

## Psikrotrof Bakterilerin Çiğ Süt ve Süt Ürünleri Kalitesine Etkisi

Ecem Akan ✉, Oktay Yerlikaya, Özer Kınık

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 18.06.2011, Kabul Tarihi (Accepted): 21.09.2011

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [ecem.akan@ege.edu.tr](mailto:ecem.akan@ege.edu.tr) (E. Akan)

☎ 0 232 311 27 33 📠 0 232 342 57 13

### ÖZET

Çiğ sütün işlenmesi sırasında mikrobiyal popülasyonun özellikleri sütün raf ömrünü, duyu kalitesini, bozulmasını ve çiğ süttten elde edilecek verimi önemli derecede etkilemektedir. Günümüzde süt sektöründe yaygın bir uygulama çiğ sütün işlenmeden önce soğukta saklanmasıdır ve bu durum psikrotrof bakterilerin gelişimini kolaylaştırmaktadır. Bu yüzden soğutulmuş sütte bu bakterilerin sayısı çiğ sütün soğutulmadan önceki mikrobiyal popülasyonundan %10 daha fazladır. Psikrotrof bakteriler genellikle süt ve ürünlerinde bozulmalara neden olabilen ekstrasellüler ya da intrasellüler sıcaklığa dayanıklı enzimler (proteaz, lipaz ve fosfolipazlar) oluşturmaya yeteneklidirler. Ayrıca bu bakterilerin bazı türleri bozulmalara sebep olmalarının yanında antibiyotiklere karşı direnç gösterirler ve/veya toksin üretirler. Psikrotrof bakteriler günümüzde süt endüstrisinde bozulmalara ve önemli ekonomik kayıplara sebep olan önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu makalede psikrotrof bakterilerin çiğ süt ve son ürün kalitesine etkisi incelenecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Çiğ süt kalitesi, Psikrotrof bakteriler, Mikrobiyal popülasyon, Soğukta saklama

### Effect of Psychrotrophic Bacteria on Quality of Raw Milk and Dairy Products

#### ABSTRACT

During the processing of raw milk, characteristics of microbial population affect significantly shelf life, organoleptic quality and yields of raw milk. At the present time cold storage before processing of raw milk is a common treatment and this case improves psychrotrophic bacterial growth. Therefore, their count in cold milk may become more than their ideal limit of 10 % of the initial raw milk microbial population. Psychrotrophic bacteria are able to form extracellular or intracellular thermoresistant enzymes that cause spoilage of milk and dairy products. Also, some species of psychrotrophic bacteria resist to antibiotics and/or produce toxins. Today psychrotrophic bacteria cause problems of spoilage and significant economic losses. In this review, the effect of psychrotrophic bacteria on the quality of raw milk and dairy products is presented.

**Key Words:** Raw milk quality, Psychrotrophic bacteria, Microbial population, Cold storage

#### GİRİŞ

1950'li yıllarda çiğ sütün soğutulması ve soğukta saklanmasının zorunlu hale getirilmesinden sonra çiğ sütün bakteriyolojik kalitesinde önemli gelişmeler olmuştur [7]. Laktik asit bakterileri ve/veya diğer mezofolik bakterilerin gelişimiyle çiğ sütte meydana gelen bozulmalar soğutma işlemlerinin zorunlu hale

getirilmesinden sonra neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır.

Düşük sıcaklıklarda (2-6°C) uzun süre depolanan çiğ sütlerde sütün doğal mikrobiyal popülasyonunda önemli değişiklikler olmaktadır. Bu yüzden soğutulmuş çiğ sütte ilk aşamada gram pozitif mezofilik aerobik bakteriler baskındır ve daha sonra gram negatif ve gram pozitif

psikrotrof bakteriler ortama hakim olmaktadır [38]. Toplam mikrobiyal popülasyonda psikrotrof bakterilerin baskınlığı sütün iyi olmayan hijyenik koşullar altında üretildiğinde ve/veya somatik hücre sayısı fazla olduğunda daha fazla ortaya çıkmaktadır [1]. Tüm bu sebepler göz önüne alındığında psikrotrof bakteriler soğutulmuş sütte toplam mikrobiyal popülasyonun %90'nını oluşturmaktadır [42]. Ayrıca Cempíriková [8] iki yıl süren çalışmasında psikrotrof bakterilerin sayısı ile çiğ süt örneklerinin toplam bakteri sayısı arasında yüksek korelasyon ( $r=0,69$ ) saptamıştır.

Düşük sıcaklıklarda gelişebilme ve çoğalabilme yeteneklerine ilave olarak psikrotrof bakteriler ısıya dayanıklı ekstrasellüler ve/veya intrasellüler hidrolitik enzimler üretme yeteneğindedirler [12]. Bu enzimlerin pek çoğu süte ısı işlem uygulamasından sonra da aktivitelerini sürdürürler. Ayrıca, psikrotrof bakteriler ısı işlem uygulanmış sütlerde ve pastörizasyon sonrası kontaminyona uğramış süt ürünlerinde yaygın olarak izole edilen mikroorganizmalar arasındadır [19, 77]. Psikrotrofların bu özelliklerinden dolayı bozulma, süt kalitesinde düşme ve süt ürünlerinde canlı kalan organizmalar ve/veya ısıya dayanıklı enzimler bulunması mümkün olmaktadır [4, 35].

Bozulmalar lezzette değişim, süt proteinlerinin istenmeyen şekilde pıhtılaşması, serbest yağ ve aminoasitlerin konsantrasyonun artmasıyla ortaya çıkmaktadır. Ayrıca süt ürünü çeşidine bağlı olarak, organik bileşenlerde meydana gelebilen değişiklikler ve tekstür yapısında bozulmalara neden olabilmektedir [3, 9, 47]. Sütün süt ürünlerine işlenmeye uygunluğu gibi diğer kalite özellikleriyle bağlantılı olarak psikrotrofların süt ürünlerinin raf ömrünü kısaltmanın yanında verim üzerine de olumsuz önemli etkileri bulunmaktadır [6].

Süt ve ürünlerinde bozulmaya neden olan psikrotrof bakteriler esasında patojenik değildir. Bununla birlikte bu bakterilerin bazı türlerinin toksin üretme ve/veya antibiyotiklere karşı direnç gösterme gibi yetenekleri bulunduğundan bu bakteriler fırsatçı patojen bakteriler olarak düşünülebilirler [30, 51, 62]. Psikrotrof bakterilerin neredeyse tüm türlerinin yüzeylere yapışma (bağlanma) özellikleri vardır. Bu yüzden süt ürünleri ekipmanlarının iç yüzeylerinde biyofilm oluşumuna neden olabilirler. Biyofilmleri basit temizlik işlemleri ya da antibakteriyel kimyasal maddeler ile uzaklaştırmak oldukça zordur. Bu sebeplerden dolayı süt endüstrisinde biyofilmler psikrotroflar tarafından yüzeylerde oluşabilen kalıcı mikroorganizma topluluğu olarak düşünülebilir [64, 78].

Avrupa Birliği standartlarına göre çiğ sütte mezofilik bakteri sayısı 30000 kob/mL'den, psikrotrof bakteri sayısı ise 5000 kob/mL'den az olmalıdır. Çiğ sütün mikrobiyal popülasyonunda psikrotrofların sayısındaki her bir artış ürünün kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir ve dolaylı olarak üründen elde edilecek gelirleri de düşürmektedir. Bu yüzden modern süt işletmelerinde psikrotrof bakteriler ürün kalitesinde düşmelere ve üründe bozulmalar kaynaklı %30 oranında ürün kaybına neden olmaktadır [26, 79].

Süt ve ürünlerinin kalitesi üzerine psikrotrof bakterilerin olumsuz etkisi anlamında bu makalede süt ve ürünleriyle bağlantılı en önemli psikrotrof bakteri türlerinin özellikleri, çiğ süt, ısı işlem görmüş süt, krema, tereyağı ve peynirde potansiyel bozulmalar ve süt sanayinde en önemli kontaminasyon kaynakları irdelenecektir.

## PSİKROTROF BAKTERİLER

Psikrotrof bakteriler spesifik taksonomik mikroorganizma gruplarından değildirler fakat 7°C veya daha düşük sıcaklıklarda gelişebilen farklı tür bakteri grubu olarak tanımlanmaktadır. Psikrotrof bakteriler doğada öncelikle su, toprak ve bitkilerde yağın bir şekilde bulunur. Çok küçük bir kısmı ise hava da bulunabilir. Bu mikroorganizmalar optimum metabolik faaliyetlerini 20-30°C sıcaklık aralığında göstermektedirler. Bununla beraber düşük sıcaklıklarda membran lipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin asimilasyonu yoluyla gelişip çoğalabilirler. *Pseudomonas* genusu dünyada ekolojik olarak en önemli ve en çeşitli bakteri grubunu oluşturmaktadır. Bu bakterilerin doğada her yerde kolaylıkla bulunabilmesi fizyolojik ve genetik olarak adaptasyonlarını belirlemektedir [66].

Soğutulmuş süttten izole edilen psikrotrof bakteriler Gram negatif ve Gram pozitif cinslerdir ve taksonomik olarak 7 sınıfa ayrılmışlardır. Bu sınıflardan *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* ve *Actinobacteria* en baskın türleri içerirken *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria* ve *Sphingobacteria* ise daha önemsiz olan 4 sınıfı oluşturmaktadır. Ayrıca soğutulmuş çiğ süttten izole edilen izolatların yaklaşık %20'si psikrotrof bakterilerin yeni türleri olarak düşünülmektedir [29].

Soğutulmuş süttten izole edilen bakteri suşlarının önemli miktarı *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobakter*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* türleridir ve bazıları potansiyel patojen bakteriler olarak düşünülmektedir. Yani bu bakteri türleri insan ve hayvanlarda görülen enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler ve özellikle bağışıklık sistemine zarar verme ve antibiyotiklere karşı direnç gösterme gibi özellikleri bulunmaktadır [2, 52, 96].

*Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobakter*, *Alcaligenes*, *Achromobakter*, *Enterobakter* ve *Flavobacterium*, *Pseudomonas* genusunun baskın türleridir ve çiğ süttten izole edilen gram negatif popülasyonunun büyük kısmını oluşturur [65, 68, 76]. *Pseudomonas* genus türleri fizyolojik ve genetik olarak değişik çevre koşullarına adapte olabilmeye özelliğindedirler. Pek çok moleküler çalışmada benzer türlerin suşları arasında fragment uzunluğunun sınırlandırılmasının aşırı derecelerde polimorfizme neden olduğunu saptanmıştır [44, 66]. Ayrıca *Pseudomonas* türleri benzer türlere ait suşlar arasında en iyi genetik çeşitliliği göstermektedir [44]. *Pseudomonas* spp. çiğ ve pastörize sütte bozulmaya neden olan en yaygın mikroorganizmalardır. Bu bakterilerin büyük bir kısmı (%58-91) enzimatik ekstrasellüler proteolitik, lipolitik ve fosfolipolitik aktivite gösterme yeteneğindedirler [72, 74]. *Pseudomonas* spp.'nin ekstrasellüler enzimatik faaliyetinde suşları

arasında bulunan farklılıklar genetik çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte benzer ribotipe sahip olan suşlar benzer ekstrasellüler enzim profili göstermektedir [17, 74].

Diğer psikrotrof bakteriler ile karşılaştırıldığında *Pseudomonas* türlerinin gelişme süresi oldukça kısa olmakta (4 saat) ve 4°C'de depolanan süte 8 gün içinde sadece tek bir hücrenin sayısı  $10^6$  kob/mL'ye ulaşabilmektedir [39]. Bakteriler  $10^0 \times \text{mL}^{-1}$  katsayısı ile çoğaldığında 48 saat içinde bakteri sayısının  $1.6 \times 10^{n+1} \text{mL}^{-1}$  e ulaşmaktadır. Aynı zamanda bakteri sayısındaki artış oluşum süresi 12 saat olduğunda  $1.6 \times 10^{n+1} \text{mL}^{-1}$  e ulaşmaktadır [69].

Çiğ süttten izole edilen psikrotrof gram pozitif bakterilerden *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve *Lactobacillus* dışında diğer gruplar ısıya dayanıklı psikrotrof bakteri içerirler. Mikrobiyal türler arasında süte uygulanan ısı işlemler sonrasında canlı kalabilen bakteri *Bacillus* türleridir ve süttten izole edilen en yaygın Gram pozitif bakteridir. Fizyolojik özelliklerine göre bu bakteriler mezofilik, termofilik ve psikrotrof suşlar içermektedirler [65, 80]. *Bacillus* spp. grubu oldukça heterojen bir bakteri grubudur ve farklı besinsel ihtiyaçları ile karakterize edilmektedirler. Bu bakteri grubu geniş sıcaklık ve pH değerleri aralığında gelişebilmekte ve osmotik basınca farklı direnç göstermektedir. Farklı fizyolojik özelliklerinden dolayı süt ve ürünlerinden izole edilen bu bakterilerin prosedürlerinin standardizasyonu ve inaktivasyon koşullarının tanımlanması oldukça zordur [25, 46].

Çiğ ve ısı işlem görmüş süt ve ürünlerinden *Bacillus* genusuna ait bakteriler arasından izole edilebilen yaygın bakteriler *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. circulans*'tir. Bu psikrotrof aerobik ya da fakültatif anaerob bakterilerin sıcaklığa dayanıklı sporları süte ısı uygulamasından hemen sonra hızlı bir şekilde aktif olabilmektedir. *Pseudomonas* spp. ile ilişkili olarak *Bacillus* spp. vejetatif hücreleri ısıya dayanıklı ekstrasellüler ve intrasellüler hidrolitik enzimleri geniş spektrumda oluşturma kabiliyetindedirler [11]. Süttten izole edilen *Bacillus* spp. % 40-84 oranında hem proteolitik hem lipolitik aktivite gösterir ve yaklaşık %80'i fosfolipolitik aktivite gösterir [45]. Ayrıca *Bacillus* genusunun bazı türleri eş zamanlı olarak birden fazla çeşitte proteinaz üretebilir. Bununla beraber, hidrolitik özelliklerine göre bu enzimler *Pseudomonas fluorescens* tarafından oluşturulan hidrolitik enzimlerle kıyaslanabilir.

Hidrolitik ısıya dayanıklı enzimlere ilave olarak *B. cereus*, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* gibi *Bacillus* türleri gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilen farklı tip toksinler oluşturmaya yeteneklidirler [86, 96]. Süt ve ürünlerinde sıklıkla karşılaşılan bir kontaminant olan *Bacillus cereus* enfeksiyon veya intoksikasyonlara neden olabilen çeşitli enterotoksinler üretebilmektedir. Örneğin hemolitik BL (HBL), non hemolitik enterotoksin (NHe) ve sitotoksin K (CytK) gastrointestinal hastalıklar ve/veya sistematik enfeksiyonlarla bağlantılıdır.

Kontamine ürün tüketildikten sonra bağırsağın bir kısmında bu enterotoksinler ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte emetik enterotoksinler ürün tüketildikten 1-6 saat sonra bulantı ve kusmalara neden olmaktadır [5, 62].

Çiğ sütte Gram pozitif spor oluşturan bakteriler Gram negatif psikrotrofik bakterilere göre daha az bulunmaktadır. Çiğ sütte bu bakterilerin daha az bulunması oluşum sürelerinden (yaklaşık 8,5 saat) ve 2-7°C aralığındaki sıcaklıklarda lag fazının uzun olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte bu bakteriler süt 10°C'de uzun süre depolandığında ya da gelişmiş teknolojik koşullar sağlandığında baskın hale gelmektedir. Wang ve ark. [72] dondurma örneklerinde %52, süt tozu örneklerinde %29, fermente süt örneklerinde %17 ve pastörize süt örneklerinde %2 oranında *B.cereus* varlığı saptamışlardır. Gripffiths ve Phillips [28] çalışmalarında süttten izole edilen *Bacillus* spp suşlarının yaklaşık %50'sinin 2°C'de dahi gelişme yetenekleri olduğunu saptamışlardır. Bu nedenle, *Bacillus* spp. günümüzde süt ve ürünlerinde mikrobiyal bozulmalarda önemli bakteriler olarak görülmektedirler ve süt endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır [5, 48].

### Hidrolitik Enzimler

Psikrotrof bakterilerin önemli bir kısmı ısıya dayanıklı hidrolitik enzimler oluşturma kabiliyetindedir. Bu enzimler süttün yağ, protein ve lesitin gibi önemli bileşenlerinde bozulmalara sebep olmaktadır [17, 60]. Bu enzimler süte geleneksel ısı işlem (72°C'de 15 dakika pastörizasyon; 138°C'de 2 saniye ticari sterilizasyon) uygulandıktan sonra dahi %30- 100 aralığında canlı kalabilmektedirler. Isıya dayanıklı hidrolitik enzimler *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. bakterileri tarafından oluşturulmaktadır. Süt endüstrisinde önemli bu enzimler proteazlar, lipazlar ve fosfolipazlardır. Genelde psikrotrof bakterilerin proteinazları hidroliz yoluyla kazeini yeniden stabilize ederler ve depolama sırasında sterilize sütte jel oluşumuna ya da pıhtılaşmaya neden olabilmektedirler. Peynir üretiminde proteinazlar verimde önemli düşümlere neden olurlar [16, 49]. Ayrıca, psikrotrof bakterilerin neden olduğu proteoliz ürünlerin lezzetini (acılaşma, meyvemsi, mayamsı, metalik vb) olumsuz yönde etkiler [43, 87].

Psikrotrof bakterilerin bakteriyal lipaz aktivitesi aracılığıyla süt yağının hidrolizi sonucunda serbest yağ asitleri açığa çıkmaktadır. Bu durum gıdalarda acılık, sabunumsuluk gibi istenmeyen değişikliklere sebep olmaktadır. Lipolitik lezzet kusurları özellikle krema, tereyağı, peynir ve UHT sütlerde gözlenmektedir [10]. Lesitinaz ve diğer fosfolipazlar psikrotrof bakterilerin önemli lipaz gruplarıdır ve bu gruplar yağ globüllerinin membran yapılarını bozma yeteneğindedirler [63]. Gram negatif ve Gram pozitif psikrotrof bakterilerin lipazları 30 ve 50 kDa arasında molekül ağırlığına sahiptirler ve optimum pH'ları 7-9 aralığındadır. Triaçilgliseroller, diaçilgliseroller ve monoaçilgliserollerin hidrolizi gibi ayrıcalıklı özelliklere sahiptirler [12].

*Pseudomonas* spp.'nin hidrolitik enzimlerinin aktivitesi soğukta saklanan çiğ sütlerde %100'dür. Bununla beraber bu tip enzimler pastörizasyondan sonra %60-70 oranında, sterilizasyondan sonra ise %30-40 oranında aktivitelerini koruyabilmektedirler. Bu sebeplerden dolayı bu bakteriyel enzimler üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve özellikleri tanımlanmıştır [4, 35, 65]. *Pseudomonas* spp.'nin belli suşları 3 tip hidrolitik enzim oluşturma yeteneğindedir (proteinaz, lipaz ve fosfolipaz) bazı suşları sadece lipaz ya da proteinazları oluşturmaktadır [45]. Bireysel suşların ekstrasellüler enzimatik aktivitelerindeki farklılıkların yüksek olasılıkla belirli genetik grup ile ilişkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir [21]. Örneğin, *Pseudomonas* spp.'nin 55-S-6 tipli suşları 50-S-8 ribotipine ait suşlardan daha yüksek proteolitik aktivite göstermektedir. Diğer bir yandan 72-S-3 ribotipli suşlar ise yüksek lipaz aktivitesi göstermektedirler [17].

*Pseudomonas* türlerinin proteinazları 40-50 kDa aralığında molekül ağırlığı olan, yapılarında en az bir çinko (Zn) atomu ve 16'ya kadar kalsiyum (Ca) atomu içeren enzimlerdir. *Pseudomonas* spp. proteinazlarının optimum pH'sı nötrdür ya da baziktir (pH: 7-9). Bu proteinazların büyük çoğunluğu ısıya dayanıklı ve 100°C'de 30 dakika ısı işleminden sonra dahi stabil kalabilmektedir [37]. Ayrıca *B. stearothermophilus* sporları ile karşılaştırıldığında *P. fluorescens* proteinazlarının ısıya dayanıklılığının yaklaşık 4000 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Gösterebildikleri ısı stabilitesine rağmen 55-60°C sıcaklıklarda bu proteinazların stabil kalamaması farklı bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır [47]. Bununla birlikte bu sıcaklıklarda proteinaz aktivitesinin kaybı otoproteolizin bir sonucu değildir (genellikle protein yokluğunda meydana gelir) fakat sütle bu durum enzim-kazein kompleksinin oluşumunun sonucudur [12]. *Pseudomonas* spp.'nin proteinazları  $\kappa$ ,  $\alpha$ 1, ve  $\beta$  kazeini degrade edebilmektedirler ve bu durum ise kolloidal sistemin fiziksel yıkılmasının bir sonucu kabul edilmektedir [50].

Gram negatif psikrotrof bakterilerin lipaz ve fosfolipazları süt yağı ve lesitini hidrolize edebilmektedir. Süt yağında normal serbest yağ asitlerinin miktarı 0.5-1.2 mmol/100 g civarındadır. Kısa zincirli serbest yağ asitlerinin (C4-C8) artan miktarı süt ürünlerinde acı lezzete sebep olur. Orta zincirli yağ asitleri ise ürünlerde daha çok sabunumsu lezzete ve acılığa neden olmaktadır. Uzun zincirli serbest yağ asitlerinin (C14 - C18) süt ve ürünlerinde lezzeti önemli derecede etkilemediği düşünülmektedir [10]. Ürünlerin lezzetinde değişikliğe sebep olabilen serbest yağ asitlerinin gerekli miktarı 8 g/kg (C8) ile 27.5 mg/kg (C4) aralığındadır. *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. ile karşılaştırıldığında daha çeşitli proteolitik aktivite göstermektedir ve pek çok türü birden fazla ekstrasellüler ve intrasellüler proteinaz oluşturma yeteneğindedir [54]. Bununla beraber, proteolitik değişimlerin yoğunluğu, türe, *Bacillus* spp. suşlarına ve aynı zamanda sıcaklığa bağlıdır. Bu yüzden, kazein fraksiyonları arasında,  $\kappa$ -kazein süt sıcaklığı 4°C üzerinde olduğunda en hızlı hidrolize olan fraksiyonudur ve bunun sonucuna para-  $\kappa$ -kazein kompleksi oluşur.  $\alpha$  ve  $\beta$ -kazeinin bozulması benzer sıcaklıklarda

görülmemektedir [84]. *Bacillus* spp.'nin sebep olduğu proteolitik değişimler sonucunda serbest tirozin miktarında önemli artış olur [54] ve bu miktar sütte 2.13 mg/ml'ye kadar ulaşabilmektedir [85]. *Bacillus* spp.'nin lipolitik aktivitesi 4°C üzerindeki sıcaklıklarda önemlidir ve süttten izole edilen tüm türlerin neredeyse tüm lipazları mono ve di açilgliserollerin bozulmasında önemli derecede etki gösterirler. Önemli lipolitik değişimler sütte serbest yağ asit miktarlarının artışı açısından *B. licheniformis* ve *B. cereus* varlığında gözlenir [11, 85].

Altı farklı biyokimyasal grup içeren farklı lipazlar oluşturma yeteneğinde olan *Pseudomonas* spp.'nin aksine *Bacillus* genusu ekstrasellüler ve intrasellüler lipazlarla yakından ilişkilidir [11]. Proteinazlar ile karşılaştırıldığında *Bacillus* spp. lipazları ısıya daha çok dayanıklıdır. Bununla birlikte, enzimlerin iki çeşidi de süte uygulanan tüm sıcaklıklara dayanıklıdır ve bu yüzden süt tozunu da içeren tüm süt ürünlerinde aktivitelerini sürdürmektedirler [11]. Isıya dayanıklı enzimler oluşturma ve en önemli süt bileşenlerine etkileri ile ilişkili çok çeşitli araştırmalara rağmen sentez mekanizmaları hala tam olarak açıklanamamıştır.

## Biyofilm

Süt ve ürünleriyle ilişkili psikrotrof bakterilerin önemli özellikleri ekzopolisakkarit ve/veya lipopeptitler oluşturma yetenekleridir. Bu bileşenler yapısal olarak farklı metabolit gruplar oluştururlar ve bu metabolitler katı yüzeylerin üzerine bakterilerin yapışmasına yardımcı olurlar [73, 88]. Biyofilm tek bir bakteri türü tarafından oluşturulabileceği gibi farklı mikroorganizma türlerini de içerebilmektedir. Biyofilmler kompleks, heterojen yapılardır, çeşitli mikroorganizma türlerinin topluluğudur. Ekstrasellüler 3 boyutlu matrisle sahiptirler.

Biyofilm içerisinde fiziksel olarak benzer hücreler planktonik hücrelere göre önemli farklı özellikler gösterirler [56]. Yapılarındaki değişimlerden kaynaklı biyofilm içerisinde bakteriyel topluluklar antibiyotiklerin yoğunluğuna karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidirler [89]. Ayrıca *B. subtilis*, *B. cereus* ve *P. fluorescens* bakteri türleri birlikte biyofilm oluşturma yeteneğindedirler. Biyofilmlerde bu bakteri türleri planktonik hücrelere göre farklı fizyolojik özellikler geliştirirler [13]. Örneğin *P. fluorescens* klorin dioksit maruz kaldığında *B. cereus* türlerine göre daha büyük oranda hayatta kalmaktadır.

## KONTAMİNASYON KAYNAKLARI

Psikrotrof bakteriler memenin doğal mikrobiyal florasının bir parçası değildir ve bu yüzden çiğ sütte bulunmasını da sütün sağımdan sonra kontaminasyona uğramasının bir sonucudur [52, 69, 90] Gram negatif psikrotrof bakteriler sağım makinalarında kalan su, süt boru hatları ya da soğutucular, kirli meme ve meme ucundan, süt ekipmanlarının yetersiz temizliği, taşıma ve sütün depolanması aşamalarında bulaşabilir [77].

Psikrotrof spor oluşturan bakteri kaynakları açısından evrensel olarak kabul edilmiş bir fikir yoktur. Christiansson ve ark. [13] sütteki sporların önemli miktarının meme ucunun toprak ile kontamine olma derecesi ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bunun tam aksine, Lukaseva ve ark. [22] ile Foltys ve Kirchenerova [91] çiğ sütte *Bacillus* spp.'nin varlığının mevsimsel durumdan etkilendiğini yaptıkları araştırmaya dayanarak onaylamamaktadırlar. Ağustos ve Ekim aylarında *Bacillus* spp.'nin çiğ sütte bulunma oranında yüksek korelasyon saptanmıştır. Bu durumun da tüketilen yemlerdeki değişiklikler ve sütün sağımı sırasında yetersiz hijyenden kaynaklanabildiği belirtilmiştir [22].

Çiğ süt depolama tankları, boru hatları ve dolum makineleri süt ve ürünleri için *Bacillus* türlerinin önemli kontaminant kaynaklarıdır [64, 77]. Wijman ve ark. [75] *B. cereus*'un 24 saat içerisinde teknolojik işlemler tamamlandıktan sonra kalıntı sıvıların bulunduğu yerlerde ya da üretim sırasında kullanılan ekipmanlarda biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Koşullara bağlı olarak biyofilmlerde bulunabilen *B. cereus*'ların yaklaşık %90'ı spor oluşturabilmektedirler. *B. cereus* sporları biyofilmden ayrılıp üretim çevresine yayılma yeteneğine sahiptirler. Bu sebepten dolayı pek çok durumda *Bacillus* spp. sporlarının varlığı pastörizasyon sonrası kontaminasyon olduğunu göstermez [28].

### Çiğ Süt

Süt sağımdan hemen sonra en az 5000 cfu/mL mikroorganizma içermektedir. Baskın mikrobiyal popülasyonu çoğunlukla *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Corynebacterium* ve önemsiz miktarda Gram pozitif ve Gram negatif bakteri oluşturmaktadır. Toplam bakteri sayısı ile karşılaştırıldığında çiğ sütte psikrotrof bakterilerin bulunma oranı %10'dan daha azdır. Uygulamada bu durum iyi hijyenik koşullar altında sağım gerçekleştirildiğinde sütün 5000-20000 cfu/mL aralığında psikrotrof bakteri içerdiği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, süt işlenmeden önce soğutma işlemi ve uzun süre 4°C'de depolama mikrobiyal popülasyonda değişimlere neden olabilmektedir. Bu koşullar altında baskın gram pozitif bakteriler Gram negatif ve Gram pozitif psikrotrof bakteriler ile yer değiştirmektedir. Bu bakterilerin süt ve ürünlerinin kalitesine belirgin derece olumsuz etkileri olmaktadır [38, 93]. Süt ve süt ürünleriyle ilişkili psikrotrof bakteriler arasında *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. bozulmuş çiğ süt ya da ısı işlem görmüş sütlerden en yaygın olarak izole edilen organizmalardır [47].

18 ay süresince 7 çiftlikte yapılan çalışmada psikrotrof Gram negatif bakteriler (PB) ile toplam mezofilik aerobik bakteriler (TB) arasında yüksek korelasyon ( $p < 0.001$ ) saptanmıştır. PB/TB oranı 0.18 olarak saptanmıştır. Danimarka'da çiğ sütün mikrobiyolojik kalite değerlendirmesinde Holm ve ark. [31] TB'nin 30000 kob/mL'yi aştığı durumların %28'inde psikrotrof bakterilerin baskın olduğunu saptamışlardır. Bunun aksine hijyenik olmayan koşullarda sağım durumunda çiğ sütte Gram negatif bakteriler toplam mikrobiyal popülasyonun %75-99'unu oluşturmaktadırlar ve bu

popülasyonda da en baskın mikroorganizma *P. fluorescens*'tir [42, 50].

Çiğ sütte spor oluşturan Gram pozitif psikrotrof bakteri sayısı önemsiz miktarlardadır [3]. Spor oluşturan bakteriler arasında çiğ sütte *Bacillus* türlerinin görülme sıklığı yaklaşık %95'tir. Griffiths ve Steele [28] çiğ sütün 6°C'de 7 gün depolama sonrasında *Bacillus* türlerinin 105 kob/mL seviyesinde bulunabileceğini belirtmiştir [28]. Yine *Bacillus* türlerinin %50'sinin 2°C'de canlı kalabildikleri pek çok araştırmacı tarafından da ortaya konmuştur. Slovakya'da 294 adet çiğ süt örneğinde yapılan bir araştırmada, soğuk çiğ sütte 2.5 ile 340 kob/mL seviyesinde mezofilik aerobik psikrotrof spor oluşturan bakterileri bulunabildiği ortaya konmuştur [22].

*Bacillus cereus* bakterisinin çiğ sütte bulunma potansiyeli pek çok araştırmacı tarafından dikkate alınmıştır. Meme başının toprak ile kontaminasyon derecesine bağlı olarak *B. cereus*'un çiğ sütte bulunma oranı <10'dan 880 adet/mL ye kadar geniş bir aralık göstermektedir. Johnston ve Bruce [34] 1040 çiftlik sütünden yaptıkları izolasyonlar sonucunda örneklerin %27.2'sinin *Bacillus* türleri ile kontamine olduğu, türler arasında %65.7'sinin *B. cereus*, %19.9'unun *B. licheniformis* ve %10.1'inin *B. coagulans* türleri olduğunu ortaya koymuşlardır. Matta ve Punj [44] tarafından 100 çiğ süt örneğinde yapılan incelemede ise, örneklerin %48'inde *Bacillus cereus* tespit edilmiştir. Çiğ sütte bulunabilecek diğer genuslarla karşılaştırma yapıldığında *B. cereus*'un yaygın bir tür olduğu ortaya çıkmaktadır. Ancak, Lukaševa ve ark. [91] tarafından Çek Cumhuriyeti'nde 276 çiğ süt örneğinde yapılan incelemede, baskın türün (%85) *B. licheniformis* olduğunu, diğer *Bacillus* ve *B. cereus* türlerinin daha düşük orandan bulunduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *Bacillus* türlerinin bulunma oranı ve çeşitliliği bölgeden bölgeye değişim gösterebilmektedir.

Çiğ sütte psikrotrof bakterilerin bulunma oranları sütün sağımından depolama süresince meydana gelen kontaminasyonlardan, özellikle başlangıçtaki kontaminasyon miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Başlangıçtaki kontaminasyon ne kadar düşük olursa, pastörizasyondan sonra kalabilecek miktar da o denli düşük olmaktadır. Bu durum yapılan moleküler yöntemler ile de ortaya konmuş, süt sağımından sonraki 24 saatlik süre periyodunda psikrotrof bakteri popülasyonunun dominant tür olduğu belirlenmiştir.

Soğukta depolanan çiğ sütteki psikrotrof bakterilerin enzimatik aktiviteleri nedeniyle, sütün yağ, protein ve lesitin yapıları dolayısıyla çiğ süt kalitesi ve teknolojik özellikleri olumsuz etkilenmektedir [4, 35]. Bu enzimlerin 100°C'de 30 dakika süre ısı uygulaması sonrasında bile stabil kalmaları nedeniyle, üretilen ürünün kalitesinde ve duyuşal özelliklerinde sorunlar meydana gelmektedir [17, 29].

Çiğ sütte acı, meyvemsi, mayamsı veya metalik olarak tarif edilen yabancı aroma pastörizasyon ve sterilizasyon işleminden sonra canlı kalabilen Gram pozitif psikrotrof bakterileri sporlarının varlığından

kaynaklanmaktadır. Bu sebeple, ısı işlem uygulanmış sütün depolama süresi kısalmakta ve sıklıkla sütte tatlı pıhtılaşma görülebilmektedir [70]. Gram negatif psikrotrof bakterilerle karşılaştırıldığında, hijyenik şartlara önem verilmediği durumlarda; *Bacillus* türleri çiğ süt ve ısı işlem görmüş sütlerde baskın olabilmektedir [19, 92].

### Pastörize ve Sterilize Süt

Çiğ sütte çok yüksek miktarda psikrotrof bakteri varlığı pastörize (HTST) ve sterilize (UHT) sütlerin kalite özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Çiğ sütteki Gram negatif psikrotrof bakteriler geleneksel ısı işlem uygulamaları sonucunda elemine edilmekte iken Gram pozitif psikrotrof bakterilerin sıcaklığa dirençli enzimleri canlı kalabilmektedir [18]. Bu yüzden, HTST ve UHT sütlerin bozulması söz konusu bu bakterilerin gelişimi ve enzimlerinin canlı kalmasıyla alakalı olmaktadır.

Gram negatif psikrotrof bakteriler arasında, *Pseudomonas* türleri pastörize sütlerin %15-33 bozulma nedenidir ve sütün toplam bakteri yüküyle yakından ilişkilidir [36, 94]. Ayrıca pastörize sütte Gram negatif psikrotrof bakteriler pastörizasyon sonrası süte kontamine edilmektedir. Her ne kadar bu bakterilerin başlangıçtaki oranı düşük olsa da, soğukta 10 gün içerisinde depolama süresince kritik seviyeyi aşmakta ( $10^7$ - $10^8$  kob/mL) ve sütü bozmaktadır [20]. Bu seviyelerdeki bakteriyel kontaminasyon pastörize sütte acılaştırıcı bileşenlerin meydana gelmesi, istenmeyen aroma ve raf ömrünün kısalması gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır. HTST pastörizasyon ile karşılaştırıldığında, atipik aroma ve negatif proteoliz UHT sütte 50. günde depolama neticesinde daha keskin ortaya çıkmaktadır [55].

Gram negatiflerin aksine, Gram pozitif spor oluşturan psikrotrof bakteriler sütün ısı işlem uygulamasında canlı kalabilmekte ve soğutulmuş sütte gelişmeye devam etmektedirler [32, 40]. Gram negatif psikrotrof bakterilerden, *Bacillus* türlerinden *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bozulmuş HTST ve UHT sütlerden izole edilen en yaygın türlerdir. Hem termorezistant hem de psikrotrof doğaları nedeniyle sütte vejetatif formların da bulunmasına olanak sağlamaktadır. Sıcaklık etkisiyle sporların aktivasyonu nedeniyle sütte vejetatif forma dönüşüp gelişmelerine devam edebilmektedirler [5]. Bu nedenle, modern süt endüstrisinde HTST ve UHT sütlerin bozulmasındaki temel sebeplerin başında gelmektedir [41, 45, 50].

Pek çok Gram negatif psikrotrof bakteriler, *Bacillus* türlerinin vejetatif hücreleri *Pseudomonas* türlerinininki gibi termorezistant enzimler üretebilme yeteneğindedirler. Örneğin, *Bacillus* türleri *Pseudomonas* türleri gibi biyokimyasal aktivite göstereceklerinden %84 kazeinde, %77 lesitinde, %52 yağda ve %8 laktozda hidrolize neden olmakta, bu da sütün bozulmasına neden olabilmektedir [81].

Murugan ve Villi [53] süttten izole ettiği 108 *Bacillus* tür ve suşunun sterilize sütte proteolize neden olduğunu belirlemiştir. Araştırmacılar sütün *Bacillus* türleri ile

kontamine olduğunda değişen oranlarda kazein azalmaları olduğunu ortaya koymuştur. *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* sütün 37°C'de 30 saat inkübasyonu sonucunda istenmeyen aromanın ve pıhtılaşmanın olduğunu belirlemiştirler.

*Bacillus* türlerinin lipolitik enzimleri sonucu meydana gelişen bir değişim de yağ asitleri kompozisyonunda değişiklik meydana gelmesidir. UHT sütlerin 24°C'de 3 hafta depolanmasından sonra, başlangıçta 41.97 mmol/kg olan serbest yağ asitleri konsantrasyonu 1617.22 mmol/kg seviyesine yükselmektedir. En yüksek serbest yağ asidi konsantrasyonu değişimine neden olan tür ise UHT sütün *B. licheniformis* ve *B. cereus* ile kontaminasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, *Bacillus* türlerinin yüksek lipoliz ve proteoliz kapasiteleri UHT sütün raf ömrünün azalmasında %25 etkilidir. Bunun yanında, *B. subtilis* ve/veya Gram negatif bakterilerinin termostabil proteolitik enzimleri kazeini hidrolize edebilmekte ve sütün rennin ile pıhtılaşmasına benzer bir etki gösterebilmektedir [49, 61].

*Bacillus* türleri arasında spor oluşturan *B. sporothermodurans* ve *B. stearothermophilus* süt sterilizasyon şartlarına en dayanıklı türlerdir [33]. *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'in aksine bu bakterilerin sütte etkili miktarda bulunması sterilize sütte asit pıhtılaşmaya ve peynirimsi lezzet ve aromaya neden olmaktadır.

### Fermente Süt Ürünleri

Genelde, fermente süt ürünlerindeki düşük pH (4.2-4.6), bozucu mikroorganizmaların pek çoğu için olumsuz bir çevre sağlamaktadır [58]. Fakat, fermente süt ürünleri üretiminde, çiğ sütün ürün işleninceye kadar düşük sıcaklıklarda uygun şekilde depolanması ürün açısından önem taşımaktadır [59]. Çiğ sütün soğukta depolanması aşamasında psikrotrof bakteriler süt proteini ve yağın hidrolize etmektedirler. Meydana gelen bu hidrolitik değişiklikler neticesinde, fermente süt ürünlerinin kalitesinde özellikle de tekstür ve aromada olumsuzluklar meydana getirmektedir. Örneğin, çiğ sütteki κ-kazein'in hidrolizi durumunda, yoğurt jeli daha sert ve viskoz olmakta, sineresiz düzeyi ise artmaktadır [27]. Önemli bir nokta da, proteolitik etki, serbest amino asit konsantrasyonlarında artış meydana getirerek mikrobiyal kültürlerin gelişimine etki etmektedir. Fakat, aynı zamanda psikrotrof bakterilerin lipazları nedeniyle meydana gelen lipolitik değişiklikler son ürünün aromasında olumsuzluklar oluşturmaktadır. Bu olumsuz özellikler, acılık, ransit tat, tanımsız ve meyvemsi lezzet şeklinde tarif edilmektedir [65].

### Krema ve Tereyağı

Uzun süre soğukta depolanmış süttten üretilen krema ve tereyağı üretildiğinde, bu ürünlerin depolama süresinin kısalması ya da bozulmasında %25 oranında etmen psikrotrof bakterilerdir. Bu etkiler direk olarak ürünün mikrobiyal kontaminasyon sonucu olabildiği gibi ürünün üretildiği çiğ sütün psikrotrof bakterilerce yüksek düzeyde olmasından kaynaklanabilmektedir [47]. Krema ve tereyağı gibi ürünler yüksek düzeyde yağ

içerdiklerinden psikrotrof bakterilerin lipolitik enzimlerine proteolitik enzimlerine göre daha meyillidir [82]. Ürünlerde acılık ve aroma eksikliği süt proteinlerinin hidrolizi nedeniyle de meydana gelebilmektedir [47]. *Pseudomonas fragi* ve *Pseudomonas fluorescens* lipolitik aktiviteleri ve süt yağını yağ asitlerine parçalamaları nedeniyle tereyağ ve krema gibi ürünlerin acılaşmasında temel etmenler olarak görülmektedir [67]. Bunun yanında *Pseudomonas mephitica* ve *Pseudomonas nigrificiens* gibi türler daha az görülmekle birlikte ürünlerde istenmeyen aroma ve siyah renkli pigmentler şeklinde görülebilmektedir.

### Peynir

Peynire işlenecek sütte psikrotrof bakteri sayısında meydana gelebilecek her artış üretilen peynirin genel kalite özelliklerine olumsuz etki etmektedir. Bu bakteriler, çiğ sütte başlangıçta düşük olsa da, soğukta depolama süresince yüksek seviyelere ulaşabilmekte, bu nedenle de çiğ sütün peynir üretiminde kullanılabilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. İlk olumsuz etki sütün doğal plazmin sisteminin destabilizasyonudur. Psikrotrof bakterilerin proteinazları plazmin ve plazminojenin kazein misellerinden ayrılmasını teşvik etmektedir. Peynir üretiminde, plazmin ve plazminojen sütün peyniraltı suyu protein fraksiyonunda büyük ölçüde ayrılmaktadır. Bu işlem genellikle, başta peynirin aroma, tekstür ve peynir verimini önemli ölçüde etkilemektedir [83]. Sonuç olarak çiğ sütün rennin enzimi ile pıhtılaşma süresi azalmaktadır.

Sütün yalnızca  $10^3$  kob/mL seviyesinde psikrotrof bakterilerle kontaminasyonu ve 48 saat süreyle soğukta depolama peynir randımanını yaklaşık %4 oranında azaltabilmektedir [95]. *Pseudomonas* türleri ve/veya termostabil proteolitik enzimleri peynirde bazı kusurların görülmesine neden olmaktadır [47]. Dahası bu hidrolitik enzimler peynir pıhtısı ve daha sonraki olgunlaştırma aşamasında peynir aromasını olumsuz etkilemektedir [24].

*Pseudomonas* türlerinin özellikle de *P. fluorescens*'in proteinaz aktivitesi taze peynirlerde kayganlık ve renk oluşumuna, yarı sert ve sert peynirlerde ise daha büyük kayıplara, aroma, tekstür ve stabilite kayıplarına neden olmaktadır [49]. Örneğin, taze peynirlerde meydana gelen kaygan ve jelatimsi yüzey genellikle direk sütün *P. fluorescens*, *P. fragi* ve *P. putida* gibi Gram negatif psikrotrof bakterilerden kaynaklanmaktadır [23]. İndirekt etki ise söz konusu bu bakterilerin termostabil proteolitik enzimlerinin taze peynirin zayıf tekstür oluşturmasıdır.

*Bacillus* türleri de peynire işlenecek sütte uygulanan pastörizasyon sıcaklıklarında canlı kalabilen bakterilerdir. Bu bakteriler de sütün pıhtılaşma süresini ve pıhtı kalitesini olumsuz yönde etkileyen bakterilerdir [61]. Bu bakteriler sütte yavaş geliştiğinden, peynirdeki olumsuz etkileri  $10^6$  kob/mL aşımında ortaya çıkmaktadır. *Bacillus* türleri peynirlerde istenmeyen yapı gibi olumsuz özelliklere neden olmakta, bu olumsuz etkiler pek çok peynir çeşidinde ortaya çıkabilmektedir [15, 71].

### Kalite Kontrol Uygulamaları

Psikrotrof bakterilerin süt ve süt ürünlerinin olumsuz etkileri tartışılmaz bir konudur. Bu bakterilerin hemen hemen her yerde bulunabilmeleri ve düşük sıcaklıklarda gelişebilme özellikleri süt ve süt ürünlerinin bozulmalarına direkt veya indirekt olarak etki edebilmektedir. Çiğ sütün psikrotroflarla kontaminasyonu en iyi üretim şekillerinde bile ortaya çıkabilmektedir. Ancak çiğ sütün 4-6°C yerine 2°C'de depolanması bu bakterilerin gelişmelerini ve proteolitik ve lipolitik enzimleri üretmelerini önemli ölçüde azaltabilmektedir [80]. Ancak bu durum, başlangıç sayısı  $10^3$  kob/mL'den az olduğu durumlarda olabilmektedir. Çiğ sütün 65-69°C'de 15 saniye ısıtılması Gram negatif psikrotrof bakteri sayısını %77-97 oranında azaltabilirken, spor oluşturan Gram pozitif psikrotrof bakterileri etkileyememektedir [10]. Süt işletmelerinde kullanılan dolum üniteleri de psikrotrof bakteriler ile yeniden kontaminasyonun olası kaynaklarıdır. Bu nedenle dolum ünitelerinin düzenli bir şekilde kontrolü ve hijyenine yeteri kadar önem verilmesi gerekmektedir.

Gram pozitif spor oluşturan bakteriler alet ekipman yüzeylerinde oluşan biyofilmler vasıtasıyla da kontaminasyona neden olabilmektedir [20, 57]. Spor oluşturan bakteriler özellikle de *Bacillus* türleri farklı fizyolojik özelliklere sahip olmalarından dolayı pek çok kez süt ve süt ürünlerinde bulunabilmektedir. Sütün soğutma sıcaklıklarının doğru seçimi, ısı işlem uygulamaları ve baktöfugasyon tekniklerinin kombine olarak kullanımı bu bakterilerin kontaminasyonunun önlenmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ancak, son ürünün kontamine olmasının engellenmesi ve kontrolü çoğu zaman yetersiz olmaktadır. Gram negatif ve pozitif psikrotrofilik bakterilerin kontaminasyonun önlenmesi HACCP ve benzer kalite kontrol sistemlerinin kombine edilmesiyle çoğu kez kontrol altına alınabilmektedir. Ancak üretilen süt ürünü tipine bağlı olarak, su aktivitesi, pH ve antimikrobiyal ajanların kullanılması, etkin soğutma gibi uygulamalar önerilebilmektedir.

### SONUÇ

Yaklaşık son 50 yıldır süt ve ürünlerinde psikrotrof bakterilerin meydana getirdiği olumsuz etkiler pek çok araştırmaya konu olmuştur. Süt ürünlerinde yarattığı sorunlara ek olarak, bu bakteriler ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Bu nedenle bu bakterilerin tanımlanması ve süt ve ürünlerine bulaşmalarının kontrol altına alınması önemli bir konudur. Psikrotrof bakteriler süt ürünlerinin depolama sürelerini kısaltması ve bozulmalara neden olması ve bazılarının da patojen olmaları nedeniyle depolama ve işleme şartlarının etkili bir şekilde kontrolü gerekmektedir. Yalnızca düzenli ve etkili kontrollerle süt ve süt ürünlerine etkileri önlenmekte ve kaliteli süt ürünleri elde edilebilmektedir. Bu bağlamda, psikrotrof bakterilerin çiğ sütte bulunmaları çiğ sütteki toplam aerobik mezofilik bakteri yoğunluğu ile yakından ilişkili olduğundan, kaliteli çiğ süt elde edilmesine gereken önem verilmeli, dolayısıyla çiğ süt kalitesi mevzuatın öngördüğü düzeylerde olmalıdır.

## KAYNAKLAR

- [1] Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, M.V. (2006): Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science* 89(E. Suppl): E15-E19.
- [2] Beena, A.K., Ranjini, A.R., Riya, T.G., 2011. Isolation of psychrotrophic multiple drug resistant *Pseudomonas* from pasteurised milk. *Veterinary World* 4: 349-352.
- [3] Boor, K.J., Murphy, S.C., 2002. Microbiology of market milks. U knjizi: Dairy Microbiology Handbook, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 91-122. Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K., 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage causing bacteria: a possible basis for improved shelf life estimation. *Food Microbiology* 16: 531-540.
- [4] Brown, K.L., 2000. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* 56: 158-171.
- [5] Causin, M.A., 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection* 45: 172-207.
- [6] Cousins, C. M., Bramley, A.J., 1985. The Microbiology of Raw Milk. U knjizi: Dairy Microbiology, The Microbiology of Milk, (vol.1) edited by Robinson, R.K. Elsevier Applied Science Publishers, New York, 119- 164.
- [7] Cempírková, R., 2002. Psychrotrophic total bacterial counts in bulk milk samples. *Veterinary Medicine Czech* 47: 227-233.
- [8] Cempírková, R., Mikulová, M., 2009. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's milk. *Czech Journal of Animal Science* 54: 65-73.
- [9] Champagne, C.P., Laing, R.R., Roy, D., Mafu, A. A., 1994. Psychrotrophs in Dairy Products: Their Effects and Their Control critical reviews *Food science and Nutrition* 34: 1-30.
- [10] Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M., 2004. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. Isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal* 14: 495-504.
- [11] Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T., 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powder (review). *International Dairy Journal* 13: 255-275.
- [12] Christiansson, A., Bertilsson, J., Svensson, B., 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factor affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science* 82: 305-314
- [13] Constantin, O.E., 2009. Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 5: 18-22.
- [14] Corsetti, A., Rossi, J., Gobetti, M., 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69: 1-10.
- [15] Cousin, M.A., Marth, E.H., 1977. Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft* 32: 377-341.
- [16] Dogan, B., Boor, K.J., 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 130-138.
- [17] Elmher, H.M., 1998. Extended Shelf Life Refrigerated Foods: Microbiological Quality and Safety. *Food Technology* 52: 57 - 62.
- [18] Eneroth, A., Ahrne, S., Molin, G., 2000. Contamination of milk with Gram negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *International Journal of Food Microbiology* 57: 99-106.
- [19] Eneroth, A., Christiansson, A., Brendehang, J., Molin, G., 1998. Critical contamination site in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal* 8: 829-834.
- [20] Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F., 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26: 228-231.
- [21] Foltys, V., Kirchnerová, K., 2006. Mesophilic and psychrotrophic aerobe sporulating microorganisms in raw cow's milk. *Arhiva Zootechnica* 9: 41-55.
- [22] Fox, P.F., Guinee, T. P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. Microbiology of Cheese Ripening. Uknjizi Fundamentals of Cheese Science, An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 206- 232.
- [23] Fox, F.P. , 1981. Proteinases in Dairy Technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 35: 233-253.
- [24] Francis, K.P., Mayer, R., von Stetten, F., Gordon, S.A. Stewart, B., Scherer, S., 1998. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3525-3529.
- [25] Garbutt, J., 1997. Factor affecting the growth of microorganisms. Uknjizi Essentials of Food Microbiology, London, 54-86.
- [26] Gasse, M.A., Frank, J.F., 1991. Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. *Journal of Dairy Science* 74: 1503-1511.
- [27] Griffiths, M.W., 1990. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *Journal of Food Protection* 53:790-792.
- [28] Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M., 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7162-7168.
- [29] Hemalatha, S., Banu, N., 2010. DNA fingerprinting of *Bacillus cereus* from diverse sources by restriction fragment length polymorphism analysis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1: 136-144.
- [30] Holm, C., Jepsen, L., Larsen, M., Jespersen, L., 2004. Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 87: 1151-1157.
- [31] Huck, J.R., Hammond, B.H., Murphy, S.C., Woodcock, N. H., Boor, K.J., 2007. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-



- processing systems. *Journal of Dairy Science* 90: 4872-4883.
- [32] Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.W.J., Langeveld, L.P.M., 1998. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal* 8: 851-855.
- [33] Johnston, D.W., Bruce, J., 1982. Incidence of thermophilic psychrotrophs in milk produced in West Scotland. *Journal of Applied Bacteriology* 52: 333-337.
- [34] Koka, R., Weimer, B.C., 2001. Influence of growth conditions on heat stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Research* 68: 109-116.
- [35] Kumaresan, G., Annalvilli, R., 2008. Incidence of *Pseudomonas* species in pasteurised milk. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Science* 4: 56-59.
- [36] Kumura, H., Mikawa, K., Saito, Z., 1993. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *Journal of Dairy Research* 60: 229-237.
- [37] Lafarge, V., Ogier, J.L., Girard, Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchnet, A., 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5644-5650.
- [38] Langeveld, L.P.M., Cuperus, F., 1976. The relation between temperature and growth rate in pasteurized milk of different types of bacteria which are important to the deterioration of that milk. *Netherlands Milk Dairy Journal* 34: 106-125.
- [39] Larsen, H.D., Jørgensen, K., 1997. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 34: 179-186.
- [40] Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A., Griffiths, M.W., 1998. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 43: 159-171.
- [41] Magan, N., Pavlou, A., Chrysanthakis, I., 2001. Milk sense: a volatile sensing system recognises spoilage bacteria and yeasts in milk. *Sensors and Actuators B* 72: 28-34.
- [42] Marshall, R.T., 1982. Relationship between the bacteriological quality of raw milk and the final products a review. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 34: 149-157.
- [43] Martins, M.L., Pinto, C.L.O., Rocha, R. B., de Araújo, E.F., Vanetti, M.C.D., 2006. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 111: 144-148.
- [44] Matta, H., Punj, V., 1999. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology* 52: 59-62.
- [45] McGuigan, J.M., Gilmour, A., Lawrence, M.L., 1994. Factors influencing the recovery of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spp. from bulk raw milk. *Journal of the Society of Dairy Technology* 47: 111-116.
- [46] McPhee, J.D., Griffiths, M.W., 2002. *Pseudomonas* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 2340-2350.
- [47] Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W., 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection* 54: 969-979.
- [48] Mitchell, S.L., Marshall, R.T., 1989. Properties of Heat-stable proteinases of *Pseudomonas fluorescens*: characterization and hydrolysis of milk proteins. *Journal of Dairy Science* 72: 864-874.
- [49] Muir, D.D., 1996. The shelf life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49: 24-32.
- [50] Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T., 2006. The darker side of raw milk spoiling psychrotrophs. *Maataloustieteen Päivät* www.smts.fi.
- [51] Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T., 2005. Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* 161: 334-346.
- [52] Murugan, B., Villi, R. A., 2009. Lipolytic activity of *Bacillus* species isolated from milk and dairy products. *The Indian Veterinary Journal* 86: 80-81.
- [53] Nabdalik, M., Grata, K., Latala, A., 2010. Proteolytic activity of *Bacillus cereus* strains. *Proceedings of ECOpole 4*: 273-276.
- [54] Nörnerberg, M.F.B.L., Friedrich, R.S.C., Weiss, R.D.N., Tondo, E.C., Brandelli, A., 2010. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology* 63: 41-46.
- [55] O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79.
- [56] Poulsen, V.L., 1999. Microbial biofilms in food processing. *LWT-Food Science and Technology* 32: 321-326.
- [57] Robinson, R.K., Lucey, J.A., Tamime, Y., 2006. *Manufacture of Yoghurt. Fermented milk* edited by Tamime, Y., Blackwell Science Ltd, Oxford, 53-71.
- [58] Rosslund, E., Langsrud, T., Sorhaug, T., 2005. Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 103: 69-77.
- [59] Rowe, M.T., Johnston, D.E., Kilpatrick, D.J., Dunstall, G., Murphy, R.J., 1990. Growth and extracellular enzymes production by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. *Milchwissenschaft* 45: 459-499.
- [60] Rukure, G., Bester, B.H., 2001. Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. *Food Control* 12: 31-36.
- [61] Senesi, S., Ghelardi, E., 2010. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins* 2: 1690-1703.
- [62] Shah, N.P., 1994. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft* 49: 432-437.
- [63] Sillankorva, S., Neubauer, P., Azeredo, J., 2008. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *BMC Biotechnology* 78, Open Access 1-12.

- [64] Sørhaug, T., Stepaniak, L., 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* 8: 35-41.
- [65] Spiers, J.S., Buckling, A., Rainey, P.B., 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146: 2345-2350.
- [66] Stead, D., 1986. Microbial lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research* 53: 481-505.
- [67] Stepaniak, L., 2002. Psychrotrophic Bacteria, Bacteria Other than *Pseudomonas* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, 2345- 2351.
- [68] Suhren, G., 1989. Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food. U knjizi: Producer Microorganisms. Edited by McKellar, R.C CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 4-34.
- [69] Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., Christiansson, A., 2004. Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* 14: 17-27.
- [70] Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S., 1999. Microbiology of Milk U knjizi: Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes, edited by Marcel Dekker, Inc, New York, 149-170.
- [71] Wang, L., Jayarao, B.M., 2001. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science* 84: 1421-1429.
- [72] Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182: 2675-2679.
- [73] Wiedmann, M., Wellmeier, D., Dineen, S.S., Ralyea, R., Boor, K.J., 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2085-2095.
- [74] Wijman, J.G.E., de Leeuw, P.P.L.A., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T., 2007. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1481-1488.
- [75] Zall, R.R., 1985. Control and Destruction of Microorganisms. U knjizi: Dairy Microbiology vol 1.ed. Robinson, R.K. Elsevier Applied Science Publishers, London, 77-117.
- [76] Santana, E.H.W., de Beloti, V., Müller, E.E., Ferreira, M.A.de., Morales, L.B.de., Pereira, M.S., Gusmão, V.V., 2004. Milk contamination in different points of dairy process. ii) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias; Londrina* 25: 349-358.
- [77] Simões, M., Simões, L.C., Vierira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43: 573-583.
- [78] Randolph, H., 2006. Identifying spoilage bacteria and potential shelf- life problems. *Dairy Food/Find Article* 1-3.
- [79] Kumarsan, G., Annalvilli, R., Sivakumar, K., 2007. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Science Research* 3: 1383-1387.
- [80] Johnston, D.W., Bruce, J., 1982. Incidence of thermophilic psychrotrophs in milk produced in West Scotland. *Journal of Applied Bacteriology* 52: 333-337.
- [81] Kornacki, J.L., Flowers, R.S., 1998. Microbiology of Butter and Related Products. U knjizi Applied Dairy Microbiology edited by Marth, E.H., Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc., New York, 109-130.
- [82] Fajardo-Lira, C., Nielsen, S.S., 1998. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. *Journal of Dairy Science* 81: 901-908.
- [83] Janštová, B., Lukášová, J., Dračková, M., Vorlová, L., 2004. Influence of *Bacillus* spp. enzymes on ultra high temperature-treated milk proteins. *Acta Veterinaria Brno* 73: 393-400.
- [84] Janštová, B., Dračková, M., Vorlová, L., 2006. Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultra high temperature processing. *Acta Veterinaria Brno* 75: 601-609.
- [85] Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski T., Scoging, A.C., 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4637-4645.
- [86] Ren, T.J., Frank, J.F., Christen, G.L., 1988. Characterization of lipase of *Pseudomonas fluorescens* 27 based on fatty profiles. *Journal of Dairy Science* 71: 1432-1438.
- [87] Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 1037-1062.
- [88] López, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2010. Biofilms. Cold Spring Harbor *Perspectives in Biology* 2:a000398, 1-11.
- [89] Gaunot, A-M., 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia* 42:1192-1197.
- [90] Lukašová, J., Vyháňková, J., Pácová, Z., 2001. *Bacillus* species in raw milk and in the farm environment. *Milchwissenschaft* 56: 609-611.
- [91] Ledford, R.A., 1998. Raw milk and fluid milk products. *Applied Dairy Microbiology* 41: 55-64.
- [92] Samaržija, D., Podoreški, M., Sikora, S., Skelin, A., Pogačić, T., 2007. Mikroorganizmi uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* 57: 251-273.
- [93] Samaržija, D., 1993. Upotreba Dip-slide metode za brzo određivanje ukupnog broja bakterija i broja *Pseudomonas* spp. u pastereziranom mlijeku. Magistarski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1-65.
- [94] Leitner, G., Silanikove, N., Jacobi, S., Weisbitt, L., Bernstein, S., Merin, U., 2008. The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. *International Dairy Journal* 18: 109-113.
- [95] Svenson, B., Monthan, A., Shaheen, R., Andersson, A.M., Salkinoja-Salonen, M., Christiansson, A., 2005. Occurrence of emetic toxin

producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal* 16: 740-749.  
[96] Adams, D.M., Barach, J.T., Speck, M.L. (1976):  
Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on

milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of Dairy Science* 59: 823-827.

---