

18. Patojen İndirgeme Yöntemleri

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü
GDM310 Gıda Mikrobiyolojisi II Ders notu 18.

18.01. Genel Bilgiler

Fermente gıdalar dışındaki gıdalarda mikroorganizma bulunması istenmez. Ancak gıda çeşidine göre, hammadde, yardımcı madde, işleme yöntemi, pazarlama şekli vb. nedenlere bağlı olarak belirli miktarlarda mikroorganizma bulunması kabul edilir. Sebze konserveleri, UHT süt, ton balığı konservesi gibi gıdalar, üretim teknolojisine bağlı olarak sterildirler. Salça ve meyve suları tam steril değildir, bir miktar sporlu bakteri canlı kalmış olabilir ancak asidik yapı normal raf ömrü içinde bu sporların çimlenerek ürünü bozmasına genel olarak izin vermez ancak ısı işlem sırasında canlı kalmış asidofilik bakteri sporları çimlenerek ürünü bozabilir. Bal, pekmez, kuru bakliyat vb. gıdalar steril değildir ancak bu gibi gıdalarda da patojen bakteri gelişmesi beklenmez.

Zeytinyağı ve diğer bitkisel sıvı yağlar, üretim teknolojisine bağlı olarak sterildir. Daha sonra ambalajdan gelen ya da dolum sırasında mikroorganizma bulaşsa dahi su olmadığı için mikroorganizma gelişmesi olamaz.

Gıda teknolojisindeki uygulamaların önemli bir bölümü mikroorganizma ve özellikle patojenlerin indirgenmesine yöneliktir.

Kuşkusuz, hammaddeden başlayarak tüm girdilerde patojenlerin bulunmaması, işletmede yeterli temizlik ve dezenfeksiyon yapılması, tüm çalışanların sağlık kontrolünden geçirilmesi, doğru üretim teknikleri (GMP) ve HACCP vb. önleme sistemlerinin uygulanması, gerek toplam mikroorganizma sayısında ama asıl olarak patojenlerin sayısında indirgeme sağlar.

Amaç patojenlerin sayısında mutlak bir indirgemedir. *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Bacillus cereus* patojen olmakla birlikte belirli gıdalarda düşük sayılarda bulunmalarına izin verilir. *Listeria monocytogenes* konusunda ABD ve AB yasaları arasında fark vardır. Patojenlere belirli gıdalarda izin verilmesinin nedeni, düşük patojeniteleri nedeni ile izin verilen bu sayılarda hastalıklara yol açmayacağı ve o gıdaya yönelik standart işleme teknolojisi ile tümüyle yok edilemeyeceğidir. Örneğin en son olarak 29 Aralık 2011 tarihinde yayımlanmış olan Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Baharat, bitki ve/veya bunların karışımları (toz, macun formları, karışımları vb.) gıdalarda 10^2 - 10^3 KOB/g *Bacillus cereus* bulunmasına izin vermektedir çünkü baharat hasat edildikten sonra sadece öğütülür. Kimyasal katkı, ısı işlem, filtrasyon, yüksek basınç gibi ısı olmayan işlemler uygulanamaz, sadece ışınlama yapılabilir.

Benzer şekilde Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü unlu mamul (makarna, her türlü börek, lahmacun, pide, pizza, mantı vb.) gıdalarda da 10^2 - 10^3 KOB/g *Bacillus cereus* bulunmasına izin vermektedir çünkü bu gıdaların pişirme şekli, bu bakteri sporlarını tümüyle yok edemez.

Genel olarak mikroorganizma ve özel olarak patojen indirgeme yöntemleri 5 grup altında toplanabilir. Bunlar; ısı işlem, koruyucu madde ilavesi, ışınlama, filtrasyon ve ısı olmayan yeni işlemler (yüksek basınç, vurgulu elektrik alanı vb)'dir. Bunlardan filtrasyon dışında kalanlar mikroorganizmayı öldürmeye/ gelişmesini durdurmaya/ gelişmesini yavaşlatmaya yöneliktir. Filtrasyon ise sadece fiziksel bir ayırmadır. Isıl işlem, yüksek basınç gibi ısı olmayan işlemler ve koruyucu madde ilavesinde doz/ süre ilişkisi önemli iken, ışınlamada sadece soğrulan doz önemlidir.

Soğutma, dondurma, kurutma, O/R potansiyelinin değiştirilmesi (vakum), kontrollü (modifiye) atmosferde depolama uygulamaları indirgeme değildir. Bu uygulamalarda mikroorganizma gelişmesi uygulanan doza göre yavaşlar/ tümüyle durur. Bir diğer deyiş ile dondurma gelişmeyi tümünden durdurur ancak soğutma gelişmeyi sadece yavaşlatır. Soğutma dozu ne kadar yüksek ise (ne kadar düşük derece uygulanıyorsa) gelişme o denli yavaşlar. Benzer şekilde kurutmada ne denli etkili bir uygulama yapılarak su aktivitesi ne denli düşürülürse gelişmede o denli yavaşlama sağlanır.

Bu uygulamalarda süre faktörünün önemine dikkat çekilmektedir. Kırmızıbiber kurutmasında süre uzun olduğu zaman aflatoksin birikimi olmaktadır. Benzer aflatoksin sorunu, fındık ve incir kurutmasında da vardır.

Soğutma, dondurma, kurutma, O/R potansiyelinin değiştirilmesi (vakum), kontrollü (modifiye) atmosferde depolama gibi uygulamalarda genel mikroorganizma ve dolayısı ile patojen varlığında bir miktar azalma olabilir ancak, kurutma ve dondurmanın bugün için bilinen en etkili mikroorganizma koruma (kültür koleksiyonu) yöntemi olduğu unutulmamalıdır.

18.02. Isıl İşlem

Bilinen en etkin mikroorganizma indirgeme yöntemidir. Kalıntı bırakmaz. Gıda çeşidine göre duyuşal özelliklerde değişiklik olabilir. Devamında besin maddelerinde bir miktar kayıp olur.

Maksimum gelişme sıcaklığı üzerindeki sıcaklıklarda yeni oluşan hücre sayısı, ölenlerden daha fazla olduğu için popülasyonda genel bir azalma gözlenir. Ölüm nedeni, proteinlerin geri dönüşümsüz olarak bozulmaya başlamasıdır. Kimyasal maddelerden farklı olarak, hiçbir istisnası olmamak üzere¹ sıcaklık yükseldikçe öldürücü etki artar.

Nemli ve kuru sıcaklık olarak uygulanır. Nemli sıcak daha etkilidir. 1 kg sebze (asıl olarak bezelye) konservesi için otoklavda 121 °C'ta (121,1 °C= 250 °F) 15 dakikalık ısıl işlem uygulaması tam bir sterilizasyon sağlar. UHT süt uygulamasında 130-135 °C'ta 5-10 sn ısıl işlem uygulanır.

Pastörize süt ve meyve suyuna yaklaşık aynı sıcaklık ve süre ısıl işlem uygulanmakla birlikte meyve suyu bir anlamda sterilize ama süt sadece pastörize olur ve pastörize süt buzdolabında korunsa da bir süre sonra bozulur. Bu farklılık sadece pH'tan kaynaklanır. Meyve suyunun düşük pH'sı benzer ısıl işlem uygulanmasına karşın ısıl işlemin etkinliğini artırır.

Her materyalin/ malzemenin ısı iletim katsayısı farklıdır. Örneğin; hava, suya göre daha düşük bir ısı iletimine sahiptir ve dolayısı ile otoklavda (nemli ortam) 121 °C'ta 15 dakika olan uygulamanın karşılığı etüvde (kuru hava sterilizatörü; Pastör fırını) 170 °C'ta 2 saat olarak verilir. Devamında, asitlikten bağımsız olarak otoklavda sterilize edilecek materyalin ısı iletim katsayısı da önemlidir. Yağ ve şeker moleküllerinin mikroorganizmayı bir yangın battaniyesi gibi koruyabildiği de unutulmamalıdır.

Genel olarak ısıl işleme direnç sıralaması; bakteri sporları> maya ve küf sporları> tüm vejetatif hücreler şeklindedir.

Karkaslarda yüzeydeki *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 gibi patojenlerin indirgenmesi için karkas yüzeyi kısa süreli olarak buhara maruz bırakılır. Bu sistemin Avrupa ve ABD'de endüstriyel uygulamaları bulunmaktadır.

¹ Bakınız; kimyasal/ koruyucu madde uygulaması alkol örneği

Standart mikrodalga fırın, sadece ısı işlemidir. Endüstriyel uygulamalarda farklı dalga boyu ve frekanslarda mikrodalga fırının radyasyon etkisi tartışma konusudur, elde edilen araştırma bulguları arasında kayda değer çelişkiler vardır.

Kuru hava uygulamalarında (örneğin fırında pişirmede) fırın sıcaklığı fırında pişirilen gıdanın soğuk noktasının değil, sadece fırındaki havanın sıcaklığını gösterir.

18.03. Kimyasal/ Koruyucu Madde Uygulaması

Basit olarak, turşu, tuzla korunan et ve balıklar ile pekmez gibi geleneksel gıdalarda bir anlamda kimyasal koruyucu kullanılmaktadır. Kekik yağı, sarımsak, sirke ve sumak gibi doğal bitkisel ürünler de bir anlamda kimyasal koruyucu maddelerdir. Kuşkusuz, bu uygulamalar için tüketici tarafından bir itiraz olmamakla beraber, klor, sorbat ve benzoat vb. katkılara tüketici endişe ile bakmakta ve genel olarak bu gibi katkıların kullanılmış olduğu gıdalar tüketici tarafından benimsenmemektedir.

Gıda üretim teknolojilerinde ısı işlem her zaman yeterli olmamaktadır. *Clostridium botulinum* tehlikesi sebze konservelerinde etkin ısı işlem ile ancak salam ve sosislerde nitrit uygulaması ile bu tehlike ortadan kaldırılmıştır. 2011 yılı bahar aylarında başta Almanya olmak üzere Avrupa'da görülen *E. coli* O104:H4 salgınında özellikle Almanların salata vb. gıdalarda klor kullanmaması etkili olmuştur.

Mikroorganizmaların gelişmesini etkileyen birçok kimyasal madde vardır. Farklı antibiyotikler farklı şekillerde mikroorganizmaları etkiler. Benzer şekilde çeşitli organik asitler, nisin gibi GRAS (Generally recognized as safe; Genel olarak güvenli olduğu kabul edilen) ve mikroorganizma kaynaklı organik maddeler gıda sanayisinde güvenle kullanılmaktadır.

Kimyasal maddeler içinde klor, bugün en yaygın kimyasaldır. Hidrojen peroksit, benzoat ve sorbat da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Gerek havuz suyunda klor uygulaması, gerek gıdalarda koruyucu kullanılmasında konsantrasyon, tüketici/ kullanıcı tarafından her zaman endişe ile karşılanmıştır.

Gıda sanayisi ve çevresel uygulamalarda (havanın mikroorganizmalardan arındırılması vb. uygulamalar) ozon gazı kullanımı son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır. Doğada şimşekler ile oluşan ozon gazı, basitçe yüksek voltajlı elektrik uygulaması ile arabaların çakmak çıkışından dahi elde edilebilmektedir. O₃ bileşiminde olan ozon gazı kararsız bir moleküldür ve kararlı O₂ oksijen molekülü haline dönüşmek için bir O⁻ atomunu ortama salar ve bu O⁻ atomu oksitleyici özelliكتedir. Buna bağlı olarak ortamdaki molekülleri oksitler ve bir anlamda mikroorganizmaları yakarak yok eder. Ancak, affiniteye bağlı olarak hava ya da sulu ortamlarda bu O⁻ atomunun oksitleyeceği organik ya da inorganik materyalde sıralama farklıdır. Bir diğer örnekle, sulu ortamlarda oksitleme sırası öncelikle Ca, Mg gibi kimyasallarıdır. Buna göre sert sularda ozon ile mikroorganizma indirgemesi başarılı olmamaktadır. Ozonun en büyük özelliği depolanamamasıdır. Ozon jeneratöründen elde edilen ozon gazı, hava ya da sulu ortamlara çözündürülerek mikrobiyel inaktivasyonda kullanılır. Oda sıcaklığında çok yaklaşık 30 dakika içinde kararsız O₃ molekülü kararlı O₂ molekülü haline gelir, bir diğer deyiş ile kalıntı bırakmaz.

Ozon dışındaki tüm kimyasal madde uygulamalarında kalıntı sorunu vardır. Klor, H₂O₂, nitrit, sorbat vb. uygulamaların tümünde tüketici bu kimyasalları vücuduna almaktadır.

Klasik eczacılığın sihirli cümlesi şöyledir: "ilaç ile zehri ayıran dozdur". Buna göre *Clostridium botulinum* tehlikesine karşı nitrit içeren salam ve sosislerin ne denli tüketildiği ADI (Acceptable Daily Intake; günlük kabul edilebilir tüketim) ya da başka bir yaklaşım ile NOAEL (No Observed Adverse Effect Level; Gözlenen Olumsuz Etki Yok) yaklaşımları ile belirlenir.

Kimyasallar düşük derişimlerde bakteristatik, yüksek derişimlerde bakterisit etki yapar. Buna göre kullanılan kimyasal maddenin/ koruyucunun derişimi arttıkça daha fazla etkili bir indirgeme beklenir. Alkol², bu konuda tek istisnadır. Alkolün en yüksek mikrobiyel inaktivasyon derişimi %70-76 (v/v)'dur ve saf alkol bu derişimden daha az etkili olur. Bunun nedeni, saf alkolün hücre duvarını bir anlamda yakması ve sitoplazma içine girerek asıl etkisini gösterememesi olarak açıklanmaktadır. Tüm bitkiler ve hayvanlarda olduğu gibi her mikroorganizma bir anlamda derisini onarma yeteneğine sahiptir. Mikroorganizma, alkol etkisi geçtikten sonra hücre duvarını onarır ve standart yaşamına devam eder.

18.04. Gıda Işınlama

UV, X ve gama ışınları asıl olarak, mikroorganizma DNA'sının ışın ile kırılması ile etkilidir. DNA tek ya da çift iplikçikten kırılabilir ya da tek/ çift iplikçikte birden fazla moleküler bağlantıdan kırılabilir. Bazı kırılmalar/ kopmalar mikroorganizmanın yaşam fonksiyonları açısından önemsiz iken bazıları önemlidir. Buna bağlı olarak ne kadar yüksek doz ışınlama uygulanırsa mikrobiyel inaktivasyon o denli etkili olur.

Gıda ışınlamaya, tüketici tarafından kansere neden olduğu gerekçesi ile sıcak bakılmaz ve genel olarak kimyasal koruyucu kullanılmasından daha fazla endişe verici olarak algılanır.

Işınlama uygulamaları, iyonlaştırıcı radyasyon ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak 2 ana grupta toplanır. İyonlaştırıcı radyasyon X ve gama ışınları, iyonlaştırıcı olmayan radyasyon UV ışınlarıdır. İyonlaştırıcı olan ve olmayan radyasyon ışın kaynağının yaydığı enerji ve buna bağlı olarak penetrasyon gücü ile ilgilidir. İyonlaştırıcı radyasyon X ve gama ışınlarıdır. Bunların yaydığı enerji 0-34 eV'tan daha yüksektir ve penetrasyon etkisi vardır. X ışınlarının dalga boyu 10 nm (100 °A)'tan daha kısadır. Gama ışınlarının dalga boyu 0,1 nm (1 °A)'tan kısadır.

X ışınlarına tipik örnek röntgen çektilmesidir.

Penetrasyon gücü, delme olarak da tanımlanabilir. Penetrasyon gücüne sahip olan ışınlar, kurşun gibi materyalle karşılaşmadıkları sürede katı/ sıvı/ gaz (hava) ortamında yollarına devam ederler. UV gibi penetrasyon gücü olmayan ışınlar sadece ilerleyebildikleri kadar ilerler.

UV uygulamasında UV lambadan çıkan ışınlar, basit fizik kuralları/ aydınlanma formülü gereği uzaklığın karesi ile ters orantılı olarak etkili olurlar. UV ışınları, basit olarak bir camdan dahi geçemez, sadece havanın ve yüzeylerin dezenfeksiyonu için kullanılabilir. Devamında UV lamba olan bir boru içinden geçirilen sıvılarda mikrobiyel indirgeme borudan geçirilen sıvının partikül derişimine doğrudan bağlıdır. Partikül yoğunluğu yüksek (kirli/ bulanık sular ya da örneğin şeftali suyu gibi yoğun partikül içeren sıvılar, süt vb.) gıdalarda UV uygulamasında yeterli etkinlik sağlanması zordur. Bu gibi örneklerde başarı, ancak, düşük bir debide geçiş ve/ veya boru sisteminde çok sayıda UV lamba kullanılması ile sağlanabilir.

UV spektrumu dalga boyuna göre UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290 nm) ve UV-C (290-200 nm) olmak üzere 3 gruba ayrılır. Mikroorganizma indirgemedede kullanılan UV lambaların dalga boyu 254 nm (2537 °A)'dir. MUG reaksiyonları ise UV-A (366 nm) ile incelenir.

² Aksi belirtilmedikçe alkol denince etil alkol, tuz denildiğinde NaCl, şeker denildiğinde sakkaroz (çay şekeri), pepton denildiğinde pankreatin enzimi ile hidrolize edilmiş et peptonu ifade edilmektedir.

Gıda ışınlama denildiğinde asıl olarak ⁶⁰Co ve ¹³⁷Cs ışın kaynaklarından elde edilen ışınların kullanıldığı gama ışınlaması anlaşılır. Gıdada serbest radikallerin oluşması tartışma konusudur. Baharat gibi kuru gıdalar için idealdir.

ABD'de *E. coli* O157:H7 tehlikesine karşı bazı eyaletlerde hamburger ışınlamasına izin verilmiştir. Et ürünlerinin dondurulmuş şekilde ışınlanması gerekir, bu koşulda kanser oluşturduğundan endişe edilen serbest radikaller oluşmaz. Süt ürünleri genellikle ışınlanmaz.

Düşük dozda (~ 3 kGy) ışınlanmış et ve ürünlerinde sterilizasyon değil sadece mikrobiyel indirgemeye bağlı olarak raf ömründe uzama sağlanır. Buna bağlı olarak soğuk pastörizasyon olarak da adlandırılır. Baharattaki sporlu bakterilerin tümüyle inaktivasyonu 10-11 kGy'de sağlanmaktadır. AIDS gibi bağışıklık hastalarına verilen gıdalar için çok daha yüksek dozlar uygulanır ancak bu gıdalarda organoleptik özellikler ciddi şekilde kaybolur.

Gıda ışınlama sadece mikroorganizma inaktivasyonu için değil, düşük dozlarda böceklenme kontrolü, filizlenme önlenmesi ve olgunlaştırmanın geciktirilmesi için de kullanılır.

18.05. Filtrasyon

Mikroorganizmaların fiziksel olarak ayırımıdır. Mikroorganizmaların geçemeyeceği kadar küçük gözenekleri bulunan membran filtrelerden geçirilen sıvı ya da gazlar steril bir şekilde filtrenin öbür tarafına geçer. Kullanılan membran filtrelerin gözenek çapı 0,45 ya da 0,20 µm'dir. Gıda sanayisinde içme suyu dolusunda kullanılır.

18.06. Yeni ve Isıl olmayan Diğer Uygulamalar

Yüksek basınç, yüksek basınçlı karbondioksit, yüksek gerilim darbeleri elektrik alanı, salınımlı manyetik alan, ultrason, darbeleri ışık, darbeleri X ışını, yüksek voltaj ark deşarjı gibi yeni mikrobiyel inaktivasyon sistemleri üzerinde çalışılmaktadır. Bunlardan bu gün için yüksek basınç (yüksek hidrostatik basınç) uygulamaları endüstriyel olarak kullanılmaya başlamıştır.

Yüksek basıncın mikroorganizmalar üzerindeki inaktivasyon etkisi 1914 yılında kanıtlanmış olmakla birlikte endüstriyel uygulamanın başlaması oldukça yenidir. Basit olarak gıda üzerine 100-1000 MPa³ basınç uygulanır. Uygulama süresi, materyal ve indirgenmesi hedeflenen mikroorganizma türü ve sayısına göre değişir. Sıcaklık 0-100 °C arasında olabilir. Baharat gibi kuru gıdalara değil, et ve salam gibi et ürünleri, su ürünleri, meyve ve meyve suyu, jöleler, reçel ve marmelatlar gibi su içeriği yüksek gıdalara uygulanabilmektedir. Bu teknolojinin en büyük özelliği gıdanın duyu özelliklerinde ve besin içeriğinde kayıp olmamasıdır. Sterilizasyon değil, bir anlamda gıdanın raf ömrünü uzatmaya yöneliktir.

Yararlanılan ve Okunması Önerilen Kaynaklar

Abbas SMN. 2002. Baharat Mikroflorası Üzerine Işınlamanın Etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

Anon 2010. Gıda Işınlama. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu yayını, Ankara, 179 s

Anon 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. 29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete.

³ MPa, Mega Pascal basınç ifade eder. 1 MPa, çok yaklaşık olarak 10 kg/cm² basınç demektir.

Baysal T, İçier F, Baysal AH. 2011. Güncel Elektriksel Isıtma Yöntemleri. Sidas Medya Ltd, İzmir.

Çakır İ, Doğan HB. 2000. Biyolojik Stabilité. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Davidson PM. 1997. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.

Erol İ. 2007. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara, 392 s

Evrendilek GA, Mehmetođlu AÇ, Coşansu S, Erkmen O. 2010. Yeni Yöntemlerle Gıdaların Korunması. Gıda Mikrobiyolojisi, Ed Osman Erkmen, Efil Yayınevi, Ankara

Farkas J. 1997. Physical Methods for Food Preservation. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.

Gibbs P. 2002. Characteristics of Spore-forming Bacteria. Foodborne Pathogens; Hazard, Risk Analysis and Control. Eds CW Blacburn, PJ McClure. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England, 521 s.

Halkman AK. 2005. Sterilizasyon. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. Kadir Halkman. S 57-72. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.

Montville TJ, Winkowski K. 1997. Biological Based Preservation Systems and Probiotic Bacteria. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.

Şahbaz F, Cemerođlu B, Acar J. 1996. Gıda Mühendisliğinde Sterilizasyon. Düzeltilmiş 2. Baskı. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları Ders Notları No: 37. 134 s.