

PASTÖRİZE SÜTLERDE REKONTAMİNASYON
VE DAYANIKLILIK KONTROLU

Şerif Kaymaz¹

Bülent Mutluer²

Recontamination and shelf-life control of pasteurized milk.

Summary: *After the recognition of destruction of coliform bacteria under the suitable pasteurization conditions, the detection of these bacteria in the pasteurized milk samples has served as a reliable method in the evaluation of recontamination. Nevertheless, coliform bacteria form only a small amount of gram negative bacteria which are responsible in the decomposition of pasteurized milks. For this purpose a variety of methods have been developed in order to detect gram negative bacteria.*

The use of Moseley Test for the detection of psychrotroph gram negative recontaminants; Milk Agar Culture Technique and gram staining of the developing colonies for the differentiation of gram negative psychrotroph recontaminants from psychrotroph thermoresistant bacteria; and pyruvat distination test, Weihestephaner Rekontaminationtiter and Limulus Test for the evaluation of shel-life of pasteurized milks would be convenient.

Özet: *Uygun pastörizasyon koşullarında yıkımlandıklarının saptanmasından sonra, koliform grubu bakterilerin pastörize sütlerde aranması rekontaminasyonun belirlenmesinde güvenli bir yöntem olarak kullanılmıştır. Ancak pastörize sütlerin bozulmalarından sorumlu gram negatif bakteriler içerisinde koliform grubu bakteriler küçük bir grubu oluştururlar. Bu nedenle gram negatif bakterilerin saptanması amacı ile çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.*

Moseley Test ile psikrotrof gram negatif rekontaminatların saptanması; gram negatif psikrotrof rekontaminatların psikrotrof termorezistans bakterilerden ayırt edilmesi amacı ile Milk Agar plaklarına ekilen örneklerde oluşan kolonilerin gram boyama metodu ile ayırt edilmesi; pastörize sütlerde dayanıklılık süresinin belirlenmesinde ise pyruvat farklılık testi, Weihestephaner Rekontaminationtiter ve Limulus Test'lerinden yararlanılması yerinde bir uygulama olacaktır.

1 A.Ü. Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.

2 TAEK, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, Ankara.

Giriş

Pastörize sütlerde bulunabilen mikroorganizmalar çiğ süttten kaynaklanan ve pastörizasyon işleminden sonra da canlı kalabilen termorezistans bakteriler (thermodure) veya pastörizasyondan sonra süte bulaşan gram negatif psikrotrof bakterilerdir. Soğukta muhafaza edilen pastörize sütlerin dayanıklılıkları, öncelikle süt komponentlerini parçalayan ve duysal değişikliklere neden olan bu rekontaminantlara bağlıdır.

Pastörize sütlerde pastörizasyondan hemen sonra alcaligenes, streptococcus, micrococcus, microbacterium, bacillus ve clostridium türlerine ait termorezistans bakteriler saptanabilir (7, 13, 22). Alcaligenes'in dışında hemen hemen hepsi gram pozitif olan bu bakterilerden en sık bulunanlar micrococcus ve microbacterium türleri olup arasında büyük sayılarda streptokoklara da rastlanılabilir. Mikrokoklar, mikrobakteriler ve streptokoklar soğukta muhafaza koşulları altında sınırlı ölçüde üreme yeteneğine sahiptirler (7, 10). Buna karşılık rekontaminasyon sonucu bulunabilen achromobacter, acinetobacter, aeromonas, chromobacter, citrobacter, enterobacter, escherichia, flaobacterium, klebsiella, pseudomonas, serratia gibi gram negatif bakteriler soğukta muhafaza koşulları altında oldukça süratle çoğalabilirler ve kısa germinasyon süreleri nedeni ile kısa sürede bozulma meydana getirirler (5, 21, 22). Tolle ve Suhren'e (22) göre pastörize sütlerde 2×10^6 bakteri/ml. bulunduğu duysal değişiklikler başlamaktadır. Bu araştırmacılar deneysel çalışmalarda 100 ml sütte 1 adet pseudomonas'ın 10 °C'de 91 saat içerisinde 2×10^6 /ml'ye yükseldiğini ve bu seviyede duysal değişikliklerin başladığını ortaya koymuşlardır. Buna karşılık aynı sütler kontamine olmaksızın aynı muhafaza koşullarında 8 gün dayanıklı kalabilmişlerdir (22).

Koliform grubu bakterilerin uygun pastörizasyon koşullarında tahrip olduklarının saptanmasından sonra bu grub bakterilerin aranması uzun yıllar süttteki kontaminasyonun belirlenmesinde güvenilir bir metod olarak kullanılmıştır. Ancak koliform grubu bakteriler soğukta muhafaza edilen pastörize sütlerde bozulmadan sorumlu gram negatif bakteriler içerisinde küçük bir grubu oluşturduklarından, gram negatif psikrotrof bakterilerin saptanması amacı ile çeşitli metodlar geliştirilmiştir (3, 24).

Bu metodlardan biri olan Moseley Test (Moseley - keepin-quality test)'in psikrotrof gram negatif rekontaminantların saptan-

masında güvenilir bir metod olduğu ve soğukta muhafaza edilen pastörize sütlerin dayanıklılıklarının belirlenmesinde kullanılabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (1, 2, 3, 4). Söz konusu testte incelenen örneklerin başlangıçtaki ve 7°C'de 5—7 gün inkübasyondan sonraki genel canlı sayıları belirlenir ve her iki genel canlı sayıları arasındaki farkın büyüklüğünden veya belirlenen sınır değerinin üzerinde olmasından örneklerin dayanıklılıkları hakkında fikir edinilir. Waes ve Bossuyt (23) gram negatif psikrotrof bakterilerle kuvvetli bir kontaminasyon için her iki genel canlı sayımları arasındaki farkın 10^5 — 10^7 / ml arasında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Mull ve ark. (12)'na göre 7°C'de 10—14 günlük dayanıklılık için 625—2100 / ml'lik sınır değer kabul edilmiştir. Bigalke (1)'e göre 10^4 / ml'den fazla psikrotrof bakteri içeren örnekler kontamine kabul edilmektedirler. Bishop ve ark. (2)'na göre Moseley test sadece dayanıklılığın iyi veya azalmış halinin ayırt edilmesine olanak sağlamakta, dayanıklılık süresi hakkında kesin bilgi vermemektedir. Gram negatif psikrotrof rekontaminantların psikrotrof thermorezistans bakterilerden (thermodure) ayırt edilmesi amacı ile Schröder (15) milk agar plaklarına ekilen örneklerde 7°C'de 10 gün inkübasyondan sonra oluşan kolonilerin gram boyama ile ayırt edilmesini ve dayanıklılığın gram negatif bakterilere dayanılarak belirlenmesini önermektedir.

Suhren ve ark. (16) pastörize sütlerde dayanıklılığın belirlenmesinde pyruvat değerlerinden yararlanılmasını önermişler ve pyruvat farklılık testi geliştirmişlerdir. Bu testte sadece gram negatif rekontaminantlar değil muayene materyalinde mevcut tüm bakteriler hakkında bilgi sahibi olunmakta, 10°C'de 72 saat inkübasyondan önce ve sonra yapılan pyruvat tayinlerinde elde edilen değerler arasındaki farktan rekontaminasyon ve dayanıklılık hakkında fikir edinilmektedir. Pyruvat fark değerleri < 1 ppm / ml olan örneklerin ortalama 5 gün, < 3 ppm / ml olan pastörize süt örneklerinin ise ortalama 3 gün dayanıklı olduklarına karar verilmektedir. Marshall ve Harmon (11) psikrotrof gram negatif bakterilerin özellikle pseudomonasların varlığında pyruvat miktarı 20°C'de 24—48 saat içerisinde devamlı artmakta ve daha sonra kuvvetli bir düşüş göstermektedir. Araştırmacılar bu düşüşün pyruvatın gram negatif bakteriler, özellikle pseudomonaslar tarafından metabolize edilmesinin sonucu olduğunu ve bu nedenle testin 24 saat içerisinde yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Pastörize sütlerin dayanıklılık kontrolleri ile ilgili olarak Kleeberger (9) tarafından geliştirilen Weihenstephaner Rekontaminati-

ontiter yönteminde taze pastörize sütler 3×10 ml, 3×1 ml, 3×0.1 ml miktarlarda ağız kapaklı deney tüplerine doldurulur ve oda ısısında 24 saat inkübasyondan sonra her tüpten birer öze dolusu süt 2 kısım Plate Count Agar ve 1 kısım Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar'dan oluşan selektif besi yerine sürülerek ekilir. Oda ısısında tekrar 24 saatlik inkübasyondan sonra MPN (kuvvetle muhtemel sayı) yöntemine göre değerlendirilir. Gram negatif bakteri ve enterokoklar için tayin sınırı 4 / 100 ml'dir. Kleeberger sütleri beklenen dayanıklılık süreleri ve buna bağlı olarak da saptanan rekontaminasyon bakterilerine göre dört kalite sınıfına ayırmaktadır.

Kalite sınıfı (fevkalade kalite)	I: <	4 bakteri / 100 ml Dayanma süresi: 7—8 gün
Kalite Sınıfı (iyi kalite)	II: <	10 bakteri / 100 ml Dayanma süresi: 5 gün
Kalite Sınıfı (uygun kalite)	III:	11—100 bakteri / 100 ml Dayanma süresi: 3 gün
Kalite Sınıfı (rizikolu süt)	IV: >	100 bakteri / 100 ml Dayanma süresi: en çok 3 gün.

Çeşitli araştırmacılar yaptıkları araştırmalarla Weihestephaner Rekontaminationstiter'in pastörize sütlerin dayanıklılıklarının saptanmasında kullanılabileceğini doğrulamışlardır (14, 24).

Terplan ve ark. (19)'nın süt ve süt ürünlerinde gram negatif bakterilerin saptanmasında Limulus Test'in kullanılabilirliğini belirlemelerinden sonra bu test çeşitli araştırmacılar tarafından uygulanmıştır. (17, 18, 20). Daha sonra Terplan ve ark. (20) tarafından geliştirilen Limulus Differenz-Titer pastörize sütlerde dayanıklılığın saptanmasında kullanılmıştır. Test, prensipte *Limulus polyphemus* adlı yengeçlerin amoebocyt adı verilen kan hücrelerinin ihtiva ettiği bir enzim sistemi ile gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponenti lipopolisakkaritlerin (endotoksin) teması sonucunda jel oluşumuna dayanmaktadır. Testin yapılışında eşit miktarda lize amoebocyt (*Limulus Amoebocyt Lysat-LAL*) ile muayene materyali karıştırılır, su banyosunda 37°C 'de 1 saat inkübasyondan sonraki jel oluşumu dikkate alınır. Mikrotitrasyon plaklarında saptanan referans endotoksin hassasiyetine göre incelenen değişik seyreltideki örneklerin *Limulus* titresi tayin edilir. *Limulus* titresi (artı değerli) ile endotoksin hassasiyetinin çarpımından örnekteki lipopolisakkarit (endotoksin) miktarı (ng/ml) saptanır. Genellikle 0.05—0.1 ng/ml endotoksin konsantrasyonu

muayene materyalinde $10^2 - 10^3$ /ml gram negatif bakteri bulunduğuna işaret etmektedir (6, 19). Pastörize sütlerde dayanıklılığın kontrolünde kullanılan Limulus Differenz Test'te incelenen örneklerin öncelikle başlangıçtaki Limulus titreleri tayin edilmektedir. Örneklerin oda ısısında 24 saat inkübasyonundan sonra yeniden Limulus titreleri tayin edilmekte ve her iki sonuç arasındaki fark Limulus Differenz Titresi olarak belirlenmektedir. Bu değerin büyüklüğü muayene edilen örneklerde gram negatif bakterilerin ürediğini işaret etmektedir. Jaksch (8)'a göre Limulus Differenz Titresi 0.5'den küçük olan örnekler 100 ml'de 3'den daha az bakteri içermekte ve ortalama 5 gün dayanıklı kalabilmektedirler. Buna karşılık Limulus Differenz Titresi ≥ 1 olan örnekler 100 ml'de 100'den fazla bakteri içermekte ve ortalama 1 gün dayanıklı kalabilmektedirler.

Sonuç

Pastörize sütlerde rekontaminasyon ve buna bağlı olarak dayanma süresini saptamak amacı ile genelde koliform bakterilerin aranması yöntemlerine başvurulmaktadır. Oysa, soğukta muhafaza edilen pastörize sütlerde bozulmadan sorumlu gram negatif bakteriler içinde koliform grubu bakteriler çok sınırlı bir grubu oluşturmaktadırlar. Bozulmadan sorumlu tüm gram negatif bakterilerin saptanması, pastörize sütlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesinde daha gerçekçi bir yaklaşımdır ve bu amaca yönelik yeni yöntemlerin ülkemizde de uygulamaya konulması yararlı olacaktır.

Kaynaklar

1. Bigalke, D. (1980): *Proper line sampling can identify post-pasteurization contamination*. Amer. Dairy Review 42 (5): 32-34.
2. Bishop, J.R., White, C.H., Firstenberg, Eden, R. (1984): *Rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk*. J. Food. Protec. 47 (6): 471-475.
3. Blankenagel, G. (1982): *An examination of methods to asses post-pasteurization contamination*. J. Milk Food Technol. 39: 301-304.
4. Coghill, D., Juffs, H.S. (1979): *Comparison of the Moseley Keeping Quality Test for pasteurized milk and cream products with other tests of shorter duration*. Austral. J. Dairy Technol. 34: 118-120.
5. Cousin, M.A. (1982): *Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products*. J. Food Protec. 45 (2): 172-202.
6. Fleischer, A., Schmid, E.E., Müller, A. (1981): *The Limulus test in microbiological quality control*. Pharm. Acta. Helv. 56 (7): 186-189.

7. Heeschen, W., Suhren, G., Tolle, A. (1981): *Bacteriologisch-biochemische Kriterien der Milch und ihre Beziehung zu Frische, Haltbarkeit und Qualität*. Dtsch. Milchwirtsch. 32 (2): 1660—1664.
8. Jaksch, P. (1983): *Der Limulus Test zur Bewertung der hygienischen Qualität von Milch und Milchprodukten insbesondere im Hinblick auf Haltbarkeit und Weiterverarbeitung der Milch*. Vet. Med. Diss. München.
9. Kleeberger, A. (1976): *Nachweis von Reinfektionskeimen in Konsummilch und Schlag-sahne*. Molk. Ztg. Welt der Milch. 30: 1539—1544.
10. Kreuzer, K. (1978): *Erfahrungen mit dem Weihenstephaner Rekontaminationstiter in Konsummilch*. Molk. Ztg. Welt der Milch. 31 (35): 1129—1130.
11. Marshall, R.T., Harmon, C.C. (1978): *The automated pyruvate method as a quality test for grad A milk*. J. Food Protec, 41 (3): 168—177.
12. Mull, L.E., Pilkhanc, S.V., Richter, R.L., Smith, K.L. (1974): *Shelf life of pasteurized milk stored at 4.5 and 7°C*. J. Milk Food Technol. 37: 530—531.
13. Niemierski, P., Feier, U., Grossklaus, D. (1982): *Der Einfluss von Temperature und Zeit auf den Pasteurisationseffekt bei der Kurzzeiterhitzung von Milch*. Milchwiss. 37 (3): 133—138.
14. Nöbl, E. (1981): *Organisation der Betriebskontrolle in einem grosstädtischen Be- und Verarbeitungsbetrieb*. Milchwirtsch. Berichte. 68: 183—186.
15. Schröder, M.J.A. (1984): *Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in the dairy and their effect on keeping quality*. J. Dairy Res. 51:59—67.
16. Suhren, G., Heeschen, W., Tolle, A. (1980): *Vorschlag zur Prüfung der Haltbarkeit pasteurisierter Milch*. Dtsch. Molk. Ztg. 101: 1208—1212.
17. Südi, J., Suhren, G., Heeschen, W., Tolle, A. (1981): *Entwicklung eines miniaturisierten Limulus-Tests im Mikrotiter. System zum quantitativen Nachweis gram negativer Bakterien in Milch und Milchprodukten*. Milchwiss. 36 (4): 193—198.
18. Südi, J., Heeschen, W. (1984): *Untersuchungen zur quantitativen Aussage des Limulus-Tests über die mikrobiologische Beschaffenheit von Milch und Milchprodukten*. Arch. Lebensmittelhyg. 35: 32—35.
19. Terplan, G., Zaadhof, K.J., Buchholz, Berchtold, S. (1975): *Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit dem Limulus Test*. Arch. Lebensmittelhyg. 26:217—221.
20. Terplan, G., Bierl, J., Grove, H.H., Zaadhof, K.J. (1981): *Zur Beurteilung der Hygiene bei der Gewinnung und Verarbeitung von Lebensmitteln mit dem Limulustest*. Arch. Lebensmittelhyg. 32: 15—19.
21. Tolle, A., Suhren, G., Otte, J., Heeschen, W. (1979): *Zur Bakteriologie und Sensorik der pasteurisierten Konsummilch*. Milchwiss. 34 (7): 406—410.
22. Tolle, A., Suhren, G. (1982): *Pasteurisierte Konsummilch-Keimvermehrung und Grenzwerte für die Haltbarkeit*. Dtsch. Molk. Ztg. 22:728—734.
23. Waes, G.M., Bossuyt, R.G. (1982): *Usefulness of the benzalkoncrystal violet-ATP method for predicting the keeping quality of pasteurized milk*. J. Food. Protec. 45 (10): 928—931.
24. Winterer, H. (1982): *Haltbarkeitskontrolle bei verschiedenen Milchprodukten unter Anwendung von Kontaminationsnachweisen*. Milchwirtsch. Berichte 72: 179—184.