

## Koliform Mikroorganizmalarda Fosfataz Enzimi Aktivitesi

Yard. Doç. Dr. Yavuz BEYATLI

Gazi Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü — ANKARA

### ÖZET

Bu çalışmada; çiğ, evapore kondanse, retentate sütlerde ve % 11 kurumaddeli yağsız süt besiyerinde (NFM) koliform sayıları ile fosfataz enzimi aktivitesi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Koliform bakterilerin düşük miktarda fenolik bileşikler ürettiği, retentate süt ve kondanse sütle koliform bakteri kalmadığı saptanmıştır. 74°C'de 16 saniye süreli ısı uygulaması tüm koliformların yıkımı ve negatif fosfataz değeri alınması için yeterli bulunmuştur.

### SUMMARY

#### ENZYM PHOSPHATASE ACTIVITY OF COLIFORM MICROORGANISMS

Relationship between coliform numbers and phosphatase value in raw, retentate, evaporated condensed and skim milk medium have been estimated. Coliforms produced low amounts of phenolic compounds. Retentate whole milk and evaporated condensed milks did not contain coliforms. Effect of different temperature on the number of coliforms and phosphatase value in these milk medium have been estimated. Using a temperature of 74°C for 16 sec was sufficient for destruction of all coliforms and obtaining phosphatase negative value.

### GİRİŞ

Süt ya da süt ürünlerinde pastörizasyonun yeterli yapıp yapılmadığı alkali fosfatazının ölçülmesi ile anlaşılır. Bu enzim 71,1°C'de 15 saniye veya 62,8°C'de 30 saniye ısı uygulaması ile tahrip olur (4).

Marth'a göre fosfataz testi süt ürünlerinde yeterli pastörizasyon uygulanıp uygulanmadığını veya pastörize edilmiş süte çiğ süt katılıp katılmadığının kontrolünde kullanılan bir testtir (3).

Çalışmalar, bütün sütün fosfataz enzimi içerdiğini, bunun ısıya dayanıklılığının, sütle doğal olarak bulunan ve spor oluşturmeyen patojen bakterilerin enzimlerinin ısıya dayanıklı-

lığından daha yüksek olduğunu göstermiştir. Fosfataz testi sütle kalan fosfatazın aktivitesi üzerinden yetersiz pastörizasyonu gösterir. Substrattan açığa çıkan fenol miktarı enzimin aktivitesi ile orantılıdır. Süt ürünlerinde (özellikle kremada) mikroorganizmalar tarafından üretilen fosfataz olabileceği gösterilmiştir (1, 2).

Evaporasyon ile koyulaştırılmış ve ultrafiltrasyon ile elde edilmiş retentate süt, bugün yeni süt ürünlerinin imalatında kullanılmaktadır. Teknolojide bu sütün kullanılması nedeni ekonomik ve son ürün kalitesindeki yükselmedir. Bu konsantre sütün, istenilen son konsantrasyona göre değişen sıcaklık ve süre uygulamaları ile elde edilirler. Genellikle retentate süt 50°C'de, evaporasyon ile koyulaştırılmış süt 54°C'de elde edilir. Bu iki tip işlenmiş sütle fosfataz aktivitesi ve koliform bakterilerin canlılığı bilinmemektedir. Eğer fosfataz aktivitesi pozitif değerde ise ve koliform bakteriler varsa, bu durum ürün kalitesini etkiler.

Bu çalışmada;

a) Çiğ süt, evaporasyon ile kondanse edilmiş ve retentate sütlerde koliform bakterilerin sayısı ve fosfataz değeri belirlenmiş,

b) Koliform sayısı ve enzim aktivitesine çeşitli sıcaklıklardaki ısı uygulamasının etkisi araştırılmış,

c) Bu sütlerde ısı uygulaması öncesi ve sonrasında koliform sayısı ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki kontrol edilmiş,

d) Koliformlar ile fosfataz enzimi arasındaki ilişkinin son değerini bulmak amacıyla sterilize edilmiş skimmilk ortamı ile de çalışılmış,

e) Kondanse sütlerde ve retentate sütlerde fosfataz enziminin ve koliform bakterilerinin inaktivasyonu için gerekli en etkin ısı uygulamasının seçimi üzerinde çalışılmıştır.

### MATERYAL ve YÖNTEM

Kültürler : E.coli ve E.aerogenes'in saf kültürleri «Cornell» Üniversitesi «Food Scien-

ce» bölümünden sağlanmıştır. % 11 NFM (non-fat skim milk medium) besiyerinde 30°C da 16 saat süre ile 3 ardışık tranfer ile aktiveleştirilen kültürler daha sonra karıştırılmış ve test ortamına ilave edilmişlerdir.

**Süt Ortamları :** Çiğ süt Cornell Üniversitesi Veteriner Çiftliğinden; retentate süt (2:1), tam yağlı sütün Abcor - 225 model ultrafiltrasyon cihazında 50°C da doğrudan ultrafiltrasyonu ile; evaporasyon ile kondanse edilmiş süt (2:1), tam yağlı sütün APV evaporatörde 54°C doğrudan evaporasyonu ile elde edilmiştir. Son iki süt, kullanılcaya kadar 4°C de korunmuştur.

**Inokülasyon :** Koliform bakteri karışımı; yaklaşık 10<sup>8</sup>/ml; yaklaşık 10<sup>4</sup>/ml ve yaklaşık 10<sup>5</sup>/ml olmak üzere 3 farklı düzeyde sütlere ilave edilmiştir.

**Isı Uygulaması :** 3 farklı oranda aşılansmış sütler 54, 64, 74, 84°C sıcaklıklarda 16 saniye süre ile ısıtılmışlardır.

**Analizler :** Sütlerde;

— Isı uygulaması sonrasında canlı ko-

lifform sayısı Deoxycholate Agar besiyerinde belirlenmiştir. Isı uygulaması sonunda yıkıma uğrayan koliform bakteri oranı

$$\% \text{ yıkım} = 100 - \frac{\text{son sayı}}{\text{ilk sayı}} \times 100 \text{ formülü}$$

ile hesaplanmıştır.

— Alkali fosfataz aktivitesi Kosikowski'ye göre (4) fenol değeri /5 ml örnek değeri üzerinden ölçülmüştür.

NFM ortamında fosfataz değeri ile koliform sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere % 11 kurumaddeli NFM hazırlanmış, 121°C de 15 dakika süre ile sterilize edilmiş, 30°C ye soğutulmuş, % 1 aktif koliform karışık kültürü ile aşılansmış ve 30°C de 4, 8, 12, 16, 20, 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu sütlerde de fosfataz değeri ve koliform sayısı yukarıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

#### ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

NFM ortamında fosfataz - enzimi aktivitesi ve karışık koliform bakterilerin sayısı Çizelge 1'de verilmiştir.

**Çizelge 1. % 11 NFM ortamında fosfataz aktivitesi ve koliform bakteri sayısı**

Inkübasyon süresi (30°C'de saat)	Koliform sayısı /ml	Fosfataz değeri µg fenol/5 ml
4	6x10 <sup>7</sup>	2,06
8	30x10 <sup>7</sup>	2,19
12	130x10 <sup>7</sup>	2,30
16	240x10 <sup>7</sup>	2,45
20	310x10 <sup>7</sup>	2,57
24	370x10 <sup>7</sup>	2,62

Doğal fosfataz enzimi sterilizasyon ile elimine edilmiş, aktif koliform kültürü ile aşılansmış ve 30°C'de farklı sürelerde inkübasyona bırakılmış % 11 NFM besiyerinde inkübasyon süresi uzadıkça fenolik bileşiklerin arttığı görülmüştür. En düşük fenolik bileşikler miktarı 4 saat sonunda 2,06 µg fenol/5 ml; en düşük koliform sayısı yine 4 saat inkübasyon sonunda 6,0x10<sup>7</sup>/ml olarak tespit edilmiştir. En yüksek değerler ise 24 saat inkübasyon sonunda 2,62 µg fenol bileşikleri /5 ml ve 3,7x10<sup>9</sup>/ml'dir. En yüksek ve en düşük fenol değerleri arasındaki fark 0,56 µg fenol /5 ml olup, bu artış koliform sayısındaki artış ile kıyaslandığın-

da, koliform bakterilerin skim milk ortamında düşük bir enzim aktivitesi gösterdiği anlaşılır.

Çiğ sütte farklı derecelerde ısı uygulamasının koliform sayısı ve fosfataz değeri üzerine etkisi Çizelge 2'de görülmektedir.

Çiğ sütte fosfataz enzimi aktivitesi 64°C' de 16 saniyelik ısı uygulaması ile limitlenmiş, 74 ve 84°C'de 16 saniye ısı uygulaması ile inhibe edilmiştir. Benzer sonuçlar ultrafiltrasyon ile elde edilmiş retentate ve evaporasyon ile yoğunlaştırılmış (2:1) kondanse sütlere de elde edilmiştir. (Çizelge 3 ve 4).

Çiğ süt ve evapore kondanse süte oranla sütte fosfotaz enzimi aktivitesi daha düşüktür.

**Çizelge 2. Çiğ sütte farklı derecelerde ısı uygulamasının koliform sayısı ve fosfataz değeri üzerine etkisi\***

Isı Uygulaması °C	Koliform Sayısı/ml		% Ölüm	Fosfataz Değeri
	Isı Uyg. Öncesi	Isı Uyg. Sonrası		
54°C	A = 7,8x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	48,7	—
	B = 1,8x10 <sup>5</sup>	8,6x10 <sup>3</sup>	52,2	—
	C = 1,0x10 <sup>6</sup>	7,0x10 <sup>5</sup>	30,0	—
64°C	A = 7,8x10 <sup>3</sup>	0	100	13,25
	B = 1,8x10 <sup>5</sup>	30	99,99	16,83
	C = 1,0x10 <sup>6</sup>	450	99,95	20,50
74°C	A = 7,8x10 <sup>3</sup>	0	100	0,74
	B = 1,8x10 <sup>5</sup>	0	100	0,80
	C = 1,0x10 <sup>6</sup>	0	100	1,03
84°C	A = 7,8x10 <sup>3</sup>	0	100	0,47
	B = 1,8x10 <sup>5</sup>	0	100	0,50
	C = 1,0x10 <sup>6</sup>	0	100	0,66

\* Çiğ sütte koliform sayısı 5,2x10<sup>2</sup>/ml, fosfataz aktivitesi 7,40 µg fenol/5 ml olarak ölçülmüştür.

**Çizelge 3. Retentate sütte (2:1) farklı derecelerde ısı uygulamasının koliform sayısı ve fosfataz enzimi aktivitesine etkisi\***

Isı Uygulaması °C	Koliform Sayısı/ml		% Ölüm	Fosfataz Değeri
	Isı Uyg. Öncesi	Isı Uyg. Sonrası		
54°C	A = 1,3x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	23,1	21,33
	B = 1,4x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	3,7	26,53
	C = 1,1x10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>6</sup>	9,1	31,58
64°C	A = 1,3x10 <sup>3</sup>	0	100	11,58
	B = 1,4x10 <sup>5</sup>	0	100	12,79
	C = 1,1x10 <sup>6</sup>	0	100	12,93
74°C	A = 1,3x10 <sup>3</sup>	0	100	1,25
	B = 1,4x10 <sup>5</sup>	0	100	0,92
	C = 1,1x10 <sup>6</sup>	0	100	0,92
84°C	A = 1,3x10 <sup>3</sup>	0	100	0,70
	B = 1,4x10 <sup>5</sup>	0	100	0,77
	C = 1,1x10 <sup>6</sup>	0	100	0,88

\* Retentate sütte koliform saptanamamıştır. Fosfataz değeri 15,75 µg fenol/5 ml'dir.

Bu sonuç, sütün 54°C'de 1 saat'lik ısı uygulaması ile elde edilmiş olması ve bu sırada doğal fosfataz enziminin inhibe olmasından kaynaklanmaktadır.

Süt örneklerinin 3 farklı konsantrasyondaki karışık koliform kültürü ile aşılmalari ile koliformun bu sütte kayda değer bir fosfataz değeri artırmadığı görülmüştür (Çizelge 2, 3, 4). Bu sonuç % 11 NFM ortamından elde

edilen sonuçla da uyumaktadır. (Çizelge 1).

Çiğ sütte 5200 adet/ml koliform bakteri olduğu saptanmıştır. retentate süt ve evapore kondanse sütte koliform bakteriye rastlanmaması bunların işlem sırasında ömellerinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 2, 3 ve 4'den koliform bakterilerin sayıları üzerinde ısı uygulamasının etkileri izlenebilir. 54°C'de 16 saniye ısı uygulaması ile

**Çizelge 4. Kondanse sütte (2:1) farklı derecelerde ısı uygulamasının koliform sayısı ve fosfotaz enzimi aktivitelerine etkisi\***

Isı Uygulaması °C	Koliform Sayısı/ml			Fosfataz Değeri
	Isı Uyg. Öncesi	Isı Uyg. Sonrası	% Ölüm	
54°C	A = 1,2x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	8,3	—
	B = 1,3x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	7,7	—
	C = 1,2x10 <sup>6</sup>	9,0x10 <sup>5</sup>	25,0	—
64°C	A = 1,2x10 <sup>4</sup>	0	100	15,20
	B = 1,3x10 <sup>5</sup>	0	100	16,19
	C = 1,2x10 <sup>6</sup>	0	100	18,14
74°C	A = 1,2x10 <sup>4</sup>	0	100	0,42
	B = 1,3x10 <sup>5</sup>	0	100	0,63
	C = 1,2x10 <sup>6</sup>	0	100	0,63
84°C	A = 1,2x10 <sup>4</sup>	0	100	0,60
	B = 1,3x10 <sup>5</sup>	0	100	0,71
	C = 1,2x10 <sup>6</sup>	0	100	1,11

\* Kondanse sütte koliform saptanamamıştır. Fosfotaz değeri 12,60 µg fenol/5 ml'dir.

çiğ sütte, inokülüm miktarına göre değişmek üzere. % 30-48,7 arasında yıkım sağlanmıştır (Çizelge 2). Yıkım oranı retentate sütte % 9,10-23,08 arasında (Çizelge 3), evopore kondanse sütte ise % 7,7-25 arasında değişmektedir. (Çizelge 4). İşlem görmüş sütlerde koliform yıkımı çiğ süte göre daha yüksektir. 64°C'de 16 saniye ısı uygulaması 7800 adet/ml düzeyinde (A düzeyi) koliform bakterilerini yıkıma uğratmıştır. Aynı sıcaklık ve süredeki ısı uygulaması ile daha yüksek düzeylerdeki (B ve C düzeyleri) yıkım % 99,99'dur.

Retentate süt ve evopore kondanse sütlerde 64, 74 ve 84°C'lerde 16 saniye ısı uygulaması ile koliform bakteriler tamamen ölmüştür. 74 ve 84°C'lerde 16 saniye ısı uygulaması, çiğ, retentate süt ve evopore kondanse sütlerde koliformun tamamen inhibe edilmesi ve ne-

gatif fosfotaz değeri elde edilmesi için yeterlidir.

### SONUÇ

— Retentate süt ve evopore kondanse sütlerde işlem sonrası koliform bakteri yoktur.

— Koliform sayısı ile fosfotaz enzimi miktarı arasında pozitif bir korrelasyon vardır. Bununla beraber bu enzimin aktivitesi düşük ve koliformlar tarafından üretilen fenolik bileşikler miktarı azdır.

— En düşük fosfataz değeri retentate sütte elde edilmiştir.

— Doğal fosfotaz enzimi ve koliformlar tarafından üretilen fosfotaz enzimi 64°C'de 16 saniye ısı uygulaması ile inhibe edilmiştir. Aynı ısı değeri tüm koliformların yıkımı için yeterlidir.

### KAYNAKLAR

1. Barber, F. W., W. C. Frazier. 1943. The development of a positive phosphatase test in refrigerated pasteurized cream. J. Dairy Sci. 26: 343-352.
2. Hammer, B. W., H. C. Olson. 1941. Phosphatase production in dairy products by microorganisms. J. Milk Technol. 4: 83-85.
3. Marth, E. H. 1978. Standard methods for the examination of dairy products. 14 th Ed. American Public Health Association, Inc.
4. Kosikowski, F. V. 1977. Cheese and Fermented Milk Foods. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, Michigan.