

## Yoğurdun Mikrobiyolojik Kontrollerinde Karşılaşılan Yanılgılar ve Sorunlar

Doç. Dr. Şeminur TOPAL

TÜBİTAK - Marmara Araştırma Merkezi

Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü — Gebze - KOCAELİ

### ÖZET

Farklı selektif ortamlar kullanılarak yapılan mikrobiyolojik yoğurt analizleri, özellikle koliform belirlemelerinde çeşitli yanılgılı durumlarla karşılaşılabilirdiğini göstermiştir. Çalışmada yoğurtta ki maya kontaminasyonlarına bağlı olarak gelişebilen bu yanılgıların açıklanması ve ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Konuyla ilgili tüzük ve yönetmelik aksaklıkları, gunların giderilmeleri hususları ve analizcilerin karşılaştıkları diğer mikrobiyolojik kontrol problemleri de ele alınarak bazı öneriler getirilmeye çalışılmıştır.

### SUMMARY

#### CONFOUNDERS ENCOUNTERED IN THE MICROBIOLOGICAL CONTROL OF YOGHURT

The various confounders especially on coliform determinations of yoghurt have been detected by using different selective media. In this study, resolution and elimination of these problems depended on undesirable yeast contamination of yoghurt was investigated. Also some Turkish regulations, rules and other microbiological control problems which are concerning on this subject were investigated and have been tried to find some advices.

### GİRİŞ

Yoğurt, bilinen en eski ve popüler fermente süt ürünüdür. İnsan beslenmesinde gerek bileşim ve gerekse duyuşal özellikleri bakımından önemli bir yere sahip olan yoğurt, tüketim alışkanlıklarımız bakımından güncelliğini uzun yıllardır korumaktadır. Geleneksel bir ürünümüz olma özelliği yanında, dünyadaki ününü Türkiye kökenli yerel bir ürün olarak kazanması nedeniyle iyi sahiplenmemiz gereken değerli bir besindir.

Uluslararası kapsamlı sözlük olan «Webster» 1988-1989 yılı 9. baskısında «Yogurt, yaourt, yoghurt, yaourt, Jaogurt : Türkiye ve Bulgaristan kökenli, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterileriyle sütün fermantasyonu sağlanarak elde edilen, barsaklar üzerindeki faydalı etkisiyle de önerilen yarı katı bir ürün» olarak tanımlanmaktadır. Benzeri tanımlamalar «The Word Book Encyclopedia (1988)» ve «The New Encyclopedia Britannica (1988)»da da yapılmakta ve özellikle «... bütün teorilere rağmen Türkiye'de keşfedilen bir ürün...» olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca yoğurdun zengin bir kompleks B vitamini kaynağı olduğu, kolay hazmedilebildiği, hoş aroması ve yüksek besleyici değeri olduğu ifade edilmektedir. Barsak sistemindeki intoksiyonlarda önleyici ve bazı hazım problemlerinde özel kürlerle tedavi edici özellikleri de bildirilmektedir (KROGER, 1989).

Yoğurdun kolay hazımlanabilirliği ve besin değerindeki üstünlüğünün yanı sıra, oluşumdaki starter kültürlerin etkisiyle çeşitli aroma maddelerinin şekillendiği, bunların 4 ana kategoride toplanabileceği bildirilmektedir. Bunlar; uçucu olmayan asitler (laktik, pirüvik, oksalik veya süksinik asitler), uçucu asitler (formik, asetik, propiyonik, butirik asitler), karbonil bileşikleri (asetaldehit, aseton, asetoin ve diasetil) ve/veya proteinin ısı yıkımına bağlı yan ürünlerle, yağ, laktoz m.b. çeşitli bileşiklerdir (TAMIME ve ROBINSON, 1985).

Günümüz toplumunda süt ve ürünleri başta olmak üzere çeşitli gıda maddelerindeki katkıları açısından da, tüketicilerce en güvenilir ürün olarak yoğurdun tercih edildiği bildirilmektedir (GROMLEY ve CORMICAN, 1988).

DPT'nin yıllık programlarına göre 6.400.000 ton olan süt üretimimizden 378.000 ton yoğurt üretildiği bildirilmesine (ÜLGÜRAY, 1986) karşın, evsel üretimin çok yaygın olup bu rakam içine alınmadığı düşünülmektedir. Uluslararası Sütçülük Federasyonuna (IDF) üye olan 28 ül-

kenin yıllık üretim ve tüketim değerleri incelendiğinde (KROGER ve ark., 1989), Japonya ve ABD üretimleriyle kıyaslanabilir bir potansiyelimiz mevcuttur. Bu ülkelerde de 1966'dan beri yıldan yıla hızla artan bir tüketim hızı bildirilmektedir. Aynı kaynakta yoğurt, hem geleneksel hem de sanayi tipi bir ürün olarak gösterilmekte, sağlık açısından yararlılığı ve terapotik etkisinden övgü ile söz edilmektedir.

Yoğurdun Gıda Maddeleri Tüzüğü'müz'de (ANON, 1988) ve ilgili Standardında (ANON, 1989) tanımları yapılmış, özgün normları geliştirilmiş olmasına karşın, çelişkili ve teknoloji ile ters düşen mikrobiyolojik kısıtlamalar getirilmiştir. Ayrıca yine mikrobiyolojik kontrolüne ilişkin pek çok değişik yorumun gündemde oluşu, çalışmayı planlamamızda etken olmuştur.

Bilindiği gibi gıdaların mikrobiyolojik kontrolü; ürün, üretici ve tüketici açısından çeşitli güvencelerin sağlanması yönünde bir hizmet ve zorunluluktur. Bunlar, 1) Gıdaların halk sağlığı ile ilgili ve uzmanlarca belirlenen kurallara ve normlara uygunluk durumunun incelenmesine bağlı olarak tüketimdeki güvenceyi sağlama, bir başka deyişle halk sağlığını korumak amacıyla gıdaların hijyenik uygunlukta sunulmasının sağlanması; 2) Ürünün bozulmaya uğramadan, saklama süresinin yani «raf ömrünün» belirlenmesi; 3) Sanayinin üretimde gıdaların duysal uygunluklarının sağlanmasına yönelik teşvik edici rol oynaması bakımından önemlidir (SULLIVAN ve MULLER, 1979; TAMIME ve ROBINSON, 1985). Bu özellikler göz önüne alınarak, mikrobiyolojik kontrollerdeki hassasiyet ve doğruluk yanında, örnekleme ve değerlendirme aşamalarında gösterilecek özen, ürünün gerçek niteliklerini belirleyecektir. Bunun sonucu olarak da üretici ve tüketicilerin güç durumlarla karşılaşmaları da önlenebilecektir.

Bütün bu değerlendirmeler esas alınarak, yoğurt gibi çok tüketilen ve geleneksel bir ürünümüzün mikrobiyolojik incelemesinde sürekli gündemde olan kontrol sorunlarının araştırılması amaçlanmıştır. Böylece üretici ve tüketiciye yansiyacak kuşku ve endişelerin giderilmesi yönünde hizmet verilebileceğine inanılmaktadır.

## ÖZDEK VE YÖNTEMLER

### ÖZDEK

#### a. Yoğurt Örnekleri

Araştırmada mikrobiyolojik kaliteleri incelenmek üzere, çeşitli markalarla pazarlara n10 ayrı yoğurt örneği, Gebze ve İstanbul piyasasında tüketime sunulduğu marketlerden alınmıştır. Ayrıca bu örnekler içinde mikrobiyolojik açıdan en iyi durumu gösteren ve vakum evaporasyonla konsantre edilerek piyasaya sunulan bir marka, çalışmanın planlanan ikinci aşaması için kullanılacak örnek olarak belirlenmiş ve ileriki çalışmalar, bu markalı yoğurtla sürdürülmüştür.

#### b. Test Organizmaları

Bölümümüzde bulunan kültür koleksiyonundaki 24 maya kültürü, tek tek selektif maya ve koliform ortamlarında denenmiş bunların aşağıda verilen 5 adedi test organizması olarak seçilmiştir.

*Candida lipolitica* (MAM CL)

*Rodotorula glutinis* (MAM Rg)

*Saccharomyces cerevisiae* (MAM 70214)

68 ÜFBM (\*) (MAM 68)

*Candida scottii* (M<sub>1</sub>) (MAM 70215)

Ayrıca yine selektif koliform ve genel bakteri ortamlarında üretilen ve aktivitesi kontrol edilen *Escherichiae coli* (MAM 70555) karşılaştırma amacıyla kontrol test organizması olarak kullanılmıştır.

### YÖNTEMLER

Piyasadan alınan yoğurt örnekleri mikrobiyolojik açıdan ANON (1989)'a göre incelenmiş, koliform ve maya-küf varlığı ve sayıları araştırılmıştır. Test kültürleri inokule edilerek kontrole alınacak yoğurt örneği de sonuçların karşılaştırılması için inokulasyon öncesi ve sonrasında yine aynı yöntemlerle maya-küf ve koliform açısından incelenmiştir. Bu örnek alt gruplarında ayrıca mikroskopik inceleme de yapılmıştır (RICHARDSON, 1985).

(\*) : 68 Üst Fermantasyon Bira Mayası, *S. cerevisiae*'nin bir varyetesidir.

Kültür süspansiyonları, test organizmalarının selektif ortamlarındaki 48 saat (s)'lik yatkın kültürlerinden steril fizyolojik su ile yıkanarak,  $>10^8$  koloni/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlanmıştır (BOOTH, 1971). İnokulumlar yoğurda ayrı ayrı ve % 1 oranlarında ilave edilerek, alt gruplar halinde incelemeye alınmıştır.

Koliform analizlerinde ANON (1989)'daki standart kültürel yöntemle «Violet Red Bile Agar» (VRBA)'a ekim yapıldığı gibi; diğer standart koliform incelemelerinde önerilen «Eosin Metilen Blue Agar» (EMB) ve «Endo Agar» (EA) gibi diğer selektif ortamlara da aynı tekniklerle ekimler yapılmış, üreme durumları karşılaştırılmıştır. Sıvı koliform ortamları olarak da «Laktöz Broth» (LB), «Mac Conkey Broth» (MCB) (ANON, 1982) kullanılmış. «En Muhtemel Sayı» (EMS) yöntemleri 3 tüp tekniği ile uygulanmıştır. Gaz oluşumu görülen tüplerden EMB ortamlarına sürme yapılarak ve metalik parlaklık görülen plaklardan da EC Broth ortamlarına alınarak, fekal koliform aran-

masında önerilen yol izlenmiştir (ROBINSON, 1981 a; TAMIME ve ROBINSON, 1985). Bu incelemeler örnekler test kültürleri süspansiyonları için ayrı ayrı yapılmıştır.

Hem örneklerde, hem de test organizmalarına ait inokulumlarda «Toplam Canlı Bakteri» ve «Maya-küf» sayısı standart kültürel yöntemle incelenmiş, mayalar için Malt Agar (MA), bakteriler içinde «Plate Count Agar» (PCA) kullanılmıştır (HARRIGAN ve McCANCE, 1976; ROBINSON, 1981 a; RICHARDSON, 1985). Ayrıca üreyen kolonilerden hazırlanan preparatlara Gr-boyama tekniği uygulanarak, mikroskopik incelemeye tabi tutulmuş, hücre morfolojisi ve kültürel özellikler dikkate alınarak değerlendirilmiştir (HARRIGAN ve McCANCE, 1976)

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Piyasadan alınan yoğurt örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizlerin bulguları ÇİZELGE 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Yoğurt Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Bulguları.  
KOLIFORM BAKTERİ SAYISI (Koloni/g)

Piyasa Örn.	Maya - Küf (koloni/g.)	EMS Yöntemiyle LB	MCB	Kültürel Yöntemle VRBA	EMB	Mikroskopik İnceleme
1	$5 \times 10^4$	$> 2400$	—	—	$34 \times 10^3$	DF <sup>(1)</sup> + Maya
2	$11 \times 10^4$	75	—	—	$5 \times 10^3$	DF + Maya
3	—	240	460	$2 \times 10^2$	$36 \times 10^2$	DF + KÇ <sup>(2)</sup>
4	$44 \times 10^2$	$> 2400$	—	—	$3 \times 10^3$	DF + Maya
5	$25 \times 10^4$	75	43	$2 \times 10^3$	$15 \times 10^3$	DF + Maya
6	$1 \times 10^2$	$> 2400$	—	—	$2 \times 10^3$	DF + Maya
7	—	$> 2400$	1100	$15 \times 10^2$	$11 \times 10^2$	DF + KÇ
8	—	—	—	—	—	DF
9	$18 \times 10$	1100	—	—	$1 \times 10^2$	DF + Maya
10	—	240	150	$2 \times 10^2$	$3 \times 10^2$	DF + KÇ

(1) DF : Doğal yoğurt mikroflorası olan uzun çubuk streptococlar

(2) K.Ç : Kısa çubuklar

Çizelge 1'den de görüldüğü üzere, piyasadaki yoğurtların büyük bir bölümünde maya kontaminasyonları belirlenmiştir. Ancak örneklerin bir bölümünde koliform için seçic ortam olan EMB ortamında metalik parlak, düzgün ve konveks koloniler saptanmasına karşın, VRBA ortamında üreme olmamış, yapılan mik-

roskopik incelemelerle bu kolonilerin maya hücrelerinden oluştuğu belirlenmiştir. LB ortamında (+) üreme olarak değerlendirilen gaz oluşumu gözlenen tüplerden, EMB ortamına yapılan sürme pasajlarında metalik parlaklık göstererek gelişen kolonilerden yapılan mikroskopik incelemelerin bir bölümünden de sadece

maya hücreleri gözlenebilmiştir. EMB'den, EC-Broth ortamlarına yapılan pasajların 44,5°C'deki inkubasyonunda gaz gözlenmemiş ve fekal bir üremenin olmadığı kanısına varılmıştır.

Ancak EMB ortamında bu tarz tipik koliform üremesi olarak gözlenmesine karşın, mikroskobik incelemelerde maya kontaminasyonuna bağlı üremenin söz konusu olması, değerlendirilmede bir yanılgıya neden olabileceğini ortaya koymuştur. Bu durum, yoğurdun doğal ve maya ile inokule edilerek koliform ortamlarında ayrıntılı olarak incelenmesi konusunu gündeme getirmiştir. Esasen bu selektif ortamda koliform üremesi için tipik olarak bildirilen metalik parlak üremenin başka mikroorganizmalar için gözlenmediğine ilişkin literatür verileri de mevcuttur (ROBINSON, 1981 b). Aynı kaynaktan *E.coli*'nin glukoz ve diğer karbonhidratları fermente edebildikleri, buna bağlı olarak laktik, asetik ve formik asit üretebildikleri, oluşan formik asidin de kısmen formikdehidrogenaz enziminin etkisiyle CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> meydana getirdiği bildirilmektedir. Ancak IMVIC testleriyle de doğrulanması önerilmektedir. EMB ortamının özelliklerini açıklayan bir kaynaktan ise özellikle klinik materyallerdeki *Candida* sp.'lerinin belirlenmesinde bu ortamın kullanılabilmesi bildirilmektedir (ANON, 1982).

Çizelge 1'e göre MCB ortamında gaz geliştiren örneklerde VRBA'da da üreme saptanmış diğer örneklerde ise her iki ortamda da üreme olmamıştır. Nitekim ortamların bileşimine bakıldığında her ikisinde de «bile salt» (safra tuzu) gibi inhibitör madde içerdiği ve bu madde varlığının, maya için inhibe edici rol oynadığı görüşüne varılmıştır. Ayrıca her ne kadar yoğurtta; koliform varlığı kötü hijyen koşullarının göstergesi ise de, maya yükünün >10 koloni/g. düzeyinde saptanmasının da kısa raf ömrünün göstergesi olduğu bildirilmektedir. Bu değerlendirmeye göre yoğurtta ortam ve ambalajdan kaynaklanan maya kontaminasyonlarına sık rastlandığı, bunlar içinde *Kluyveromyces fragilis* ve *K.lactis*'in önde geldiği, bunların laktozu süratle fermente ederek CO<sub>2</sub> ürettikleri de ifade edilmektedir (ROBINSON, 1981 b, TAMIME ve ROBINSON, 1985). Esasen aynı kaynaklara göre yoğurdun ana kültürlerinden biri olan *S.thermophilus*'un da laktozu ön-

celikle fermente edebilmesi (PORTILLO ve ark., 1988), LB ortamına ekilen yoğurt örneklerindeki gaz oluşumunun kontamine maya ile bu bakterilerin ortak faaliyetleri sonucunda gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bunun benzeri bir değerlendirme ICMSF (1980)'de de yer almaktadır. Bu bilgiler ve deney bulguları değerlendirildiğinde, yoğurdun koliform analizinde özellikle safra tuzu gibi inhibitör maddeleri içeren selektif ortamların tercih edilmesinin daha doğru olabileceği yargısına varılabilmektedir. Nitekim VRBA ortamının koliform açısından hassasiyeti yüksek ve kullanılması gereken selektif ortam olduğu, alternatif olarak Brilliant-Green Laktoz Bile Broth veya Agar ortamının kullanılabilmesi bildirilmektedir (RICHARDSON, 1985).

Çalışmanın bu ön verileri göz önüne alınarak, Çizelge 1'deki mikrobiyolojik açıdan en temiz sonuçları veren (8) no.lu örnek, doğal haliyle ve test organizmaları inokule edilerek ileriki çalışmalar için tekrar selektif koliform ve maya ortamlarına ekilmiş, elde edilen bulgular Çizelge 2 ve 3'de verilmiştir.

Çizelge 2'den de görülebileceği gibi yoğurt doğal haliyle ve test kültürleriyle inokule edildikten sonra, selektif ortamlarına ekildiğinde yine tipik koliform kolonilerine benzer yanıtıcı üremeler vermiş, hatta selektif sıvı ortamlarda bazı kültürlerde gaz gelişmesi gözlenmiştir. Örneklerden sıvı ortamlarda (+) veya (±) olarak değerlendirilen gaz durumu gösteren tüplerden doğrulama için, EMB-Agar ve EC-Broth ortamlarına pasaj yapılmış, ilki için 37°C ve ikincisi için 44,5°C'lerde 48 s'lik inkubasyonlarda üreme olmamıştır. Ayrıca kültürel yöntemle EMB ve EA ortamlarında, tipik metalik parlaklık ve pembe düğme şeklinde üreyen kolonilerden de, EC-broth ortamlarına alındığında 24 ve 48 saatte de üreme olmamıştır. VRBA'da ise *E.coli* inokule edilen örnek dışında hiç üreme olmamıştır.

Mikroskobik incelemelerde ise; yoğurttan «direkt preparat» ve agarlı ve sıvı ortamlardan «Gr - boyama» tekniği ile hazırlanan preparatlardaki durum, yine Çizelge 2 ve 3'de verildiği gibidir.

Çizelge 2. Doğal haldeki ve test organizmalarıyla inokule edilen yoğurduñ selektif koliform ortamlarındaki üreme ve gelişme değerleri.

ÖRNEKLER	EMS YÖNTEMİYLE				KÜLTÜREL YÖNTEMLE (37°C, 48s)				(1) Koloni Morfolojisi	Mikroskopik İnceleme	Genel Değerlen.
	Mc Conkey Broth		Laktoz Broth		EMB Agar (Koloni/g)	Endo Agar (Koloni/g)	VRB Agar (Koloni/g)	EC Broth (44.5°C, 24s)			
	1 ml	0.1 ml	0.01 ml	1 ml							
(G) Doğal Yoğurt	—	—	—	—	—	—	—	—	(2)	(6)	—
(A) Yoğurt + <i>C.lipolitica</i> *	—	±	—	—	—	—	—	—	(3)	(7)	—
(B) " + <i>R.glutinis</i>	±	±	±	±	—	—	—	—	(4)	(7)	—
(C) " + <i>S.cerevisiae</i>	±	±	±	±	—	—	—	—	(2)	(7)	—
(D) " + 68 Ü.F.B.	±	±	±	±	—	—	—	—	(2)	(7)	—
(E) " + <i>C.scottii</i>	±	±	±	±	—	—	—	—	(5)	(7)	—
(F) " + <i>E.coli</i>	±	±	±	±	—	—	—	—	(4)	(8)	±

(\*) İnokulumdaki hiltre süspansiyonlarının sayısal değerleri (koloni/ml olarak Çizelge 3'de verilmiştir.)

(1) Koloni morfolojisi, EMB Agar ortamındaki üremeye göre değerlendirilmiştir.

(2) Yüzeyde ve dipte küçük metalik koloniler

(3) Yüzeyde küçük metalik koloniler

(4) Dipte küçük metalik koloniler

(5) Yüzeyde atıplık koloniler

(6) Gr (+) uzun çubuk ve steptokoklar gözlenmiştir.

(7) Gr (+) uzun çubuk, steptokok ve mayalar gözlenmiştir.

(8) Gr (+) uzun çubuk, steptokok ve Gr (—) kısa çubuklar gözlenmiştir.

(—) Gaz gelişmesi yok, (genel değerlendirilmede koliform kontaminasyonu yok)

(±) Gaz gelişmesi çok zayıf, (Genel değerlendirilmede inokule edilen *E.coli* kültürü önemli ölçüde inübe oldu, gelişmedi).

Çizelge 3. Doğal ve test kültürleriyle inoküle edilen yoğurdun toplam bakteri ve maya ortamlarındaki gelişme ve üreme değerleri.

Ö R N E K L E R	PCA (37°C-48 s) MA (30°C - 72 s)	Örnekten direkt mikroskopik inceleme	Inokulumdaki Hücre süsp. (koloni/ml)
(G) Doğal Yoğurt	77x10 <sup>6</sup>	Uzun çubuk, streptococ	—
(A) Yoğurt + <i>C.lipolitica</i>	35x10 <sup>6</sup>	" " , streptococ, maya	23x10 <sup>8</sup>
(B) * + <i>R.glutinis</i>	32x10 <sup>6</sup>	" " , " "	2x10 <sup>9</sup>
(C) * + <i>S.cerevisiae</i>	74x10 <sup>7</sup>	" " , " "	22x10 <sup>12</sup>
(D) * + 68 Ü.F.B.	53x10 <sup>6</sup>	" " , " "	28x10 <sup>11</sup>
(E) * + <i>C.scottii</i>	1x10 <sup>7</sup>	" " , " "	24x10 <sup>13</sup>
(F) * + <i>E.coli</i>	73x10 <sup>6</sup>	" " , " " kısa çubuk (atipik üreme)	14x10 <sup>10</sup>

Çizelge 4. Yoğurdun mikrobiyolojik kalite kontrollerine ilişkin bazı ülkelerin standart yöntemleri.

Ülkeler ve Federasyonlar	Canlı Bakteri Koloni Sayımı	Maya - Küf	Koliform	Psikrotrofik Bakt.
İngiltere	Nutrient Agar'da (30°C'de 72 s. de inkübasyon)	Malt Agar veya Salt Dextroz Agar'da (25-30°C'de 5 güne kadar)	Mac Conkey Broth'da (30°C'de 72 s.) ve buradan VRBA'ya sürme (30°C-24 s.)	
Amerika	Standart Metod Agar veya Eijkker La İktik Agar	Asitlendirilmiş potato glikoz agar (örnek 10 ml.den az koracaksa, 3 ayrı plağa toplam 10 ml. ekilip, 3 plaktaki toplam üreme değerlendirilir).	VRBA veya Deoxycholate Lactose Agar veya Brilliant Green Laktose Bile Broth'da (30°C, 48 s.)	Standart Metod Agar'da 7°C-10 gün
Çekoslovakya		Malt Agar	Meat Pepton Agar, Laktöz+bromthymol blue	
Batı Almanya		Wort Agar (Koch plak yöntemi)	—	—
IDF	Karbonhidratsız kültür ortamlarında (20 ve 30°C'de 48 s. ortamında (25°C'de 96 s.) inkübasyon	Yeast ekstrakt ve glikoz + oksitetrasiklin içeren agar	Brillant green, laktöz bile broth (30°C, 48 s.)	—

Ancak *E.coli* kültürünün doğrudan hücre suspansiyonundan alınan ekim sonuçlarında ise selektif ortamlardaki tipik bulgulara rağmen, yoğurda özel olarak inokule edildiğinde çok zayıflamış bir üreme ve gaz oluşumu saptanmıştır. Diğer test organizmaları ise, inokulum olarak kullanılmadan önce doğrudan ve hücre suspansiyonlarından MA ortamlarında ekilmiş, 30°C'lik inkubasyonda tipik ve yoğun üremeleri gözlenmiştir. Maya kültürlerinin hücre suspansiyonları EMB, VRBA, EA, MCB ve LB ekilip, 30 ve 37°C'de 48 s inkube edildiklerinde, atipik zayıf bir üreme vermişler veya VRBA ve MCB gibi selektif koliform ortamlarında ise hiç ürememişlerdir.

Çizelge 2 ve 3'deki verilerin topluca değerlendirilmesine göre, yoğurtların bazı selektif ortamlara ekilerek koliform açısından incelenmesinin yanıltıcı olabileceği belirlenmiştir. Değerlendirmenin mutlaka doğrulama testleri ve mikroskopik bulgularla desteklendikten sonra yapılması zorunluğu saptanmıştır. Aksi durumlarda üretici ve tüketiciyi zorlayabilecek yanılgılara sebep olunabileceği, bunun da analiziye olan güveni sarsacağı, tüketimde gereksiz kuşku yaratacağı açıktır.

Esasen dünyadaki çeşitli çalışmaların sonuçlarına göre; yüksek asitliği, diğer bir ifade ile düşük pH'sı nedeniyle yoğurt, en güvenilir ürün olarak belirlenmiştir (ICMSF, 1980).

GOEL ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, yoğurda inokule edilen *E.coli*'nin 1. günden itibaren azalan sayıda olduğu, 4. günde 10 örnekten hiç birinde geri alınmadığı saptanmıştır. Aynı kaynakta Minor ve Marth'ın çalışmalarına göre, inokule edilen 10<sup>2</sup>/g düzeyinde *Staphylococcus aureus*'un saklama koşullarına bağlı kalmadığı 24s'de, 10<sup>5</sup>/g. düzeyindeki *S. aureus*'un ise 2-4 günde canlılığını yitirdiği bildirilmiştir (RICHARDSON, 1985; ICMSF, 1980).

Yoğurda *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae*, ve *Citrobacter freundli* inokule edilerek yapılan çalışmada ise; çeşitli sıcaklıklarda 3 hafta süreyle bekletildiğinde, *E.coli*'nin 15° ve 23°C'de hızla, 7°C'de de daha yavaş olmak üzere azaldığı, diğerlerinin 24s. ile

8 gün içinde tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir (DANONE, 1987).

Yine Hobbs tarafından *Salmonella* sp. gibi patojenler için % 1 civarında laktik asit içeren yoğurdun elverişli bir ortam olmadığı, **Coliform** ve **Staphylococcus** spp. için de aynı şeylerin söylenebileceği saptanmıştır. Aynı kaynakta yoğurtta; ambalaj ve inokulasyon koşullarına bağlı olmak üzere maya ve **Mucor**, **Rhizopus**, **Aspergillus**, **Penicillium** ve **Alternaria** spp.'lerinin kontaminasyonlarına rastlanabileceği ifade edilmektedir (TAMIME ve ROBINSON, 1985).

Yoğurdun patojenik ve saprotif organizmalara karşı antagonistik etkisi olduğu, bu etkinin kullanılan bakteriyel suşlarını özelliklerine göre değiştiği bildirilmektedir (OBERMAN, 1985).

Türk yoğurtlarının damak alışkanlık aramızca uygun olarak Avrupa ve Amerika'da tüketilenlerden daha yüksek asitliğe sahip oluşu, yukarıdaki araştırma sonuçları göz önüne alındığında bir avantaj olarak ifade edilebilir. Nitekim ülkemiz normlarına göre yoğurtta asitlik açısından  $>0,8 - <1,60$  % süt asidi (LA) değerleri önerilirken (ANON, 1989), Avrupa ve Amerika'da bu değer 0,85-0,90 % LA (3,6-4,35 pH) arasında verilmektedir (FIELDS 1979, TAMIME ve ROBINSON, 1985).

Yoğurdun mikrobiyolojik kontrollerinde çeşitli ulusların uyguladıkları yöntem ve kriterlere ilişkin standart ve öneriler Çizelge 4 ve 5'de verilmiştir (TAMIME ve ROBINSON, 1985). Bir diğer kaynakta da yoğurt için aynı kalite kontrol standartları önerilirken, örneklemede 100 gr.'dan az olmayan örnek boyutu ile kapalı ve tüketime sunulan orijinal ambalaj içinde olması gereği bildirilmektedir. Ayrıca analize kadar 0-5°C'de saklanması, bekletme süresinin 24 saati geçmemesi önerilmektedir. Uygulanacak testler olarak da «Direk Mikroskopik Muayene, **Coliform**, **E.coli**, **Psikrotrof** bakteri, maya-küf ve toplam canlı bakterinin» nitel ve nicel analizleri öngörülmektedir (ROBINSON, 1981 a).

Çizelge 4 ve 5 birlikte incelendiğinde yoğurtta laktik bakteri karakterindeki toplam canlı bakteri sayısının  $>10^7$ /ml olmak kaydıyla istendiği, koliform ve maya sayısının ise çok düşük bir limitte kabul edilebileceği görülmekte-



Çizelge 5. Yoğurtta arzu edilen ve kontaminant sayılan mikroorganizmalar için önerilen standartlar (cfu/ml)\*

<i>S. thermophilus</i> (x10 <sup>6</sup> /ml)	> 100	100 - 10	< 10
<i>L. bulgaricus</i> (x10 <sup>6</sup> /ml)	> 100	100 - 10	< 10
Coliform/ml	< 1	1 - 10	> 10
Mayalar/ml	< 10	10 - 100	> 100
Küfler/ml	< 1	1 - 10	> 10

(\*) cfu : Birim koloni formu

dir. Oysaki bizim Gıda Maddeleri Tüzüğüümüzde (Mad. 52) yoğurdun «1 ml.sinde 10'dan çok bakteri bulunmayacaktır.» (ANON, 1988) gibi çok yalınış bir ifade yer almakta, küf ve maya ise 10/ml olarak sınırlandırılmakta, patojen bakteri ve *E.coli*'nin bulunmasına izin verilmemektedir. İlgili standardımızda ise toplam ve laktik bakteri aranmasına ilişkin hiç bir yöntem olmadığı gibi, böyle bir sayısal değer de getirilmemiştir. Ancak yoğurttaki metabolik aktivitenin yoğurt bakterilerinin artan sayısal değerine bağlı olduğu, buna göre toplam canlı yoğurt bakterisinin taze yoğurtta 200 - 1000 milyon/ml. arasında değiştiği bildirilmektedir (OBERMAN, 1985). Maya - küf ise 100 adet/g, koliform bakteri 10 adet/g. olarak sınırlandırılmış. *E.coli* bulunmama koşulu getirilmiştir (ANON, 1989). Ancak Standardımızda koliform ve *E.coli* aranmasına ilişkin yöntem için referans verilen «1331» nolu tereyağ standardında da böyle bir yöntem yer almamakta, hatta koliformdan hiç bahsedilmemektedir. Esasen 1984'deki yoğurt standardında ayrıntısıyla yer alan koliform yöntemi ve toplam bakteri limitine ilişkin açıklamalar, 1989'daki revize edilmiş yoğurt standardında tamamen kaldırılmıştır. Her iki kaynağın da yeniden gözden geçirilerek ıslahı ve doğru, uygulanabilir hale getirilmesi zorunludur.

Uygulamadaki yoğurt kontrollerinde mikrobiyolojik açıdan karşılaşılan diğer bir yanlış da, *Streptococcus* sp. üremesindeki yanlış yorumlardır. Bilindiği üzere yoğurdun ana kültürleri olan *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* «yoğurt mayası» adıyla anılmaktadır. Birbiriyle eşit orandaki karışımından oluşması ve her birinden 10<sup>7</sup>/ml.'den fazla sayıda bulunması istenen bu kültür miksiden,

% 2 oranında süte ilave edilerek, 3 saatlik fermentasyon sonucunda yoğurt elde edilmektedir. Ayrıca bu kültürlerden *S.thermophilus*'ün kanlı ağarda «8-hemolitik reaksiyon» veren termofil karakterli bir laktik bakteri olduğu da bilinmektedir (ROBINSON, 1981 b). Oysaki bazı analizciler yoğurt kontrollerinde «hemolitik *Streptococ* sp.» varlığı nedeniyle ürünü reddedebilmekte veya sağlıklı ürün olarak nitelendirmektedirler. Bu ise hem bilimsel, hem de teknolojik bir hata olup bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Analizcilerin kontrol hizmetlerini yürütürlerken, ürün karakteristiklerini ve teknolojilerini de dikkate alarak değer endirme yapmaları gerekmektedir. Nitekim yoğurt oluşumundaki inkubasyon evresinde bu kültürler arasında simbiyotik, kommensalistik ve kompetatif (rekabet) ilişkisine dayanan bir ortak yaşam söz konusudur. Özetle *S.thermophilus* asitlik değerini artırarak optimal ortam hazırlanırken aynı zamanda formik asit üreterek *L. bulgaricus*'u stimule etmektedir. *L.bulgaricus* ise proteolitik aktivitesi sonucu oluşan bazı amino asitlerle (özellikle valin) *S.thermophilus*'u stimule etmektedir. Böylece her iki türün ortak yaşamı ile, tek-tek üretilmelerine göre daha hızlı bir asit üretimi sağlanmaktadır. Bu sayede ürün kalitesi de artmaktadır. (ICMSF, 1980; OBERMAN, 1985).

Sonuç olarak, yoğurdun mikrobiyolojik kontrollerinde özellikle koliform ortamlarında, yoğurttaki maya kontaminasyonlarına bağlı olmak üzere yanlış gaz ve metalik parlaklık gözlenebildiği saptanmıştır. Bu bakımdan özellikle safra tuzu gibi seçici ve inhibitör maddelerle desteklenmiş ortamlarla çalışılması, ayrıca değerlendirmelerin Gram boyama tekniği ile hazırlanmış mikroskopik incelemelerle des-

teklenerak yapılması önerilebilir. Böylece mikroskobik bulgularla sonucun doğrulanması, üreyen mikrofloranın hücre morfolojisine göre ürünün değerlendirilmesi gerekmektedir. Bütün bunlara göre de ürünün mikrobiyal niteliği tam olarak belirlenebilecek ve kontrol işlemlerinin güvenilirliği sağlanabilecektir. Ayrıca yeterli, doğru tüzük ve standart hüküm ve isimlerinin hazırlanması da, uygulamadaki zorluklar ve çe-

lişkileri de ortadan kaldırmaya hizmet verebilecektir.

Çalışmamızın bulgularına ilişkin varılan yargı ve değerlendirmeleri, yoğurt standardımızla olan çelişkileri TSE Başkanlığına bildirmiş ve kendilerinden konuyla ilgili gerekli tadedilatın yapılacağına ilişkin resmi bildirim almış bulunmaktayız. İlgili Enstitünün olumlu yaklaşım ve işbirliği çağrımıza katılımı çağdaş ve sevindiricidir.

### KAYNAKLAR

- ANON, 1982. The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and Other Laboratory Services, 5 th Ed. Pub. by Oxoid Limited. Hampshire. p. 133 - 135.
- ANON, 1988. Gıda Maddeleriyle İlgili Tüzük ve Yönetmelik. İstanbul Ticaret Odası Yayını: No : 1988 - 26. s. 11 - 13. İstanbul.
- ANON. 1989 Yoğurt Standardı, TS 1330. TSE-10 s., Ankara
- BOOTH, C. 1971. Methods in Microbiology. Vol: 4, p. 36 - 39. Academic Press, London
- DANONE, S.A. 1987. Development of Coliform in naturel yoghurt. *Alimentaria*, 187, 33 - 37.
- FIELDS, M.L. 1979. Fundamentals of Food Microbiology. Avı Pub. Comp. Inc. Westport, Connecticut, p. 204 - 209.
- GROMLEY, T.R. and CORMICAN, K. 1988. Additives in Dairy Products. *Fm. Ed. Res.* 19, (2), 12 - 14.
- HARRIGAN, W.F. and Mc CANCE, M.E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press. London, p. 139-144.
- ICOMSF, 1980. Microbial Ecology of foods Vol. II. Food Commodities. Academic Press Inc. New York. p. 513 - 517.
- KROGER, M. 1989. Food Misinformation in Major Reference Works : Setting the record straight on yogurt *Food Technology*, (6), 63 - 67.
- KROGER, M., KURMANN, J.A., RASIC, J.L. 1989. Fermented milks-Past, present and future. *Food Technology*. (1), 92 - 99.
- OBERMAN, H. 1985. Fermented Milks, In : WOOD B.J.B. (Ed.) *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1. Chapter 4. Elsevier Appl. Science Publishers. Essex. England pp. 167 - 195.
- PORTILLO, M.C.P., AMOROSO, M.J., and OLLIVER, G., 1988. Culture Medium for the differential enumeration of lactic acid bacteria in yoghurt. *Milchwissenschaft* 43, (8), 490-491.
- RICHARDSON, G.H. 1985. (Ed.), Standart Methods for the Examination of Dairy Products 15 th Ed. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C., p. 72. 173 - 187.
- ROBINSON, R.K., 1981 a. (Ed.). Dairy Microbiology. Vol. II. The Microbiology of Milk Products. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London. p. 245 - 295. 311 - 315.
- ROBINSON, R.K. 1981 b. (Ed.). Dairy Microbiology. Vol. I. The Microbiology of Milk, Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London, p. 40 - 42.
- SULLIVAN, J.J. and MULLER, L.L. 1979. Microbiological Criteria for Dairy Products-Progress and Problems- The Australian J. of Dairy Technology. 12, 140 - 145.
- TAMIME, A.Y. and ROBINSON, R.K., 1985. *Yoghurt Science and Technology* Pergamon Press. Ltd, Oxford. 431 p.
- ÜLGIRAY, D. 1986. Türkiye'de Süt Sanayinin Geliştirilmesiyle İlgili Politikalar. DPT İktisadi Planlama Başkanlığı, Yayın ve Temsil Dairesi Matbaası, Ankara, 47 s.