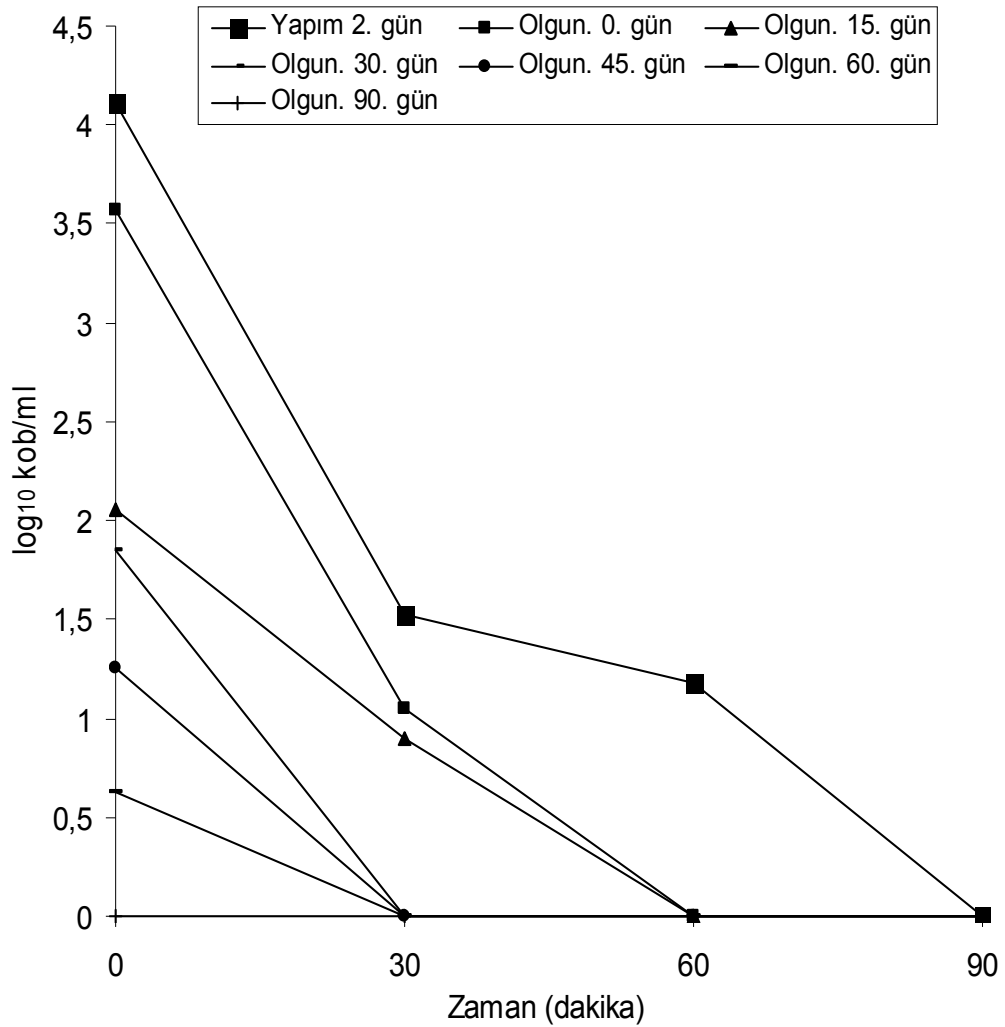
Tablo 9 incelendiğinde SMS ile muamelelerinin 0. dakikasına bakıldığında en yüksek bakteri sayısı yapımın 2. gününde (4.11 ± 1.22) tespit edilmiştir. Daha sonraki olgunlaştırma günlerinde sayının düzenli olarak azaldığı, olgunlaştırmanın 60. gününe gelindiğinde 3 tekrar halinde yapılan çalışmanın 2 tekrarında *Salmonella* sayısının tespit edilebilir seviyenin altında bulunduğu, fakat 1 tekrarda ise zenginleştirme işlemi sonucunda pozitif bulunduğu tespit edildi. Olgunlaştırmanın 90. gününde ise her 3 tekrarda da *Salmonella* sayısı tespit edilebilir seviyenin altında bulundu (Tablo 9).

Salmonella ile kontamine tulum peynirlerinin SMS ile muamele süreleri içinde sadece peynirin yapım aşamalarının 2. günü ve olgunlaştırma aşamasının 0. günü tespit edilebilir seviyenin üstünde kaldığı belirlendi (Tablo 9). Yapımın 2. gününde 30. ve 60. dakikalarda sayılabildiği, olgunlaştırmanın 0. gününde ise

sadece 30 dakikada canlı kalabildiği, diğer muamele sürelerinde tespit edilebilir seviyenin altında olduğu anlaşıldı (Tablo 9).

SMS ile muamelede en fazla dayanıklılık yapımın 2. gününde görüldü. Ancak yapımın 2. gününde bile 90. dakika itibariyle *Salmonella* sayısı tespit edilebilir seviyenin üstünde bulunmadı (Tablo 9, Şekil 18).

Şekil 18. Tulum peyniri örneklerinin SMS ile muamelesi sonucunda *Salmonella* sayılarında meydana gelen değişimler (\log_{10} kob/ml) (n:9).



Tablo 9. *Salmonella* ile kontamine deneysel Şavak tulum peynirleri örneklerinin yapım ve olgunlaştırma işlemleri esnasında sentetik mide sıvısındaki muameleleri sonucu patojenin sayısındaki değişiklikler (log₁₀ kob/ml) (n:9).

ZAMAN		Sentetik Mide Sıvısına Maruz Kalma Süresi (dakika)			
		0. Dakika*	30. Dakika**	60. Dakika**	90. Dakika**
OLGUNLAŞTIRMA GÜNLERİ	Yapım 2. gün	4.11±1.22 ^{az}	1.52±1.08 ^{bz}	1.18±0.52 ^b	< 0.9
	0. gün	3.57±1.10 ^{az}	1.05±0.31 ^{bz}	< 0.9	< 0.9
	15. gün	2.05±1.30 ^{ay}	0.90±0.02 ^{bz}	< 0.9	< 0.9
	30. gün	1.85±1.07 ^{ayx}	< 0.9	< 0.9	< 0.9
	45. gün	1.25±0.96 ^{ax}	< 0.9	< 0.9	< 0.9
	60 gün	0.63±0.04 ^{ax}	< 0.9	< 0.9	< 0.9
	90. gün	< 0.6	< 0.9	< 0.9	< 0.9

a,b,c,: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

x,y,z: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

*: 1/4' lük sulandırma sistemine göre hesaplanmıştır.

** : 1/8' lik sulandırma işlemine göre hesaplanmıştır.

n: Analize alınan örnek sayısı.

5.2.3.2. Tulum Peyniri Örneklerinin SMS ile Muamelesi Sonucunda *E. coli* O157:H7 Sayılarında Meydana Gelen Değişimler

Yapılan istatistiksel analizlere göre, deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırılmasının (zaman), SMS'deki uygulanan muamele sürelerinin *E. coli* O157:H7 sayısına etkisi önemli ($p < 0.0001$) bulundu. Ayrıca tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılma süreleri ile SMS'deki muamele süreleri arasındaki interaksiyonun istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.0008$) olduğu bulundu.

Kontamine tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması esnasında, SMS ile muamele süreleri içerisinde 0. ve 90. dakikalarda en yüksek canlı patojen sayısı (0., 90. dakikada sırasıyla 5.89 ± 0.42 , 2.04 ± 0.89), yapımın 2. günündeki deneylerde olduğu bulundu (Tablo 10).

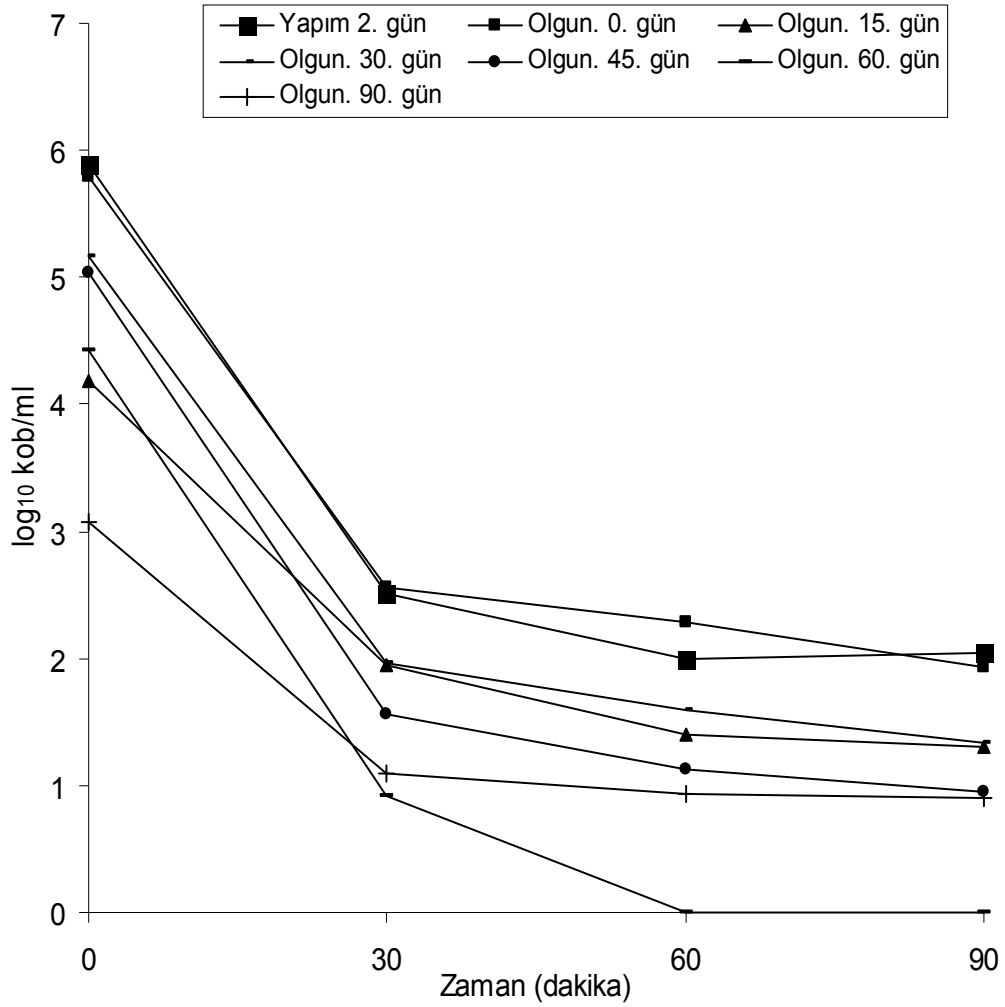
SMS deneylerinde 0. dakikaları kendi içerisinde karşılaştırıldığında, 15. ve 90 günlerde patojen sayısı açısından istatistiksel anlamda önemli azalma tespit edildi ($p < 0.05$). Yapımın 2. günü 0. dakikada $5.89 \pm 0.42 \log_{10}$ kob/g ile başlayan *E. coli* O157:H7 sayısı, 90. günde 0.dakikada $3.07 \pm 0.45 \log_{10}$ kob/g ile sona ermiştir (Tablo 10).

SMS deneylerinde 90. dakikaları kendi içerisinde kıyaslayacak olursak, en yüksek patojen sayısı yapımın 2. gününde ($2.04 \pm 0.89 \log_{10}$ kob/g) tespit edildi (Tablo 10). 90. dakikalar içerisinde sadece olgunlaştırmanın 60. günde *E. coli* O157:H7 sayısı, tespit edilebilir seviyenin altına indiği saptandı (Tablo 10). Ayrıca yapımın 2. günü hariç diğer günlerde meydana gelen azalmaların, istatistiksel anlamda önemli olmadığı belirlendi (Tablo 10).

E. coli O157:H7 ile yapılan SMS deneylerinde analiz günleri ve SMS deney günleri kıyaslandığında 30. dakikalarda patojen sayısında önemli derecede

azalma ($p < 0.05$) olduğu, ancak ilerleyen sürelerde (60. ve 90. dakika) patojen seviyesinde istatistiksel anlamda önemli bir azalmanın olmadığı ($p > 0.05$) anlaşıldı (Tablo 10). Patojen sayısı bakımından SMS deneylerinin 30. dakikasından sonra sayısının azalmadığı, yani kuyruk etkisi (tail effect) olduğu görüldü (Tablo 10, Şekil 19).

Şekil 19. Tulum peyniri örneklerinin SMS ile muamelesi sonucunda *E. coli* O157:H7 sayılarında meydana gelen değişimler (\log_{10} kob/ml) (n:9).



Tablo 10. *E. coli* O157:H7 ile kontamine deneysel Şavak tulum peynirleri yapım ve olgunlaştırma işlemleri esnasında sentetik mide sıvısındaki muameleleri sonucu patojenin sayısındaki değişiklikler (log₁₀ kob/ml) (n:9).

ZAMAN	Sentetik Mide Sıvısına Maruz Kalma Süresi (dakika)			
	0. Dakika*	30. Dakika**	60. Dakika**	90. Dakika**
Yapım 2. gün	5.89±0.42 ^{az}	2.51±1.56 ^{bz}	2.00±1.29 ^{bz}	2.04±0.89 ^{bz}
0. gün	5.80±0.60 ^{az}	2.56±0.39 ^{bz}	2.28±0.33 ^{bz}	1.93±0.73 ^{bzy}
15. gün	4.19±1.46 ^{ay}	1.94±0.28 ^{bzy}	1.40±0.49 ^{bzy}	1.31±0.41 ^{by}
30. gün	5.17±0.46 ^{azy}	1.96±0.33 ^{bzy}	1.59±0.42 ^{bzy}	1.33±0.36 ^{bzy}
45. gün	5.03±0.65 ^{azy}	1.56±0.73 ^{bzy}	1.13±0.33 ^{bzy}	0.95±0.20 ^{by}
60 gün	4.42±0.31 ^{ay}	0.91±0.02 ^{by}	< 0.9	< 0.9
90. gün	3.07±0.45 ^{ax}	1.09±0.33 ^{by}	0.94±0.11 ^{by}	0.90±0.02 ^{by}

OLGUNLAŞTIRMA GÜNLERİ

A,B,C,: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

X,Y,Z: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

*: 1/4' lük sulandırma sistemine göre hesaplanmıştır.

** : 1/8' lik sulandırma işlemine göre hesaplanmıştır.

n: Analize alınan örnek sayısı.

5.2.3.3. Tulum Peyniri Örneklerinin SMS ile Muamelesi Sonucunda *Listeria monocytogenes* Sayılarında Meydana Gelen Değişimler

Yapılan istatistiksel analizlere göre, deneysel tulum peyniri yapımı ve olgunlaştırılmasının (zaman), SMS'deki uygulanan muamele sürelerinin *L. monocytogenes* sayısına etkisi önemli ($p<0.0001$) bulundu. Ayrıca tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılma süreleri ile SMS'deki muamele süreleri arasındaki interaksiyonun istatistiksel açıdan önemli ($p<0.0001$) olduğu tespit edildi.

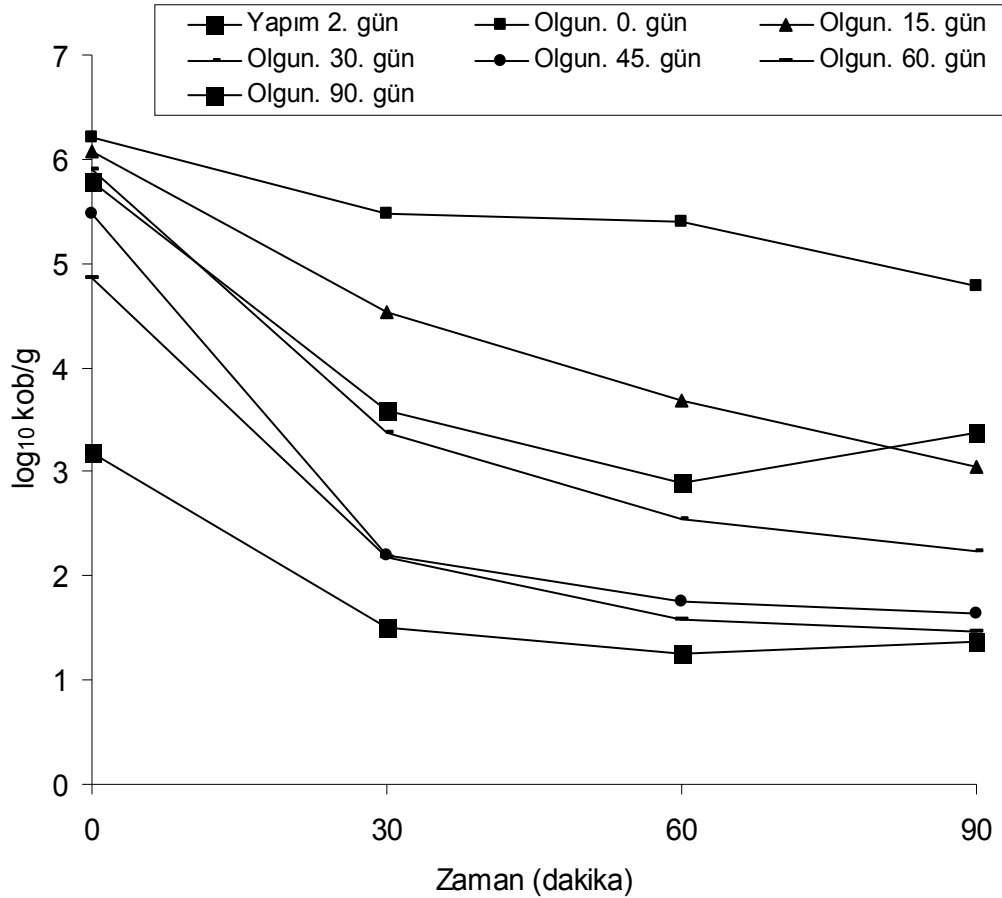
Kontamine tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması esnasında, SMS deneylerinde patojen sayısı açısından en yüksek başlangıç sayısı (0. dakika) ($6.21\pm 0.38 \log_{10}$ kob/g) ve en yüksek bitiş sayısı (90. dakika) ($4.79\pm 0.25 \log_{10}$ kob/g) olgunlaştırmanın 0. günü olduğu anlaşıldı. Analiz günleri içerisindeki 0. dakikalar patojen sayısı açısından kendi içerisinde karşılaştırıldığında, en yüksek sayı 0. günde olmasına karşın 90. güne kadar istatistiksel anlamda önemli bulunmadı ($p>0.05$). Ancak 90. gün *L. monocytogenes* sayısında önemli bir azalma ($p<0.01$) tespit edildi (Tablo 11).

SMS deneylerinde son süre olan 90. dakikalar kıyaslanacak olursa, patojen sayısı açısından en yüksek canlı sayısı 0. günde ($4.79\pm 0.25 \log_{10}$ kob/g) olduğu belirlendi (Tablo 11). SMS deneyleri içerisinde tüm 90. dakikalarda *L. monocytogenes* sayısı tespit edilebilir sayının üstünde olduğu bulundu. Son analiz günü olan olgunlaştırmanın 90. günündeki SMS deneyinin 90. dakikasında sayı $1.36\pm 0.52 \log_{10}$ kob/g tespit edildi.

L. monocytogenes ile yapılan SMS deneylerinde analiz günleri ve SMS deney günleri kıyaslandığında 30. dakikalarda (0. gün hariç) patojen sayısında

önemli derecede azalma ($p < 0.05$) olduğu, ancak ilerleyen sürelerde (60. ve 90. dakika) patojen seviyesinde istatistiksel anlamda önemli bir azalmanın (15. gün hariç) olmadığı ($p > 0.05$) belirlendi (Tablo 11). Patojen sayısı bakımından SMS deneylerinin 30. dakikasından sonra sayısının azalmadığı yani kuyruk etkisi (tail effect) olduğu bulundu. 0. günkü SMS deneylerinde 0. dakikadan 90. dakikaya kadar *L. monocytogenes* sayısında istatistiksel bir azalmanın olmadığı ve bu deney gününün diğer deney günleri ile kıyaslandığında SMS'e karşı en dirençli gün olduğu tespit edildi (Tablo 11). 15. günde ise 30. ve 90 dakikalarda önemli bir azalmanın olduğu anlaşıldı (Tablo 11). Ancak 15. günden sonraki analiz günlerinde kuyruk etkisinin devam ettiği anlaşıldı (Tablo 11, Şekil 20).

Şekil 20. Tulum peyniri örneklerinin SMS ile muamelesi sonucunda *L. monocytogenes* sayılarında meydana gelen değişimler (\log_{10} kob/ml) (n:9).



Tablo 11. *Listeria monocytogenes* ile kontamine deneysel Şavak tulum peynirleri yapım ve olgunlaştırma işlemleri esnasında sentetik mide sıvısındaki muameleleri sonucu patojenin sayısındaki değişiklikler (log₁₀ kob/ml) (n:9).

ZAMAN	Sentetik Mide Sıvısına Maruz Kalma Süresi (dakika)			
	0. Dakika*	30. Dakika**	60. Dakika**	90. Dakika**
Yapım 2. gün	5.78±1.07 ^{az}	3.59±1.99 ^{bzy}	2.90±2.37 ^{by}	3.37±1.92 ^{bzy}
0. gün	6.21±0.38 ^{az}	5.47±0.46 ^{az}	5.40±0.30 ^{az}	4.79±0.25 ^{az}
15. gün	6.07±0.49 ^{az}	4.53±1.02 ^{bzy}	3.68±0.97 ^{bcy}	3.05±1.24 ^{cy}
30. gün	5.91±0.21 ^{az}	3.37±0.48 ^{by}	2.54±0.18 ^{byx}	2.23±0.29 ^{byx}
45. gün	5.47±0.65 ^{az}	2.20±0.27 ^{byx}	1.75±0.49 ^{bx}	1.63±0.44 ^{byx}
60 gün	4.85±0.76 ^{az}	2.18±0.66 ^{byx}	1.59±0.44 ^{bx}	1.47±0.50 ^{bx}
90. gün	3.18±0.38 ^{ay}	1.50±0.33 ^{bx}	1.26±0.36 ^{bx}	1.36±0.52 ^{bx}

OLGUNLAŞTIRMA GÜNLERİ

A,B,C,: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

X,Y,Z: Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05)

*: 1/4' lük sulandırma sistemine göre hesaplanmıştır.

** : 1/8' lik sulandırma işlemine göre hesaplanmıştır.

n: Analize alınan örnek sayısı.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, saha şartlarında uygulanan tulum peynirlerinin üretim prosedürleri kullanılarak *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 ile kontamine edilmiş çiğ koyun sütünden yapılan Şavak tulum peynirlerinin yapımı ve olgunlaştırılması esnasında adı geçen patojenlerin yaşamı ve bu patojenlerin sentetik mide sıvısına dayanıklılıkları araştırıldı.

Çalışmada yaşam süresi en kısa patojen *Salmonella* olarak belirlendi. Çiğ süte ilave edilen *Salmonella* sayısı $6.63 \pm 0.32 \log_{10}$ kob/ml iken, ilerleyen yapım aşamalarında sayıda önemli azalmalar ($p < 0.05$) meydana geldi ve bu azalma olgunlaştırma boyunca da devam etti (Tablo 3). Tüm tekraralarda olgunlaştırmanın 90. gününde patojen sayısı tespit edilebilir seviyenin altına indi (Tablo 3).

Olgunlaşma sonunda en yüksek sayıda bulunan patojenlerin *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* olduğu belirlendi (Tablo 4). *E. coli* O157:H7'nin çiğ sütteki inokülasyon seviyesi ortalama $7.08 \pm 0.29 \log_{10}$ kob/ml iken, yapım aşamaları sonunda $6.48 \pm 0.16 \log_{10}$ kob/g'a geriledi ve olgunlaştırma esnasında sayı anlamlı şekilde ($p < 0.05$) azaldı. Olgunlaştırmanın son günü (90. gün) patojen sayısı $3.15 \pm 0.51 \log_{10}$ kob/g bulundu (Tablo 4). Çiğ sütteki inokülasyon seviyesi ile olgunlaştırmanın 90. günü arasında patojen sayısındaki azalış ortalama $3.93 \log_{10}$ kob/g oldu.

Kontamine Şavak tulum peyniri örnekleri içerisinde olgunlaştırmanın 90. gününde yaşayan patojen sayısı dikkate alındığında ikinci sırada *L. monocytogenes* yer aldı (Tablo 5). Çiğ sütteki kontaminasyon miktarı $7.03 \pm 0.37 \log_{10}$ kob/ml iken, yapım aşamalarının sonunda $6.67 \pm 0.31 \log_{10}$ kob/g'a düştü (Tablo 5). Ancak yapım aşamalarındaki patojen sayısındaki bu düşüş istatistiksel

anlamda önemli bulunmadı ($p>0.05$). Olgunlaştırma aşamalarında ise önemli bir azalmanın olduğu ($p<0.05$) anlaşıldı (Tablo 5). Çiğ sütteki patojen miktarı ile olgunlaştırmanın 90. günündeki patojen seviyesi arasındaki fark ortalama $4.12 \log_{10}$ kob/g bulundu.

Kontamine Şavak tulum peynirindeki yapım aşamalarında patojen miktarındaki düşüş açısından *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 ile kontamine gruplarda önemli bir azalma ($p<0.05$) olmuştur. Yapım aşamalarında patojen seviyesindeki değişime bakıldığında en yüksek sayının *L. monocytogenes*' de olduğu düşünülürse, Şavak tulum peynirinin yapım aşamalarında *Listeria monocytogenes*'in diğer patojenlere göre daha dayanıklı olduğu söylenebilir. Ancak olgunlaştırmanın 90. günündeki veriler kıyaslandığında, *E. coli* O157:H7 ile *L. monocytogenes* arasında sayısal açıdan ciddi bir farklılığın olmadığı bulundu (Tablo 3,4,5). Patojenlerin tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasındaki azalma veya tespit edilebilir seviyenin altına inmesinin sebebi, ürünün içerisindeki doğal flora bakterilerinin sayısındaki artış, besin maddesi için yarışan bakteri sayısındaki artış, pH daki düşüş, asit miktarındaki artış, metabolitlerin birikimi (bakteriosin vb), yetersiz besin maddesi ve bunların patojen bakterilerde oluşturduğu metabolik yorgunluk olduğu düşünülmektedir (14,44,46,50,53,75). Ancak patojenlerin sayısında meydana gelen azalma, Amerikan Gıda ve İlaç Yönetim Birimi (US Food and Drug Administration - FDA) tarafından açıklanan insan sağlığı açısından risk taşıyan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* gibi patojenlerin seviyesinde 5 log'luk azalma şartını (78), kontamine Şavak tulum peynirlerinde *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* için karşılayamamıştır.

Gıda üretimi ve muhafazası veya olgunlaştırılması esnasında patojen yaşamını veya aside dirençliliğini araştıran çalışmalarda, çoğunlukla aside dirençli (organik veya inorganik asitlerle) ve aside dirençli olmayan suşlar arasındaki farklılıklar incelenmiştir (25,81,87). Fermente ürünler ile yapılan çalışmalarda aside adapte olmayan suşlar, çoğunlukla ürünün fermantasyonu sırasında adaptasyon kabiliyeti kazanabilmektedir (46,50,87). Ürünün yapımı ve muhafazası esnasında aside adapte olmamış suşların daha uzun süreler dayanabildikleri belirlenmiştir (46,50,87). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, sıvı besi yerinde aside adapte edilmiş (%1 glikoz ilaveli TSB) bakteriler ile gıda ortamında aside adapte edilmiş (alıştırılmış) (portakal, elma ve domates suyunda 24 saat bekletilmiş) bakterilerin SMS' nda dirençleri karşılaştırıldığında, gıda ortamında aside dirençli hale getirilmiş bakterilerin daha dayanıklı olduğu anlaşılmıştır (97). Bu nedenlerden dolayı Şavak tulum peyniri ile yapılan bu çalışmada kullanılan patojenler aside adapte edilmeden, direkt olarak çiğ süte inoküle edilmiştir.

Tosun ve ark. (87) yaptığı bir çalışmada, aside adapte edilmiş (HCl ile) ve edilmemiş *E. coli* O157:H7 suşlarının simbiyotik yoğurt, set-yoğurt, kefir ve süzme yoğurttaki fermantasyon öncesi veya sonrası kontamine edilmesi sonrası, 4 °C' de muhafazası esnasında yaşama kabiliyetlerini incelemiştir (87). Sonuç olarak fermantasyon öncesi kontaminasyonda aside adapte olmayan bakterilerin daha dirençli oldukları, fakat fermantasyon sonrası kontaminasyonda aside adaptasyonun bakterinin yaşama gücünü arttırdığını rapor etmişlerdir (87). Ancak yapılan çalışmada aside adapte olmamış *E. coli* O157:H7 suşlarının fermantasyon sonrası asit direnci kazanıp kazanmadıkları araştırılmamıştır. 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, her üç asidik süt ürünüde de *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonunun arttığı, ancak aside adapte olmamış *L. monocytogenes* ATM56 suşunun daha dayanıklı olduğu saptanmıştır (46). Şavak tulum peyniri ile yapılan bu çalışmada ise aside dirençli olmayan *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7' nin peynirin yapım ve olgunlaştırma aşamaları sırasında sentetik mide sıvısında 90 dk. boyunca canlılıklarını sürdürdükleri tespit edilmiştir. Ayrıca Tosun ve ark. (87) yaptığı çalışmada HCl ile dirençli hale getirilmiş bakterilerin, organik asitlerin bulunduğu bir üründe yaşamının test edilmesi sonucu etkileyebilmektedir. Çünkü doğada bakterilerin çoğunlukla karşılaştıkları asit stres, organik asitler olabilmektedir.

Pastörize (endüstriyel) veya çiğ koyun sütünden (geleneksel) üretilen bir peynir olan Galotyri ile yapılan çalışmalarda (54,75), geleneksel ve endüstriyel tipteki Galotyri peynirlerine *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inoküle edilmiş, 28 günlük 4 °C ve 12 °C' de depolanması esnasında patojenlerin yaşamına bakılmıştır (54,75). *L. monocytogenes* ile kontamine (7 log₁₀ kob/g) Galotyri peynirinde 12 °C' de ki muhafaza esnasında 21. günden itibaren patojen sayısı tespit edilebilir seviyenin altına inmiştir (75). Ancak 4 °C' de muhafaza edilen ürünlerde *L. monocytogenes* sayısı 28. gün itibariyle yaklaşık 1.6 log₁₀ kob/g civarında bulunmuştur. *E. coli* O157:H7 ile kontamine (6.5 log₁₀ kob/g) Galotyri peynirinde ise endüstriyel üretim ile hazırlanan peynirlerde her iki muhafaza grubunda da (4 °C ve 12 °C) yaklaşık 14. günden sonra patojen tespit edilebilir seviyenin altında bulunmuştur (54). Ancak geleneksel üretimde ise her iki muhafaza derecesinde de patojen seviyesi 5 log₁₀ kob/g civarında bulunmuştur

(54). Araştırcılar endüstriyel ve geleneksel üretilen Galotyri peynirinde *E. coli* O157:H7' nin yaşamında oluşan bu farkı, 0. ve 7. günler arasındaki L (+) laktik asit artışına ve endüstriyel üretimde kullanılan ticari starter kültürlerin oluşturduğu metabolitlerden kaynaklanmış olabileceğini iddia etmişlerdir (54). Çünkü geleneksel üretilen Galotyri peynirinde (çiğ süttten yapılan) starter kültür kullanılmadığı, pH'nın doğal fermantasyon sonucu düştüğü rapor edilmiştir (54). Şavak tulum peyniri ile çok yakın benzerlikleri bulunan geleneksel Galotyri peynirinde elde edilen sonuçlar ile Şavak tulum peyniri ile yapılan bu çalışmanın sonuçları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Galotyri ile yapılan bu iki çalışmada da peynirin fermantasyon işlemi tamamlandıktan sonra patojenler inoküle edilmiştir. Ancak fermantasyondan önce meydana gelebilecek bir kontaminasyon söz konusu olsaydı sonuçların nasıl şekilleneceği tartışılmalıdır.

Mango suyu (pH 3.2), kuşkonmaz suyu (pH 3.6), yakult (fermente bir süt içeceği, pH 3.6) ve yoğurt (pH 3.9) ile yapılan bir çalışmada, aside adapte (HCl ile) edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının meyve sularına inokülasyonu sonucu aside adapte edilmeyen *E. coli* O157:H7 suşlarına göre muhafaza esnasında (25 °C' de) yaşamlarının daha uzun sürdüğü saptanmıştır (50). Ancak fermente süt ürünlerinde ise aside adapte edilmeyen suşların depolama esnasında (7 °C' de) daha uzun süre canlı kaldıkları tespit edilmiştir (50). Araştırmacılar bu farkın, sütün fermantasyonu esnasında oluşan asit, di-asetil, hidrojen peroksit, etanol ve bakteriosinlerden kaynaklanabileceği ve farklı test mikroorganizmalarının değişik gıda sistemlerinde farklı sonuçlar verebileceği şeklinde açıklanmıştır (37,44,50).

Gıdaya patojen bir bakterinin kontaminasyonu çoğunlukla hammaddeden veya işletme içerisindeki hijyen ve temizlik problemlerinden dolayı personel, alet ve

ekipmandan kaynaklanan çapraz kontaminasyonlar sonucu oluşmaktadır (59). İşletme florasında bulunan patojen bakteriler çok çeşitli stres faktörlerine doğal olarak maruz kalmakta ve bir kısım patojen veya patojenin suşlarının elimine olmasına, ancak geri kalanların ise karşılaştıkları (temizlik ve dezenfeksiyon ajanları, tuz, açlık, yetersiz ısı, fermantasyon) stres faktörlerine dirençli olmasına neden olmaktadır. Bir çalışmada 3 farklı et üretim yerinde, ortamda sürekli bulunan ile geçici olarak bulunan *L. monocytogenes* suşları arasında aside ve ısıya karşı dirençlilikleri incelenmiş ve kalıcı olan suşların, kalıcı olmayanlara göre aside daha dirençli oldukları ama ısı direnci arasında bir farklılığın olmadığını saptanmıştır (59). Ayrıca Yuk ve Marshall' ın (96) yaptığı bir çalışmada, karkas dekontaminasyonu amacıyla sık kullanılan bir madde olan trisodyum fosfatın (Trisodium Phosphate – TSP), *E. coli* O157:H7 hücreleri ile % 0,4 oranında muamele edildiğinde, SMS sıvısı içerisinde bakterilerin asit adaptasyonunu arttırdığı belirlemişlerdir. İşletme içerisinden kaynaklanan bulaşmalarda pek çok stres faktörüne karşı dirençli hale gelen bu patojenlerin ürün içerisinde daha uzun süre canlı kalabilmesi söz konusu olabilir. Çiğ süttten yapılan geleneksel şavak tulum peyniri gibi peynir çeşitlerinin, çiğ süttten veya çevreden kaynaklanabilecek kontaminasyon kaynaklarının kontrol edilemediği sürece ve doğal florasındaki laktik asit bakterilerinin (LAB) kontrol altında bulunmamasından dolayı (54), dirençli patojenlerin bu tip ürünlerde (doğal fermente) daha uzun süreler yaşayabileceği düşünölebilir.

Bu çalışmada şavak tulum peynirinin 90. gününe kadar *Salmonella* sayısının tespit edilebilir seviyenin altını düştüğü sonucuna varılmış olsa da, sahada tulum peynirlerinde *Salmonella* tespit edilmiş örnekler bulunmaktadır.

Çolak ve ark.'larının (33) yapmış olduğu çalışmada, sahadan toplanan 250 tulum peyniri örneğinin 6'sında *Salmonella*, 12 adedinde ise *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (33). Şavak tulum peyniri ile yapılan bu çalışmada, SMS içerisinde 90 dakika sonuna (pH 1.5-2.5) kadar *Salmonella* tespit edilememiştir (Tablo 9). Ancak *Salmonella*'nın bulunduğu ortama göre asit direncindeki değişimleri gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Farklı ortamlara maruz bırakılan *Salmonella* suşlarının pH 1.5 (97), pH 2.5 (11), pH 3 (2) ve pH 3.3'e (86) dirençli olduğu tespit edilmiştir. *Salmonella* ile kontamine edilmiş Şavak tulum peynirinin olgunlaşması esnasında ve SMS deneylerinde canlı kalmamış olmasının sebebi, peynirin yapımının ilk gününde pH'nın 6.51'den 4.73'e hızlı düşmesi olabilir. Çünkü laboratuvar ortamında *Salmonella*'nın en yüksek asit tolerans yanıtı pH 4.5 de elde edilmiştir (52). Ancak yapılan bu tip çalışmalar laboratuvar ortamında bir stres (laktik asit, asetik asit vb.) faktörü göz önüne alınarak yapılmıştır. Fakat Şavak tulum peyniri içerisinde doğal floranın, oluşan metabolitlerin, organik asitlerin vb. stres faktörlerinin bir karışım halinde bulunduğu da unutulmamalıdır.

Kontamine Şavak tulum peynirlerinin yapım ve olgunlaştırma aşamalarında sentetik mide sıvısında (SMS) muameleleri sonucunda *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7'nin, *Salmonella*'ya göre daha dayanıklı oldukları saptandı (Tablo 6,7,8). Olgunlaştırmanın 90. günü itibariyle SMS içerisinde 90. dakikada *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 tespit edilebilir seviyenin üstünde kaldı (Tablo 7,8). *Salmonella* ise deney günlerinin hiç birinde 90. dakikaya kadar canlı kalmadı. *Salmonella* SMS içerisinde dayanabildiği en uzun süreyi, yapımın 2. günü 60. dakikaya kadar gösterdi (Tablo

6). Geri kalan analiz günlerinde 0. ve 15. gün hariç SMS' na bırakıldıktan 30 dakika içerisinde tespit edilebilir seviyenin altına düştü (Tablo 6).

E. coli O157:H7 ile kontamine tulum peynirlerinin SMS içerisinde canlı patojen sayılarını inceleyecek olursak, deney günlerindeki SMS deneyleri içerisinde 90. dakikalar arasında en yüksek sayı yapımın 2. gününde görülmüştür (Tablo 7). Bu sonucun deneyin başlangıcındaki bakteri sayısının fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *E. coli* O157:H7 ile yapılan tüm SMS deneylerine bakılacak olursa, SMS'ye maruz bırakılmasından (0. dakika) sonraki 30. dakikada istatistiksel anlamda önemli bir azalma olduğu ($p < 0.05$), ancak diğer analiz sürelerinde (60. ve 90. dakikalar) istatistiksel anlamda azalmanın olmadığı bulundu (Tablo 7). Bu durum deneyler esnasında bir kuyruk etkisinin oluştuğunu gösterdi. Aynı etki *L. monocytogenes* ile kontamine tulum peyniri örneklerinde de gözlemlendi. Yani ölen bakteri sayısının asit şokuna uğradığı 0. ile 30. dakikalarda fazla olduğu, ancak diğer analiz sürelerinde ölen bakteri sayısının istatistiksel anlamda önemli olmadığı ve böylece patojen bakterinin maruz kaldığı şoka alışmış olabileceğini gösterebilir.

Kontamine gıdalardaki patojenlerin SMS' deki davranışları üzerine araştırma sayısı oldukça azdır. Hatta süt ürünleri üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmadaki SMS deneylerinin sonuçları çoğunlukla et ürünleri ve meyve suyu ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Roering ve ark.' larının (74) yaptığı bir çalışmada, pastörize edilmiş ve edilmemiş elma sularını (pH 3.3-3.5) *Salmonella typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, ve *Escherichia coli* O157:H7 ile inoküle etmişler ve 4-10 °C' de 21 gün muhafaza esnasında patojenlerin yaşamlarını ve kullanılan suşların SMS

sıvısındaki (pH 1.5) dirençlerini incelemişlerdir. Her iki elma suyu grubunda da 2 gün içerisinde *L. monocytogenes* sayısı tespit edilebilir seviyenin altına düşmüştür (74). *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 ile kontamine pastörize edilmiş elma sularında *Salmonella*'nın, fakat pastörize edilmemiş elma sularında ise *E. coli* O157:H7'nin sayısının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (74). SMS'ında ise en dayanıklı suşların 1. sırada *E. coli* O157:H7, 2. sırada ise *L. monocytogenes* olduğu anlaşılmış ve *Salmonella*'nın ise SMS ile muamele edildikten 5 dakika içinde tespit edilebilir seviyenin altına düştüğü görülmüştür. Bu çalışmada ise Şavak tulum peyniri içerisinde *L. monocytogenes*'in 90 günlük olgunlaştırma boyunca canlı kaldığı görülmüş olup, *Salmonella*'nın 90 gün canlılığını koruyamadığı anlaşılmıştır. Ayrıca sentetik mide sıvısına en dayanıklı bakterilerin *L. monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar farklı ortamlardaki bakterilerin, farklı sonuçlar ortaya koyduğunu gösterebilir. Ancak Yuk ve Schneider'in (97) yaptığı çalışmada portakal, elma, domates suyunda 24 saat bekletilen *Salmonella* suşlarının, SMS'da (pH 1.5) 100 dakikadan fazla dayanabildikleri tespit etmişlerdir. Araştırmacılar meyve suyundaki ortamın SMS'na maruz bırakılan *Salmonella*'ların yaşamını ve aside dirençlerini arttırdığını rapor etmişlerdir (97). *Salmonella*'nın Şavak tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması esnasında SMS'da canlı kalamasa da, başka bir ürünün içerisinde SMS'da canlı kalabileceği anlaşılmaktadır.

Formato ve ark.'larının (41) yaptığı bir çalışmada, çeşitli antimikrobiyel içeren (0. gün pH 6.20, 36. gün pH 6.10) veya içermeyen bologna sucuklarına (0. gün pH 6.24, 36. gün pH 4.77) adapte (TSBYE+G) veya adapte olmamış *L. monocytogenes* (TSBYE-G) inoküle etmişler ve 10 °C' de muhafazası esnasında

patojenin yaşamına ve SMS' içerisindeki direncine bakmışlardır. Antimikrobiyel içermeyen gruplarda adapte ve adapte olmamış patojenler arasında bir farklılığın olmadığını ve muhafaza günü arttıkça SMS' na direncin arttığını rapor etmişlerdir (41). Antimikrobiyel içeren gruplarda ise tüm analiz gruplarında SMS ile muamelenin 60. dakikasında 1 log₁₀ kob/g altında olduğu tespit edilmiştir (41). Yazarlar SMS' daki direncin artmasının, gıda içerisindeki patojenlerin bulunma süresinin artmasına (alışmasına) ve ürünün pH'ındaki değişimlere bağlamışlardır (41). Başka bir çalışmada ise, farklı (antimikrobiyel içeren / içermeyen) formülasyonlarda hazırlanmış domuz sosislerine *L. monocytogenes* inoküle edilmiş ve farklı kimyasallara daldırma işlemi yapılarak (%2.5 laktik asit veya %2.5 asetik asit) veya yapılmayarak vakum paket içerisinde 10 °C' de 40 gün muhafaza esnasında patojenin yaşamına ve SMS içerisindeki direncine bakmışlardır (83). Formülasyonunda antimikrobiyel madde bulunmayan, daldırma işlemi yapılmış veya yapılmamış tüm gruplarda muhafaza günü arttıkça SMS' na direncin artmakta olduğu belirtilmiştir (83). Antimikrobiyel madde içeren sosislerden % 2.5 laktik aside daldırılmış bazı gruplarda (asetik asit hariç) SMS sıvısına direnç olduğu görülmüştür (83). Antimikrobiyel eklenmiş ve laktik aside daldırılmış bazı gruplardaki SMS sıvısına direncin, ürünün pH'sı (pH 5.5) ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Genel olarak SMS' daki direncin sebebi bakterinin yaşına, ortama alışmasına ve mikro çevredeki pH değişikliklerine bağlanmıştır (83). Aynı araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada ise, farklı şekillerde hazırlanan *E. coli* O157:H7 suşları taze sığır etine inoküle edilmiş ve 4-12 °C' de vakum paketlerde muhafazası esnasında (periyodik olarak 5 gün 7 °C' de saklanmış/saklanmamış) yaşamı ve SMS içerisindeki direnci araştırılmıştır (84).

Sonuç olarak vakum paketlenmenin SMS içerisindeki direnci arttırdığı, 4 °C’ de SMS’ na direncin şekillenmediği, fakat 12 °C’ de SMS sıvısına direncin şekillendiği kanıtlanmıştır (84). Çalışmada etin florasında meydana gelen ve pH’ sındaki değişiklikler verilmemiştir.

Et ve et ürünleri üzerine yapılan çalışmalarda, SMS içerisindeki direnç muhafazanın ilerleyen günlerinde meydana gelmektedir (41,65,83,84). Bu direncin, muhafaza günü arttıkça ürünün pH’sındaki (yavaş azalmakta) ve florasındaki meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı ve patojenin ortama uyum sağladığı düşünülmektedir (41,83,84). Kontamine Şavak tulum peyniri ile yapılan bu çalışmada ise, yapımın ilk gününde asitliğin hızla artması, pH’ nın hızla düşmesi sonucu SMS sıvısında 90 dakika boyunca patojen bakteriler tespit edildi. Hatta SMS ile muamelelerin 90. dakikası itibariyle en yüksek patojen sayısı başlangıç günlerinde belirlendi. Et ürünlerinde muhafaza süresi uzadıkça SMS’na giren ortama alışmış bakteri sayısı arttığından, asit şoku sonrası canlı bakteri sayısında giderek artmaktadır. Ancak tulum peynirinin yapımı ve olgunlaştırılması sırasında ortamın asitliğinin ve pH’ sının subletal sürelerle çok çabuk ulaşması ve ayrıca ortamda bulunan diğer stres faktörleri (a_w , O/R, yarışmacı flora, metabolitler) patojenleri sürekli yorduğundan dolayı, olgunlaştırma süresi arttıkça SMS’na giren bakteri azaldığı gibi, 90 dakika sonra canlı bakteri sayısı da azalmaktadır. Ancak bu çalışmada asit şokuna maruziyetten sonra 30 dakika içinde sayının azaldığı, ancak ileriki analiz sürelerinde sayının önemli derecede değişmediği (kuyruk etkisi) belirlendi.

Aside dirençlilik konusunda ve SMS’nda yapılan pek çok çalışmada en dirençli bakteri *E. coli* O157:H7 bulunmuştur (26,52,56,74). Ancak bu çalışmada

ise SMS' na en dirençli bakterilerin *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir. Deneysel olarak sıvı besiyerlerinde yapılmış çalışmalarda bir veya birkaç stres faktörü göz önüne alındığından sonuçlar farklı çıkabilmektedir. Ayrıca gıda ortamlarına bağlı olarak da bu sonuçlar farklı çıkabilir. Kırmızı et kaynaklı yapılan çalışmalarda *E. coli* O157:H7' nin daha dirençli olarak gözükmesi, rezervuarının sığır, sorumlu gıdanın kıyma olması şekilde düşünüldüğünde normal karşılanabilir. Ancak ürün (et ürünleri, süt ürünleri, yumurta ürünleri, meyve suları) veya yapıldığı hammadde (domuz, kanatlı, koyun, sığır) değiştirildiğinde farklı sonuçlar çıkarılabilir. Farklı ürünler için HACCP programları geliştirilirken bu faktörler göz önüne alınabilir.

Kontamine tulum peynirleriyle ilgili bu çalışmada ayrıca *Enterococcus* spp., mezofil *Lactococcus* spp., mezofil *Lactobacillus* spp., maya, *Staphylococcus* spp., toplam mezofil aerob bakteri ve psikrofil aerob bakteri sayıları belirlenmiştir. Tulum peynirinin florasındaki laktik asit bakterileri incelenmemiştir. Ancak Öksüztepe ve ark. (68) yaptığı çalışmada, tulum peynirinin olgunlaşması esnasında rol oynayan starter kültürler incelemiştir. Çalışmada Lactobacillaceae familyasından *Lactobacillus casei* subsp. *casei*ve, *Lactobacillus plantarum*, Streptococcaceae familyasından *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoriäm* predominant olduğu ve tulum peynirinin olgunlaşmasında önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (68). Ayrıca başka bir çalışmada *L. brevis*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *P. damnosus* ve *E. mundtii* dominant olarak tulum peynirlerinde (kargı tulum peyniri) bulunmuştur (32). Kontamine tulum peynirleri ile yapılmış bu çalışmada elde edilen

mikrobiyolojik bulgular, bu konuda çalışmış diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir (7,15,31,32,34,69,70). Yukarıda belirtilen mikroorganizmalar ile tulum peyniri içerisinde geniş bir popülasyon meydana gelmektedir (32). Oluşan bakteri topluluğunun ürünün kimyasal özellikleri (pH, asitlik) üzerine etkisi, besin maddesi gereksinimi amacıyla yarışmacı halde olmaları ve oluşturdukları muhtemel metabolitler ile patojen bakterilerin üzerinde büyük bir stres yaratmaktadırlar.

Kontamine tulum peynirlerinin kimyasal verileri başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar ile uyum içerisindedir (1,7,15,34,69,70). Bu çalışmada laktik asitin formları (D (-) laktik asit, L (+) laktik asit) hakkında bilgi verilmemiştir. Ancak L (+) laktik asit formunun patojenler üzerine daha etkili olduğu rapor edilmiştir (54). Kargı tulum peynirinde organik asit bileşenleri üzerine yapılan çalışmada, en yüksek seviyede olan organik asidin laktik asit olduğu, sonra sırasıyla asetik, sitrik, propiyonik ve formik asit olduğu bildirilmiştir (35). Fakat çalışmada laktik asidin formları hakkında bilgi verilmemiştir.

7. SONUÇ

Bu çalışmada Şavak tulum peynirinin üretimi ve olgunlaştırılması esnasında incelenen patojen bakteriler, yaşam profilleri açısından farklılık göstermişlerdir. Üretim boyunca *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* hayatta kalırken, en duyarlı patojenin ise *Salmonella* olduğu ortaya konmuştur. 90 dak. süren SMS deneyleri sonucunda en yüksek canlı bakteri sayısına *L. monocytogenes*' in sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *E. coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'in Şavak tulum peyniri üretiminde oluşan koşullara *Salmonella*'ya göre daha dayanıklı olduğunu ve bu patojenlerin yapım ve olgunlaşma aşamaları boyunca SMS' da 90 dk boyunca canlılıklarını koruyabildiklerini göstermiştir. Bunun nedeni, üretim esnasında oluşan subletal ortamın *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'te aside dirençlilik mekanizmalarını aktif hale getirmiş olması olabilir. Bu tür ürünlerde patojen sayısının az olması bile *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 gibi patojenlerden kaynaklanabilecek riskleri elimine etmeyebilir. Üretimde bu patojenler için sıfır tolerans hedeflenmelidir. Geleneksel et ve süt ürünlerimizin, sanayide üretilmesi sırasında hazırlanan gıda güvenliği sistemlerinde (HACCP) kritik limitler belirlenirken, patojenlerde meydana gelebilecek adaptasyon kazanımlarının dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

- 1- Akın N ve Ayar A. (2000). Konya piyasasında satışı sunulan tulum peynirlerinin bazı nitelikleri. Selçuk Üni. Ziraat Fak Der 14(22):111-117.
- 2- Alvarez-Ordenez A, Fernadez A, Bernardo A ve Lopez M. (2008). Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. Meat Science. 2008 In Press.
- 3- Andrews WH ve Hammack TS. (2003). Bacteriological Analytical Manual *Online*. Erişim (<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>.) Erişim Tarihi 04.2008
- 4- Angelidis AS, Smith LT, Hoffman LM ve Smith GM. (2002). Identification of OpuC as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 68:2644-2650.
- 5- AOAC (1990). AOAC Official Methods, 15th Ed. Methods 948.12, 920.124, 983.14, 947.05, 920.123.
- 6- Arsene F, Tomoyasu T ve Bukau B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. Int Food Microbiol 55:3-9.
- 7- Ateş G. (1999). Starter kültürlü tulum peynirlerinin olgunlaşması sırasında duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Teksir, Fırat Üniv. Vet. Fak. Bes. Hij. ve Tek. AD. Elazığ.
- 8- Azizoglu RO. (2005). Influence of antibiotic, acid, and salt stress on resistance of *Escherichia coli* O157:H7. Yüksek lisans tezi. North Carolina State University, Department of Food Science, Raleigh, North Carolina, USA.
- 9- Azizoglu RO ve Drake M. (2007). Impact of antibiotic stress on acid and heat tolerance and virulence factor expression of *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Protect. 70(1): 194-199.
- 10- Bearson S, Bearson B ve Foster JW. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 147: 173-180.
- 11- Berk PA, de Jonge R, Zwietering MH, Abee T ve Kieboom J. (2005). Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium DT104. J Appl Microbiol 99:859-866.
- 12- Berry ED, Barcoy-Gallagher GA ve Siragusa GR. (2004). Stationary-phase acid resistance and injury of recent bovine *Escherichia coli* O157 and non-O157 biotype I *Escherichia coli* isolates. J Food Prot 67: 583-590.
- 13- Bonet M ve Montville TJ. (2005). Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. Lett In Appl Microbiol 40:237-242.
- 14- Border P, Horvard J, Plastow G ve Siggens K. (1990). Detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain Reaction. Lett Applied Microbiol 11:158-162.

- 15- Bostan K. (1991). Tulum peynirlerinde starter kültür kullanılabilirliği üzerine bir araştırma. Doktora tezi, Teksir, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Bes. Hij. ve Tek. AD. İstanbul.
- 16- Bremer E ve Krämer R. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, In Bacterial Stress Responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis. Eds. Washinton. D.C.: American Society for Microbiology, pp.99-116.
- 17- Bunnig VK, Crawford RG, Tierney JT ve Peeler JT. (1990). Thermotolerance *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. Appl Environ Microbiol 56:3216-3219.
- 18- Calicioglu M, Sofos JN, Kendall PA ve Smith GC. (2003). Effects of acid adaptation and modified marinades on survival of postdrying *Salmonella* contamination on beef jerky during storage. J Food Prot 66: 396-402.
- 19- Calicioglu M, Sofos JN ve Kendall PA. (2003). Fate of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 inoculated post-drying on beef jerky treated with marinades before drying. Food Microbiol 20: 169-177.
- 20- Calicioglu M, Sofos JN ve Kendall PA. (2003). Influence of marinades on survival during storage of acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* inoculated post-drying on beef jerky. Int J Food Microbiol 86: 283-292.
- 21- Calicioglu M, Sofos JN, Samelis J, Kendall PA ve Smith GC. (2002). Destruction of acid- and non-adapted *Listeria monocytogenes* during drying and stroge of beef jerky. Food Microbiol 19: 545-559.
- 22- Calicioglu M, Sofos JN, Samelis J, Kendall PA ve Smith GC. (2002). Inactivation of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 durin drying and storage of beef jerky treated with different marinades. J Food Prot 65: 1394 -1405.
- 23- Calicioglu M, Sofos JN, Samelis J, Kendall PA ve Smith GC. (2003). Effect of acid adaptation on inactivation of *Salmonella* during drying and storage of beef jerky treated with marinades. Int J Food Microbiol 89: 51-65
- 24- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF ve Foster JW. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 11: 3525-3535.
- 25- Cataldo G, Conte MP, Chiarini F, Seganti L, Ammendolia MG, Superti F ve Longhi C. (2007). Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. J Applied Microbiol 103: 185-193.
- 26- Cheng HY, Yu RC ve Chou CC. (2003). Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. Food Research International. 36 : 49-56
- 27- Cotter PD, Emerson N, Gahan CG ve Hill C. (1999) Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus endocoding a two-component signal transduction system involved in stres tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol 181: 6840-6843.

- 28- Cotter PD, Gahan CG ve Hill C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol Microbiol* 40: 465-475.
- 29- Cronan JE. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 5:202-205.
- 30- Culham DE, Lu A, Jishage M, Krogfelt KA, Ishihama A. ve Wood JM. (2001). The osmotik stress response and virulence in pyelonephritis *E. coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology* 147:1657-1670.
- 31- Çağlar A. (2001). Çiğ süttten üretilen ve farklı ambalajlama materyallerinde olgunlaştırılan Erzincan tulum peynirlerinin mikrobiyolojik özelliklerindeki değişimler. *Atatürk Üni Ziraat Fak Der* 32(3):285-292.
- 32- Çakmakçı S, Dağdemir E, Hayaloğlu AA, Gürses M ve Gündoğdu E. (2008). Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(3): 293-299.
- 33- Çolak H, Hampikyan H, Bingöl EB ve Ulusoy B. (2007). Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control* 18:576-579.
- 34- Dinçoğlu AH. (2002). Tulum peynirinin olgunlaştırılması sırasında *Brucella melitensis*' in yaşam süresinne potasyum sorbatın etkisi. Doktora tezi, Teksir, Fırat Üniv. Vet. Fak. Bes. Hij. ve Tek. AD. Elazığ.
- 35- Dinkci N, Akalın AS, Gönc S ve Ünal S. (2007). Isocratic reverse-phase HPLC for determination of organic acids in kargı tulum cheese. *Chromatographia* 66(1): 45-49.
- 36- Dykes GA ve Morrhead SM. (2000). Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int J Food Microbiol* 60: 137-146.
- 37- Enache E ve Chen Y. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in cranberry juice concentrates at different °Brix levels. *J Food Protect* 20 (9): 2072-2077.
- 38- Faleiro ML, Andrew PW ve Power D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int J Food Microbiol* 84: 207-216.
- 39- Farber JM ve Brown BE. (1990). Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl Environ Microbiol* 56:1584-1587.
- 40- Fay AC. (1934). The effect of hypertonic sugar solutions on the thermal resistance of bacteria. *J Agric Res* 48:453-468.
- 41- Formato G, Geornaras I, Barmpalia IM, Skandamis PN, Belk KE, Scanga JA, Kendall PA, Smith GC ve Sofos JN. (2007). Effect of acid adaptation on growth during storage at 10 °C and resistance to simulated gastric fluid of *Listeria monocytogenes* inoculated onto bologna formulated with or without antimicrobials. *J Food Protect* 70 (1) : 65-69.
- 42- Foster JW ve Hall HK. (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 173:5129-5135.
- 43- Foster JW. (1999). When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology* 2: 170-174.

- 44- Frank JF ve Marth EH. (1988). Fermentation. In: Wong, NP, Jenness, R, Keeney, M, Marth, EH.(Eds). Fundamentals of Dairy Chemistry. Van Nostrand-Reinhold, New York, pp. 655–738.
- 45- Gahan CGM ve Hill C (2003). Relationship between stress adaptation and virulence in foodborne pathogenic bacteria. “Microbial Stress Adaptation and Food Safety” AE Yousef and VK Juneja (Editörler). CRC Pres, New York. Syf: 213–235.
- 46- Gahan CGM, O’Driscoll B ve Hill C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl Environ Microbiol* 62: 3128-3132.
- 47- Gaidenko TA ve Price CW. (1998). General stress transcription factor sigmaB and sporulation transcription factor sigmaH each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions. *J Bacteriol* 180: 3730-3733.
- 48- Hecker M, Schumann W ve Volker U. (1996). Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 199:417-428.
- 49- Hill C ve Gahan C. (2000). *Listeria monocytogenes*: role of stress in virulence and survival in food. *Irish J Agric Food Res* 39:195-201.
- 50- Hsin-Yi C ve Chou C-C. (2001) 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* 70: 189-195.
- 51- Humphrey TJ, Williams A, McAlpine K, Lever MS, Guard-Petter J ve Cox MJ. (1996). Isolates *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. *Epidemiol Infect* 177:79-88.
- 52- Koutsoumanis KP ve Sofos JN. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Lett Appl Microbiol* 38: 321-326.
- 53- Leistner L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int Food Microbiol* 55:181-186.
- 54- Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas LP, Kontominas MG ve Samelis J. (2006). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. *Food Microbiol* 23(3):268-276.
- 55- Leyer GC ve Johnson EA. (1992). Acid adaptation promotes survival of *Salmonella spp.* in cheese. *Appl Environ Microbiol* 58:2075-2080.
- 56- Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL ve Foster JW. (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 4097- 4104.
- 57- Lou Y ve Yousef AE. (1997). Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* 63:1252-1255.

- 58- Lou Y ve Yousef AE. (1996). Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. J Food Prot 59:465-471.
- 59- Lunden J, Tolvanen R ve Korkeala H. (2008). Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. Lett In Appl Microbiol 46:276-280.
- 60- Mackey BM ve Derrick CM. (1987). The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods. Lett In Appl Microbiol 5:115-118.
- 61- Merrell DS ve Camili A. (2002). Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. Current Opinion in Microbiology 5: 51-55.
- 62- Miller LG ve Kaspar CW. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. J Food Prot 57: 460-464.
- 63- Molly KMV, Woestyne I, De Smet ve W Verstraete. (1994). Validation of the Simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganisms-associated activities. Microb Ecol Healthy Dis 7:191-200.
- 64- Murphy C, Carroll C ve Jordan KN. (2003). Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol Lett 223: 89-93.
- 65- Naim F, Messier S, Saucier L ve Piette G. (2004). Postprocessing in vitro digestion challenge to evaluate survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented dry sausages. Appl Environ Microbiol 70(11): 6637-6642.
- 66- Neidhardt FC ve VanBogelen RA. (2000). Proteomic analysis of bacterial stress response, in Bacterial Stress Responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, DC.: American Society for Microbiology Press, sayfa 445-452.
- 67- O'Driscoll B, Gahan CG ve Hill C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl Environ Microbiol 62: 1693-1698.
- 68- Öksüztepe G, Patır B ve Calicioglu M. (2005). Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak tulum cheese. Turkish J Vet Anim Sci 29(3):873-879.
- 69- Patır B, Ateş G ve Dinçoğlu AH (2001). Geleneksel yöntemle üretilen tulum peynirinin olgunlaşması sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve kimyasal değişimler üzerine araştırmalar. Fırat Üni Sağ Bil Der-Vet 15(1):1-8.
- 70- Patır B, Ateş G, Dinçoğlu AH ve Kök F. (2000). Elazığ' da tüketime sunulan tulum peynirinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi ile laktik asit bakterileri üzerine araştırmalar. Fırat Üni Sağ Bil Der-Vet 14(1): 75-83.
- 71- Phadtare S, Alsina J ve Inouye M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. Curr Opin Microbiol 2:175-180.
- 72- Pichhardt K (2004). Gıda mikrobiyolojisi. Literatür Yayıncılık, İstanbul.

- 73- Riordan DCR, Duffy G, Sheridan JJ, Whiting RC, Blair IA ve McDowell DA. (2000). Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Appl Environ Microbiol* 66: 1726-1729.
- 74- Roering AM, Luchansky JB, Ihnot AM, Ansay SE, Kaspar CW ve Ingham SC. (1999). Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int J Food Microbiol* 46: 263-269.
- 75- Rogga KJ, Samelis J, Kakouri A, Katsiari MC, Savvaidis IN ve Kontominas MG (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. *Int Dairy J* 15: 59-67.
- 76- Rowbury RJ ve Goodson M. (1997). Metabolites and other agents which abolish the CysB-regulated acid tolerance induced by low pH in log-phase *Escherichia coli*. *Recent Res Devel Microbiol* 1: 1-12
- 77- Russell NJ, Evans RI, ter Steeg PF, Hellemons J, Verheul A ve Abee T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *Int J Food Microbiol* 28:255-261.
- 78- Samelis J ve Sofos JN (2003). Organic acids. In: Roller, S. (Ed.), *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. CRC Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 98–132.
- 79- Samelis J, Sofos JN, Kendall PA ve Smith C. (2001). Influence of the natural microbial flora on the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in a model system of fresh meat decontamination fluids. *Appl Environ Microbiol* 67: 2410-2420.
- 80- SAS (1999) Version 6.1. SAS Institute. Cary, Nort Caroline, USA.
- 81- Sing M, Simpson SM, Mullins HR ve Dickson JS. (2006). Thermal tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef during storage. *Foodborne Pathogens and Disease* 3 (4): 439-446.
- 82- Stephens JC, Roberts IS, Jones D ve Andrew PW. (1991). Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. *J Appl Bacteriol* 70: 239-244.
- 83- Stopforth JD, Barmpalia IM, Samelis J, Skandamis PN ve Sofos JN. (2005). Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *Int J Food Microbiol* 99:309-319.
- 84- Stopforth JD, Skandamis PN, Ashton LV, Geornaras I, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, Smith GC ve Sofos JN. (2006). Impact of inoculum preparation and storage conditions on the response of *Escherichia coli* O157:H7 populations to undercooking and simulated exposure to gastric fluid. *Appl Environ Microbiol* 72(1): 672-679.
- 85- Stroz G. ve Zheng M. (2000). Oxidative stress, in *Bacterial Stress Response*. G. Storz and R. Hengge-Aronis. Eds. Washinton. D.C.: American Society for Microbiology, sayfa 47-60.

- 86- Tivari RP, Sachdeva N, Hoondal GS ve Greval JS. (2004). Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. J Basic Microbiol 44(2): 137-146.
- 87- Tosun H, Seçkin AK ve Gönül ŞA (2007). Acid adaptation effect on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented milk products. Turk J Vet Anim Sci 31(1):61-66.
- 88- Tsai YW ve Ingham SC. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. J Food Prot 60: 751-755.
- 89- Türk Standartları Enstitüsü. (1978). Peynirde yağ miktarı tayini (Van Gulik Metodu). TS 3046, TSE, Ankara.
- 90- Türk Standartları Enstitüsü. (1990). Süt-yağ tayini-Gerber metodu (Rutin Metod). TS 8189, TSE, Ankara.
- 91- Wang G ve Doyle MP. (1998). Heat shock response enhances acid tolerance *E. coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol 26:31-34.
- 92- Weagant SD, Bryant JL ve Bark DH. (1994). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. J Food Prot 57: 629-631.
- 93- Wilmes-Riesenberg MR, Bearson B, Foster JW ve Curtis R III. (1996). Role of the acid tolerance in virulence of *Salmonella* Typhimurium. Infect Immun 64:1085-1092.
- 94- Yokoigawa K, Takikawa A, Okubo Y ve Umesako S. (2003). Acid tolerance and *gad* mRNA levels of *Escherichia coli* O157:H7 grown in foods. Int J Food Microbiol 82: 203-211.
- 95- Yousef AE ve Courtney PD (2003). Basics of stres adaptation and implications in new-generation foods. "Microbial Stres Adaptation and Food Safety" AE Yousef and VK Juneja (Editörler). CRC Pres, New York. Syf:1-25.
- 96- Yuk HG ve Marshall DG. (2006). Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. Int J Food Microbiol 106: 39-44.
- 97- Yuk HG ve Schneider KR. (2006). Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. Food Microbiol 23: 694-700.
- 98- Yura T ve Nakahigashi K. (1999). Regulation of thr heat shock response. Curr Opin Microbiol 2:153-158.

9. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Afyonkarahisar ilinin Sandıklı ilçesinde doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimimi yaklaşık 8 farklı okulda tamamladım. 1997 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitimime başladım. 2002 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Doktora programını kazanarak, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimime başladım. 2003 yılının Aralık ayında, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 50/d maddesine göre Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen görevime devam etmekteyim. Evliyim ve bir çocuk babasıyım.