

## Utjecaj veličine populacije Gram-negativnih psihotrofa na njihovo preživljavanje pri pasterizaciji\*

Dr. Irena ROGELJ, Bojana BEGOVIČ, dipl. inž., Biotehniška fakulteta, VTOZD za živinorejo, Inštitut za mlekarstvo, Ljubljana

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper  
Prispjelo: 1. 6. 1990.

UDK:579.22

### Sažetak

Na tri izolata vrste *Pseudomonas fluorescens* izolirana iz pasteriziranog mlijeka proučavali smo utjecaj veličine populacije na kinetiku odumiranja za trajanje pasterizacije mlijeka (63° C/30 min). Bez obzira na veličinu populacije i pojedine izolate, do najveće redukcije broja stanica došlo je u vrijeme dogrijavanja uzroka do 63° C (4 min.). Ako je početna populacija bila < 10<sup>8</sup> BK/ml ustanovili smo sto postotnu letalnost. Nakon 48 sati skladištenja (7° C) i u tim uzorcima pasteriziranog mlijeka zapazili smo prisustvo živih stanica. Riječe natuknice: *Pseudomonas fluorescens*, pasterizacija, redukcija populacije.

### 1. Uvod

Hlađenje mlijeka odmah nakon mužnje te skladištenje mlijeka i mliječnih proizvoda do niskih temperatura sprečava njihovo kvarenje, povezano s rastom mezofilnih bakterija. Pritom postaju potencijalni uzročnici kvarenja psihotropne bakterije, budući da su temperature hlađenja selektivni faktor, koji kočenjem rasta mezofilne mikroflore pospješuje njihov razvoj. Sve je raširenije mišljenje da su uvođenjem hlađenja psihotrofi postali najznačajnija skupina bakterija prisutna u mlijeku, budući da proizvode ekstracelularne enzime, sposobne za razgradnju pojedinih sastojaka mlijeka, kao što su bjelančevine i masti.

Psihotropne bakterije su u prirodi vrlo raširene i raznovrsne. U mlijeku i mliječnim proizvodima prevladavaju Gram-negativni, nesporotvorni, katalaza-pozitivni štapići najčešće roda *Pseudomonas*. Zaključci nekadašnjih istraživanja su navodili da psihotrofi ne preživljuju laboratorijsku ili komercijalnu pasterizaciju (Witter, 1961; Thomas i Druce, 1969). Kasnija istraživanja su pokazala da postoje dvije skupine psihotrofa, koje preživljuju zagrijavanje do temperature pasterizacije, i to sporotvorne i nesporotvorne Gram-pozitivne bakterije. Washam i sur. (1977) izolirani su iz pasteriziranog, hlađenog mlijeka termostabilne bakterije i označili ih kao termorezistentne psihotrofe. Termorezistentne psihotrofe opisuju i brojni drugi autori (Mikolajcik i Simon, 1978; Coghill, 1982; Sharma i sur. 1984). Od termorezistentnih su u svježem mlijeku najčešće prisutne vrste iz rodova *Micrococcus* i *Bacillus*.

Dugo se smatralo da u pasteriziranom mlijeku psihotropne Gram-negativne bakterije nisu prisutne, već da je njihovo prisustvo znak postpasterizacijske infekcije. Kasnija istraživanja su opovrgla takva mišljenja, budući da

\* Referat održan na 9. jugoslavenskom međunarodnom simpoziju »Suvremena proizvodnja i prerada mlijeka«, Portorož, 1990.

Naslov originala na slovenskom jeziku: »Vpliv velikosti populacije Gr-negativnih psihotrofov na njihovo preživljenje pri pasterizaciji.«

Prijevod sa slovenskog na hrvatski jezik: Matej Markeš, dipl. inž.

su različiti autori utvrdili da i neke Gram-negativne bakterije preživljuju pasterizaciju. Veckbach i Langlois (1977) su iz svježeg mlijeka izolirali psihrotrofe iz roda *Pseudomonas* i zaključili da izolati vrste *P. fluorescens* preživljuju termičke postupke različitog trajanja (72° C/15 sek, 79° C/15 sek, 88° C/10 sek i 95° C/<5 sek), ako je početni broj bio je dovoljno velik (> 10<sup>6</sup> stanica koje tvore kolonije/ml, odnosno broj kolonija BK/ml). Te je rezultate potvrdio Coghill (1982), koji je između ostalih termorezistentnih psihrotrofa izolirao fluorescentne, kao i nefluorescentne vrste roda *Pseudomonas*.

Prisustvo gram-negativnih psihrotrofnih bakterija u pasteriziranom mlijeku, koje nije posljedica rekontaminacije nakon pasterizacije, spominju i neki drugi autori (Janzen i sur. 1982; Crome i sur. 1989). Očito je da njihovo preživljavanje u toku pasterizacije ne zavisi samo o vrsti prisutnih bakterija nego i o veličini populacije prije pasterizacije. Utjecaj veličine populacije Gram-negativnih psihrotrofa prije pasterizacije na njihovo preživljavanje za vrijeme termičke obrade je malo istraživano. U našim istraživanjima proučavali smo tri izolata *P. fluorescens* koja smo izolirali iz pasteriziranog mlijeka.

## 2. Materijal i metode rada

### 2.1. Testni mikroorganizmi

Psihrotrofne Gram-negativne bakterije koje smo upotrijebili pri istraživanju izolirali smo iz pasteriziranog mlijeka te ih identificirali po API 20 NE sistemu (firme API-System, France).

### 2.2. Priprema, pasterizacija inokuliranih uzoraka i bakteriološke analize

Testne bakterije smo razmnožili u hranjivom bujonu (Difcobaocto Nutrient broth – pH 6,8) pri 26°C. Kulture, stare 18 sati, cijepili smo u različitim koncentracijama u sterilno obrano mlijeko. Uzorke inokuliranog mlijeka smo razdijelili u sterilne epruvete (po 100 ml) i laboratorijski pasterizirali u vodenoj kupelji (63°C). Prvu epruvetu smo uzeli iz vodene kupelji kad su uzorci dosegli temperaturu 63°C, a svaku narednu u razmacima do 5 minuta u toku 40 minuta. Epruvete s uzorcima smo ohladili u ledenoj vodi, zatim ustanovljivali prisustvo stanica koje tvore kolonije (BK/ml) u ml uzorka na TGYMA podlozi nakon inkubacije 48±3 sata na 31±1°C (Standard Methods for Examination of Dairy Products, 1978). Jednu epruvetu s uzorkom smo nakon 30 minuta pasterizacije ohladili, čuvali dva dana pri temperaturi 7°C i određivali prisustvo BK/ml.

### 2.3. Izračunavanje kinetičkih parametara preživljavanja populacije mikroorganizama pri pasterizaciji

Na temelju teorijskih krivulja odumiranja populacije, koje smo izračunali pomoću eksperimentalnih vrijednosti, odredili smo decimalno redukcijsko vrijeme (DT) (Lewis, 1986), zatim smo još izračunali postotak maksimalno ostvarene letalnosti pri pasterizaciji (63° C/30 min) ( $\lambda_{max}\%$ ) i najvjerojatnije efektivno vrijeme potrebno za uništenje čitave populacije (MPET<sub>tot</sub> = most probably effective time) (Pokoren, 1990) po formulama

$$D_T = \Delta_x (\Delta_y = 1) \quad (1)$$

$$\lambda_{\max} \% = \frac{n}{\log N_0} \cdot 100\%$$

$$n = \text{broj decimalnih redukcija} \quad (2)$$

$$n = \frac{\text{vrijeme termizacije}}{D_T}$$

$$\text{MPET}_{\text{tot}} = \frac{100\%}{\lambda\% / \text{vremensku jedinicu}} \quad (3)$$

### 3. Rezultati s diskusijom

Utjecaj veličine populacije na kinetiku odumiranja pri pasterizaciji proučavali smo na tri psihrotrofne, Gram-negativne, katalaza i oksidaza pozitivne bakterije, koje smo izolirali iz pasteriziranog mlijeka. Identifikacija s API NE sistemima je pokazala da pripadaju vrsti *Pseudomonas fluorescens*. Sve su bile proteolitički i lipolitički aktivne, a međusobno su se razlikovale brzinom hidrolize želatine i arginina. Izolate smo označili kao *P. fluorescens* 6, *P. fluorescens* 26 i *P. fluorescens* 33.

Ustanovili smo da sva tri izolata postizu najveću redukciju broja kolonija u vremenu koje je potrebno da uzorci postignu temperaturu 63° C (4 min.), bez obzira na veličinu populacije. Brzina odumiranja svih izolata bila je obrnuto proporcionalna s početnom veličinom populacije.

**Tabela 1. Parametri kinetike odumiranja izolata *P. fluorescens* 6, 26 i 33 za pasterizacije (63° C/30 min)**

**Table 1. Destruction kinetic data for isolates of *P. fluorescens* 6, 26 and 33 during pasteurization (63° C/30 min)**

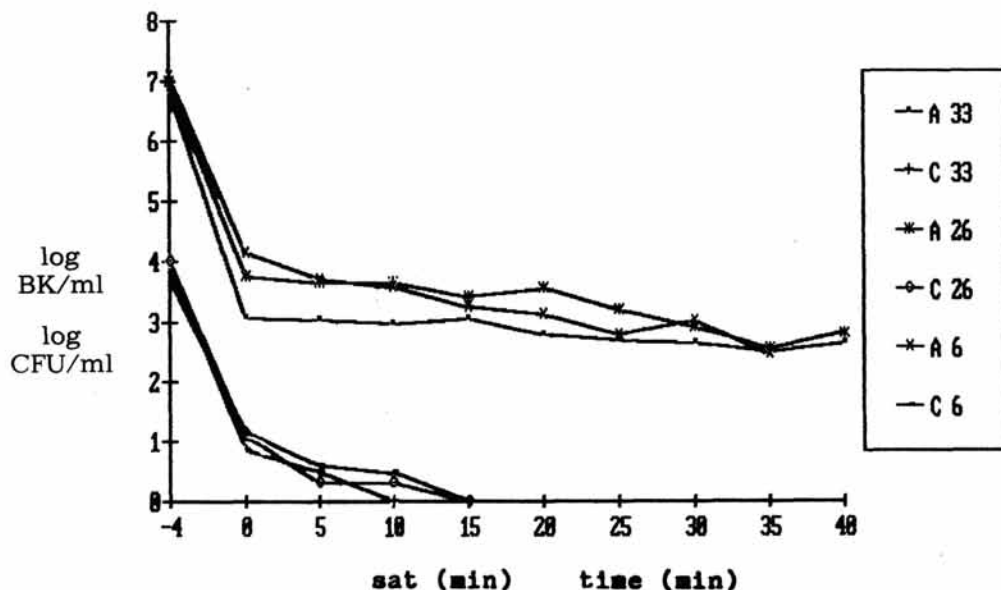
Izolat Isolate	A	r	$D_T$ (min)	n	$\lambda$ max (%)	$\text{MPET}_{\text{tot}}$ (min)	B
6	$1,30 \times 10^7$	-0,96	23,26	1,29	31,08	96,51	+
	$1,1 \times 10^5$	-0,95	12,20	2,46	95,35	31,46	+
	$5,3 \times 10^3$	-0,98	14,08	2,13	185,22	16,20	+
26	$9,6 \times 10^6$	-0,93	33,56	0,89	23,67	126,74	+
	$1,0 \times 10^5$	-0,98	22,52	1,33	66,83	44,89	+
	$1,03 \times 10^4$	-0,91	15,38	1,95	180,55	16,62	+
33	$7,1 \times 10^6$	-0,92	58,49	0,44	14,33	209,32	+
	$7,10 \times 10^4$	-0,85	30,30	0,99	66,89	44,85	+
	$9,4 \times 10^3$	-0,95	16,66	1,80	214,28	14,00	+

A — početna veličina populacije u 1 ml mlijeka  
Initial size of population in 1 ml of milk

n — broj decimalnih redukcija u 30 min  
number of decimal reductions in 30 min

$r$  = koeficijent korelacije među eksperimentalnom i teorijskom krivuljom preživljavanja  
 coefficient of correlation for experimental and theoretical line of microbial destruction

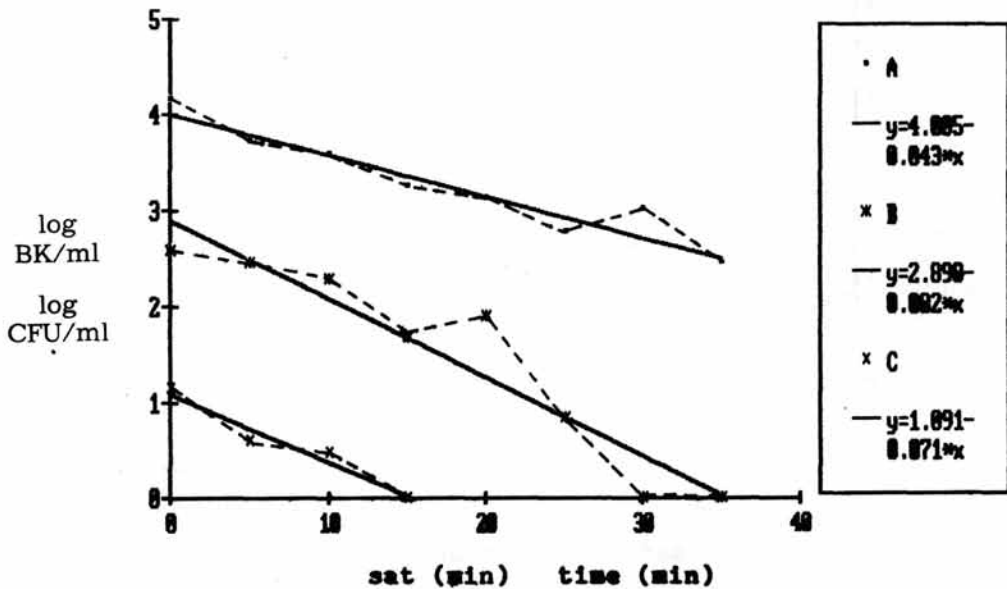
$B$  = prisutnost BK/ml u pasteuriziranim uzorcima skladištenim 2 dana ( $7^{\circ}\text{C}$ )  
 CFU/ml of pasteurized milk after 2 days storage at  $7^{\circ}\text{C}$



Slika 1. Tok odumiranja populacije izolata *P. fluorescens* 6,26 i 33 u toku pasteurizacije pri različitim početnim veličinama populacija: A ~  $10^7$  BK/ml, C ~  $10^4$  BK/ml

Figure 1. Destruction kinetics of isolates *P. fluorescens* 6, 26 and 33 during pasteurization, at different initial size of population: A ~  $10^7$  CFU/ml, C ~  $10^4$  CFU/ml

Proračun kinetičkih parametara odumiranja (Tabela 1) je pokazao da je pasteurizacija bila uspješna uz početnu veličinu populacije  $<10^4$  BK/ml, što se slaže s rezultatima koje navode Macaulay i sur. (Yan i sur. 1983).  $\text{MPET}_{\text{tot}}$  je bio u populaciji  $<10^4$  BK/ml od 14—16 min., a u populacijama  $10^5$  BK/ml između 32—45 min. Ponešto neočekivan je bio rezultat da su u uzorcima s relativno malim početnim veličinama populacije ( $<10^4$  BK/ml) u pasteuriziranim uzorcima skladištenim 2 dana ( $7^{\circ}\text{C}$ ) bile prisutne žive stanice. Populacije dakle nisu potpuno uništene, ali su bile tako male da u 1 ml nismo utvrdili prisustvo BK. Moguće je također da su neke stanice bile samo privremeno inaktivirane, ali da su u toku dvodnevnog skladištenja ( $7^{\circ}\text{C}$ ) postale ponovno aktivne.

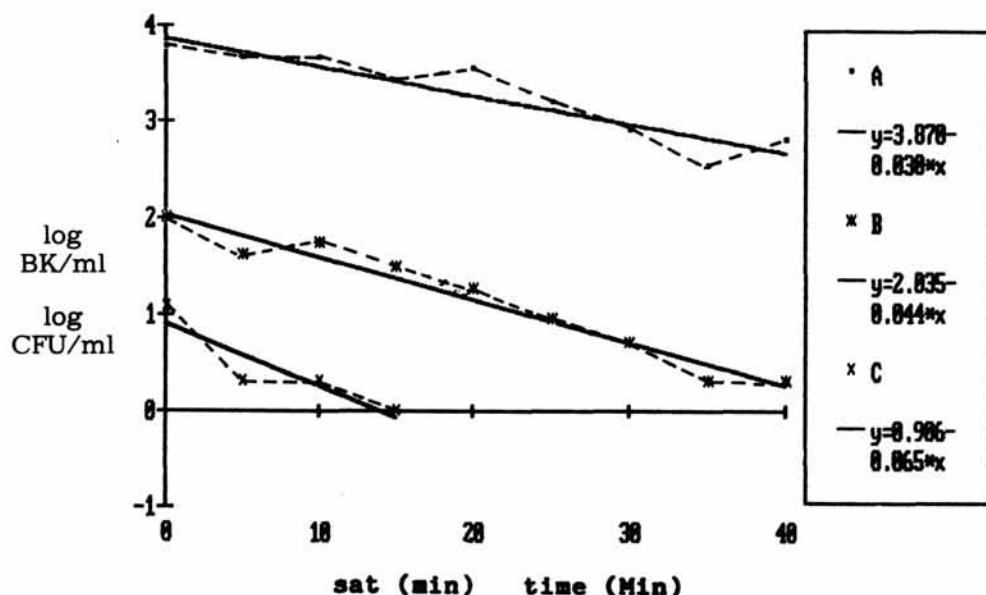


Slika 2. Eksperimentalne i teoretske krivulje odumiranja izolata *P. fluorescens* 6, za različite početne veličine populacija: A —  $1,3 \times 10^7$  BK/ml, B —  $1,1 \times 10^5$  BK/ml, C —  $5,3 \times 10^3$  BK/ml

Figure 2. Experimental and theoretical line for the destruction of isolate *P. fluorescens* 6 at different initial population size: A —  $1,3 \times 10^7$  CFU/ml, B —  $1,1 \times 10^5$  CFU/ml, C —  $5,3 \times 10^3$  CFU/ml

Prisustvo prishrotrofnih Gram-negativnih bakterija u pasteriziranom mlijeku ustanovio je i Cromie sa suradnicima (1989). Pojava je bila slična našoj budući da je i u mlijeku koje su oni analizirali početna populacija u svježem mlijeku mala, a rekontaminacija isključena zbog sterilnog načina opremanja.

Rezultati su pokazali da učinak pasterizacije govori vrlo malo o kvaliteti pasteriziranog mlijeka. Prisustvo Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija u pasteriziranom mlijeku nije uvijek posljedica rekontaminacije nakon pasterizacije.



Slika 3. Eksperimentalne i teoretske krivulje odumiranja izolata *P. fluorescens* 26 za različite početne veličine populacija: A —  $9,6 \times 10^6$  BK/ml, B —  $1,0 \times 10^5$  BK/ml, C —  $1,0 \times 10^4$  BK/ml

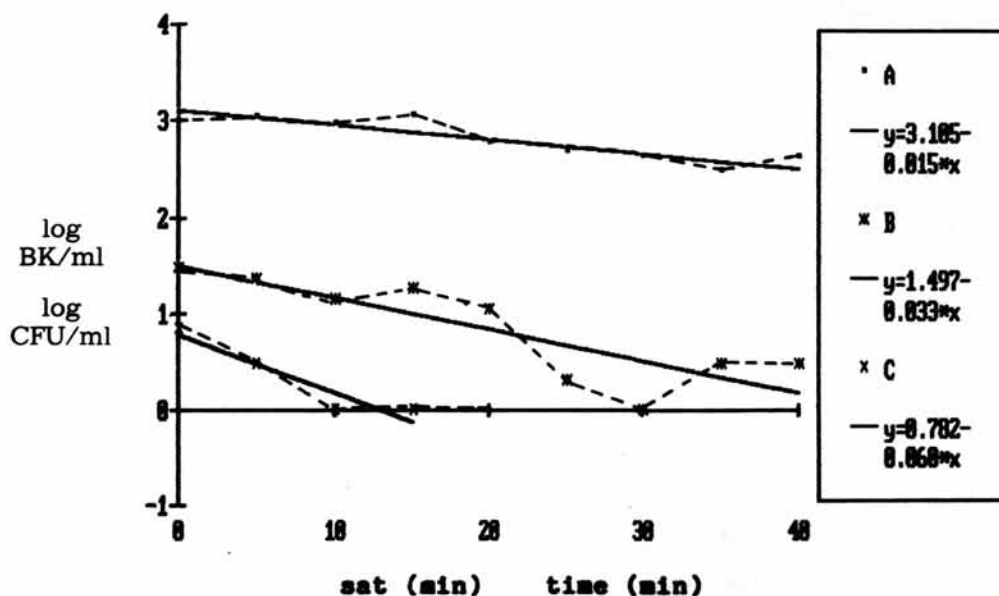
Figure 3. Experimental and theoretical line for destruction of isolate *P. fluorescens* 26 at different initial population size: A —  $9,6 \times 10^6$  CFU/ml, B —  $1,0 \times 10^5$  CFU/ml, C —  $1,0 \times 10^4$  CFU/ml

### THE INFLUENCE OF POPULATION SIZE OF GRAM-NEGATIVE PSYCHROTROPHS ON SURVIVAL DURING PASTEURIZATION

#### Summary

The influence of initial population size on destruction kinetics during milk pasteurization ( $63^\circ\text{C}/30\text{ min}$ ) was studied relative to three *Pseudomonas fluorescens* isolates from pasteurized milk. The greatest reduction of viable cells was observed during first stage of milk pasteurization to reaching final temperature ( $63^\circ\text{C}/4\text{ min}$ ) for all isolates and every starting population size. When initial population size attained  $< 10^4$  CFU/ml lethality determined immediately after pasteurization was 100%. Despite this fact viable cells were observed in all samples of pasteurized milk stored 48 hours at  $7^\circ\text{C}$ .

Additional index words: *Pseudomonas fluorescens*, pasteurization, population reduction



Slika 4. Eksperimentalne i teoretske krivulje odumiranja izolata *P. fluorescens* 33 za različite veličine populacije: A —  $7,1 \times 10^6$  BK/ml, B —  $7,1 \times 10^4$  BK/ml, C —  $9,4 \times 10^2$  BK/ml

Figure 4. Experimental and theoretical line for the destruction of isolate *P. fluorescens* 33 at different initial population size: A —  $7,1 \times 10^6$  CFU/ml, B —  $7,1 \times 10^4$  CFU/ml, C —  $9,4 \times 10^2$ /ml

#### 4. Literatura

- COGHILL, D. (1982): The Australian Journal of Dairy Technology, s. 147—148.
- CROMIE, S. J., D. SCHMIDT, T. W. DOMMETT, The Australian Journal of Dairy Technology, 44 (1989) 1, s. 25—30.
- JANZEN, J. J., J. R. BISHOP, A. B. BODINE, C. A. CALDWELL. Journal of Dairy Science, 65 (1982) 12, s. 2233—2236
- LEWIS, M. J. : Modern Dairy Technology. Ed. R. K. Robinson, Elsevier Applied Science Publishers, London in New York, 1986, s. 1—51.
- MIKOLAJCIK, E. M., N. T. SIMON: Journal of Food Protection, 41 (1978) 2, s. 93—95.
- POKOREN, J.: Poročilo iz raziskovalne seje EEC »FLAIR« Team -a, Brussels, 21. 3. 1990.
- SHARMA, J. K., R. K. MALIK, D. K. MATHUR: Journal of the Society of Dairy Technology, 37 (1984), 3, s. 96—98.
- Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Washington, Ed. Mart, E. H. American Public Health Association, 1978, s. 77—95, s. 107—115.
- THOMAS, S. B., R. G. DRUCE, Dairy Industries, 34 (1969) 6, s. 351—355.
- WASHAM, C. J., H. C. OLSON, E. R. VEDAMETHU. Journal of Food Protection, 40 (1977) 2, s. 101—108.
- WECKBACH, L. S., B. E. LANGLOIS: Journal of Food Protection, 40 (1977) 12, s. 857—862.
- WITTER, L. D.: Journal of Dairy Science, 44 (1961), s. 983—1015.