

**Farklı Ortam Koşullarının Zygosaccharomyces rouxii'nin  
Sonikasyonla İnaktivasyonuna Etkisi**

Sinem Kırmılı

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Kasım 2008

**Effect of Different Treatment Conditions on the  
Inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* by Sonication**

Sinem Kırmılı

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biology

November 2008

# Farklı Ortam Koşullarının Zygosaccharomyces rouxii'nin Sonikasyonla İnaktivasyonuna Etkisi

Sinem Kırmılı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Kasım 2008

## ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sinem KIRIMLI'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Farklı Ortam Koşullarının *Zygosaccharomyces rouxii*'nin Sonikasyonla İnaktivasyonuna Etkisi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

### **Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

**Üye** : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

**Üye** : Doç. Dr. Semra İLHAN

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞCEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun.....tarih ve..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

*Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229 (*Z. rouxii*) üzerine Power Ultrasound (20 kHz) ve sıcaklığın etkisi (40, 45, 50 ve 55 santigrat derece) pH 4 ve pH 7'de, su aktiviteleri 0.94 ve 0.99 olan iki ayrı ortamda çalışılmıştır. Sonikasyon uygulaması yüzde 40 (49.6 mikrometre, 0.3 W/ml) ve yüzde 80 (99.2 mikrometre, 0.73 W/ml) olmak üzere iki farklı uygulama şiddetinde yapılmıştır. Sonikasyon uygulamaları sırasında canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Sonikasyon uygulamalarında, *Z. rouxii* hücrelerinin inaktivasyonu 1. dereceden reaksiyon kinetiğine uyum göstermiştir.

Sonikasyonsuz uygulamalardan elde edilen ortalama D değeri 65.1 dak. iken, yüzde 40 ve yüzde 80 sonikasyon yapılanlarda sırasıyla 6.44 ve 3.59 dak. olmuştur. Sonikasyon düzeyinin yüzde 40'dan yüzde 80'e çıkarılması *Z. rouxii*'nin D değerini azaltmakla birlikte, bu fark önemli olmamıştır (p değeri 0.05'den büyüktür). 40-55 santigrat derecelerde yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri, ortalama 40.29 ile 0.94 dak. arasında değişmiştir. Sonikasyonun farklı pH ve sıcaklık düzeylerinde yapılması D değerlerini önemli ölçüde etkilemiştir (p değeri 0.000'dır). Ancak su aktivitesinin, sonikasyonla *Z. rouxii* inaktivasyonu üzerine etkisi önemli olmamıştır (p değeri 0.05'den büyüktür). Denenen tüm sıcaklık düzeylerinde, ultrasoundun (yüzde 80 amplitüddeki uygulamalarda) etkisi ile D değerleri yaklaşık 13'te 1 ve 30'da 1 oranında azalmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Z. rouxii*, İnaktivasyon kinetiği, Ultrasound, Su aktivitesi, D değeri.

## SUMMARY

The combined effect of Power Ultrasound (20 kHz) with temperature (40, 45, 50 and 55 centigrade degrees) on the survival of *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229 (*Z. rouxii*) suspended in citrate buffer was studied at two different pH (4 and 7) and water activities (0.94 and 0.99) levels. Ultrasound was applied at two acoustic wave amplitude such as percentage 40 (49.6 micrometer, 0.3 W/ml) and percentage 80 (99.2 micrometer, 0.73 W/ml). During sonication, the numbers of surviving *Z. rouxii* cells were determined. Inactivation of the *Z. rouxii* cells by ultrasonic treatments was showed first-order behavior. While mean D value obtained from non-sonicated treatments was 65.1 min., mean D values obtained from sonicated treatments at percentage 40 and percentage 80 wave amplitude levels were 6.44 and 3.59 min. respectively. When acoustic wave amplitude was increased from percentage 40 to percentage 80, mean D value of *Z. rouxii* was reduced, but it was not statistically different (p value is higher than, 0.05). At 40-55 centigrade degrees, D values obtained from ultrasonic treatments ranged from 40.29 to 0.94 min. D values have varied significantly (p value is 0.000) when sonicated liquid had different pH and temperature levels. But, inactivation effect of sonication at different water activity level on *Z. rouxii* was not significantly different (p value is higher than, 0.05). At the all treatment temperature levels, D values were reduced by the simultaneous effect of ultrasound (at percentage 80 wave amplitude level), by the ratio of approximately from one divided thirteen to one divided thirty.

**Key words:** *Z. rouxii*, Inactivation kinetic, Ultrasound, Water activity, D value.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, değerli yardımları ile beni yönlendiren, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen büyük sevgi ve saygı duyduğum değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU ve yine çalışmam süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımındaki katkıları için Dr. Sevil PLATİN'e, yüksek lisans öğrencisi Başak KARAGÜL'e, diğer tez bitirme öğrenci arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışmalarımında bilgilerini benimle paylaşan arkadaşım Senem ÇİL'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benim yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden hiç bir zaman esirgemeyen sevgili aileme, yakınlarıma teşekkürü bir borç biliyorum.

Bu çalışma ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYONU tarafından desteklenen, 200419023 nolu "Ultrasound ve Sıcaklığın Birlikte, Gıdalarda Problem Yaratan Önemli Mikroorganizmalar Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi ve Betimleyici Matematiksel Modellerin Oluşturulması" konulu araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
SUMMARY .....	vi
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
Gıda Korumada Kullanılan Termal Olmayan Yöntemler .....	5
1.1. Ultrasound .....	8
1.1.1. Ultrasound'un gıda sanayide kullanım alanları .....	10
1.1.2. Ultrasound'un diğer yöntemlerle kombine edilerek kullanımı .....	11
1.1.3. Ultrasound uygulamalarını etkileyen faktörler.....	12
1.1.4. Mikrobiyal inaktivasyon mekanizması .....	17
1.2. Ultrasound ve Diğer Yöntemlerin Kombine Edilerek Kullanılması İle Yapılan Çalışmalar .....	19
1.3. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> ' nin ( <i>Z. rouxii</i> ) Genel Özellikleri .....	21
2. MATERYAL VE METOD .....	22
2.1. Materyal .....	22
2.1.1. Besiyerleri .....	22
2.1.2. Çözeltiler .....	23
2.2. Metod .....	25
2.2.1. Test mikroorganizması .....	25
2.2.2. Stok kültürün hazırlanması .....	25
2.2.3. Stok kültürdeki <i>Z. rouxii</i> sayısının belirlenmesi .....	26



## İÇİNDEKİLER (devam)

2.2.4. Sonikasyon çalışmasında kullanılan yöntem .....	26
2.2.5. İnaktivasyon denemelerinde kullanılan ultrasonic processor'ün özellikleri .....	29
2.2.6. İstatistiksel metodlar .....	31
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>33</b>
3.1. 40 °C'de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar .....	33
3.2. 45 °C'de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar .....	47
3.3. 50 °C'de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar .....	61
3.4. 55 °C'de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar .....	71
3.5. <i>Z. rouxii</i> 'nin İnaktivasyonunda D Değerleri Üzerine ; Sonikasyon Şiddeti, pH, $a_w$ ve Sıcaklığın Etkisinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi ....	75
3.5.1. Sonikasyonun D değerleri üzerine etkisi .....	75
3.5.2. Su aktivitesinin D değerleri üzerine etkisi .....	76
3.5.3. Ortam pH'sının D değerleri üzerine etkisi .....	78
3.5.4. Sıcaklığın D değerleri üzerine etkisi .....	79
3.6. <i>Z. rouxii</i> 'nin İnaktivasyonunda D Değerleri Üzerine İnteraksiyonların Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	80
3.6.1. D değerleri üzerine sonikasyon ve pH'nın birlikte etkisi .....	81
3.6.2. D değerleri üzerine sonikasyon ve sıcaklığın birlikte etkisi ...	81
3.6.3. D değerleri üzerine pH ve su aktivitesinin birlikte etkisi .....	82
<b>4. SONUÇ .....</b>	<b>84</b>
<b>5. KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>86</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Additive, sinerjetik ve antagonistik etkilerin şematize olarak gösterimi .....	12
1.2. Kavitasyon olayının hücre duvarında meydana getirdiği yarıklar .....	18
1.3. Kavitasyon oluşum mekanizması .....	19
1.4. Ultrasound uygulaması sırasında meydana gelen kavitasyon olayı ve mikrobaloncuklar .....	19
1.5. <i>Z. rouxii</i> 'nin morfolojik görüntüsü .....	21
2.1. Sonikasyon işleminin gerçekleştirilmiş olduğu düzenek .....	30
2.2. Sonikasyon işleminde kullanılan 13mm'lik solid prob .....	30
2.3. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid probun uç kısmının yakından görünüşü .....	31
3.1. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	36
3.2. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 .....	36
3.3. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	37
3.4. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 .....	37
3.5. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	38
3.6. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 .....	38
3.7. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	39
3.8. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 .....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- 3.9. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 40
- 3.10. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 40
- 3.11. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği1 ..... 41
- 3.12. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 41
- 3.13. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 42
- 3.14. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 42
- 3.15. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği1 ..... 43
- 3.16. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 43
- 3.17. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 44
- 3.18. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 44
- 3.19. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 45
- 3.20. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 45
- 3.21. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 46

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- 3.22. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 46
- 3.23. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 47
- 3.24. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 47
- 3.25. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 50
- 3.26. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 50
- 3.27. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 51
- 3.28. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 51
- 3.29. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 52
- 3.30. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 52
- 3.31. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 53
- 3.32. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 53
- 3.33. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 54
- 3.34. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 54

### ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- 3.35. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 55
- 3.36. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 55
- 3.37. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 56
- 3.38. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 56
- 3.39. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 57
- 3.40. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 57
- 3.41. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 58
- 3.42. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 58
- 3.43. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 59
- 3.44. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 59
- 3.45. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 60
- 3.46. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1..... 60
- 3.47. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 61

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- 3.48. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 62
- 3.49. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 63
- 3.50. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 63
- 3.51. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 64
- 3.52. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 64
- 3.53. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1..... 65
- 3.54. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 65
- 3.55. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 66
- 3.56. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 66
- 3.57. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 67
- 3.58. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2..... 67
- 3.59. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 68
- 3.60. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2 ..... 68
- 3.61. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 ..... 69

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.62. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 .....	69
3.63. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	70
3.64. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2 .....	70
3.65. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	72
3.66. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	73
3.67. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	73
3.68. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	74
3.69. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	74
3.70. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1 .....	75
3.71. D değerleri üzerine sonikasyon ve pH'ın birlikte etkisi .....	81
3.72. D değerleri üzerine sonikasyon ve sıcaklığın birlikte etkisi .....	82
3.73. D değerleri üzerine pH ve su aktivitesinin birlikte etkisi .....	83

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Değişik tuz konsantrasyonlarının su aktivitesi değerlerine örnekler .....	3
2.1. Çalışmada kullanılan sıcaklık, pH, su aktivitesi ve amplitüd değerleri .....	27
3.1. 40 °C, 0.99 ve 0.94 a <sub>w</sub> , pH 4 ve 7'de sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri ve ortalamaları .....	35
3.2. 45 °C, 0.99 ve 0.94 a <sub>w</sub> , pH 4 ve 7'de, sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri ve ortalamaları .....	49
3.3. 50 °C, 0.99 a <sub>w</sub> , pH 4 ve 0.94 a <sub>w</sub> pH 4 ve 7'de sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri ve ortalamaları .....	62
3.4. 55 °C, pH 4 ve 7, 0.94 a <sub>w</sub> 'de sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri .....	72
3.5. Farklı sonikasyon düzeyinde yapılan ve sonikasyon yapılmayan çalışmalardan elde edilen ortalama D değerleri .....	76
3.6. Farklı sonikasyon şiddetlerinin birbirleriyle karşılaştırılması ve D'ye bağlı değişkenlik .....	76
3.7. Yapılan tüm a <sub>w</sub> çalışmalarının ortalama D değerleri .....	77
3.8. Aynı sıcaklık, pH düzeyleri eşleşmeyen uygulamalar çıkarıldıktan sonra hesaplanan ortalama D değerleri (55 °C hariç) .....	77
3.9. İki farklı a <sub>w</sub> değerinde aynı sıcaklık ve pH'da yapılan uygulamalar eşleştirilerek yapılan istatistiksel değerlendirme .....	78
3.10. pH 4 ve 7'de yapılan tüm çalışmalardan elde edilen ortalama D değerleri ..	78
3.11. Farklı pH'larda yapılan uygulamaların D değeri üzerine etkisini gösteren istatistiksel değerlendirme .....	79
3.12. Farklı sıcaklıklarda yapılan tüm çalışmalardan elde edilen ortalama D değerleri .....	79



**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

3.13. D değerleri üzerine sonikasyon, pH, $a_w$ ve sıcaklığın kombine etkisine ait varyans analizi .....	80
--	----

## 1. GİRİŞ

Tüketiciler taze, güvenilir, besleyici değeri yüksek olan gıdaları kullanmayı tercih etmektedirler (Piyasena et al., 2003). Gıdalar toplandıkları andan itibaren her ne kadar sağlık kurallarına uygun şartlar altında muhafaza edilseler de çevreden gelen istenmeyen faktörler aracılığıyla veya depolama sürecinde, fiziksel, kimyasal, enzimatik veya mikrobiyolojik reaksiyonlar nedeniyle tazelik ve kalitelerini kaybetmeye başlarlar. Gıdaların bozulmasından sorumlu olan başlıca etmenler, mikroorganizma ve enzimlerdir. Bunlar arasında günümüzde en tehlike oluşturabilecek faktörlerden birisi gıdalarda çürümelere ve insanlarda gıda zehirlenmelerine yol açan mikroorganizmalardır. Bunun için gıda üreticileri tarafından mikroorganizmalar besin maddelerinden uzaklaştırılmak veya yok edilmek istenilmektedir (Manas and Pagan, 2005).

Mikroorganizmaların gıdalarda gelişmesi; gıdanın sahip olduğu karakteristik özelliklere, gıdada bulunan mikroorganizmalar arası ilişkilere ve gıdanın içinde bulunduğu çevresel şartlara bağlı olarak değişebilmektedir. Gıdanın sahip olduğu kendine özgü özellikler “iç faktörler”, çevre koşulları ise “dış faktörler” olarak nitelendirilmektedir.

İç faktörler:

- Su aktivitesi ( $a_w$ )
- Besin içeriği
- pH

Dış faktörler:

- Sıcaklık olarak dikkate alınmaktadır.

Gıdaların korunmasında, işlem ve depolama sırasında besin değerini korumak amaçlanır. Gıda bileşenlerinin bozulması, kötü tat, koku oluşumu, renk bozulması ve yapısal özelliklerde meydana gelen değişimler sonucu gıdaların kalitesinde değişiklikler görülür. Bu olaylar gıdanın raf ömrünü etkilemektedir.

Bütün gıdalar su ihtiva eder ve gıdalardaki biyolojik, kimyasal değişikliklerden kaynaklanan bozulmaların sebebinin yüksek miktarda su ihtiva etmesi olduğu genel bir kanıdır (Temiz, 1997).

Gıdaların içerdiği su, birçok bileşen için çözücü görevi görür. Kurutma, tuzlama, şuruplama gibi yöntemler, çözücünün fiziksel özelliklerini değiştirirler. Gıdalardan suyun ayrılması ve gıdaya çözünen madde eklenmesi aynı gibi görünse de gıda üzerindeki etkileri farklıdır. Örneğin, gıdanın içerdiği çözelti, mikrobiyolojik gelişmenin kontrol edilebildiği noktaya kadar konsantrasyona edildiğinde, istenmeyen fiziksel ve kimyasal değişiklikler ortaya çıkabilir. Konsantrasyonun çok büyük miktarda artırılması, enzimatik ve enzimatik olmayan değişimleri önlemek için gerekebilir; bu takdirde de gıdanın tadında ve görünüşünde değişimler gözlenir.

Gıdaların korunması amacıyla göz önünde tutulması gereken su ile ilişkili kriterler; su içeriği, çözünen konsantrasyonu, osmotik basınç, denge bağılı nemi ve su aktivitesidir. Su aktivitesi; bir ortamdaki mikrobiyal gelişim ve aktiviteleri için gerekli olan kullanılabilir su demektir. Örnek olarak *Zygosaccharomyces rouxii*'nin gelişebildiği minimum  $a_w$  değeri 0.62 dir (Hui et al., 1994; ICMSF, 1996; Jay, 1996) Gerek gıdanın işlenmesi gerekse depolanması sırasında su aktivitesinin kontrolü bu nedenle önemlidir.

Gıdalarda mikrobiyolojik gelişmeler ve kimyasal reaksiyonlar bağımsız (serbest) suyun varlığında oluşmaktadır. Yine suyun sebep olduğu fiziksel değişimler gıdada bulunan bağımsız su ile ilişkilidir (Mesela %13 rutubet ihtiva eden buğday kuru hissini verdiği halde, %8 nemli fındık, elastik ve yaş hissini verir). Aynı toplam rutubete sahip gıdada yağ (suyu tutmayan), karbonhidrat ve protein (suyu tutan) gibi bileşenlerin değişmesi su aktivitesini önemli ölçüde değiştirir. Bu nedenle su aktivitesi, yağ ve karbonhidrat miktarı değişken ürünler için toplam suya nazaran daha objektif bir ölçüdür (Temiz, 1997).

Su aktivitesi; ürünün raf ömrünü, kokusunu, rengini, lezzetini ve yapısını etkiler. Bu nedenle su aktivitesinin ölçülmesi, mikrobiyolojik riskleri minimize etmenin ve gıda kalitesini artırmanın en önemli çözümüdür.

Aşağıdaki Çizelge 1.1'de değişik tuz konsantrasyonlarının su aktivitesi değerlerine ait örnekler verilmiştir.

Çizelge 1.1. Değişik tuz konsantrasyonlarının su aktivitesi değerlerine örnekler (Jay dan, 1996)

Tuz Konsantrasyonu (% w/v)	Su Aktivitesi ( $a_w$ )
0.9	0.995
1.7	0.99
3.5	0.98
7.0	0.96
10.0	0.94
16.0	0.90
22.0	0.86

Mikoorganizmalar kendi enzimatik faaliyetlerini, dolayısıyla yaşamsal faaliyetlerini normal olarak sürdürebilmek için buldukları ortam pH'sının da kendi isteklerine uygun olmasını istemektedirler. Ayrıca mikroorganizmanın faaliyeti sonucu ortam pH'sı değişmektedir, mikroorganizmalar bu değişime tolerans gösteremediklerinde faaliyetleri yavaşlamakta ya da durmaktadır (Öner, 1992).

Gıdaların pH'sını düşüren ve organik asitler meydana getiren gıda üretim yöntemleri, gıdalarda mikrobik gelişimin önlenerek gıda güvenliğinin sağlanması açısından yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, bazı patojen mikroorganizmaların düşük pH'ya toleransları, düşük pH'lı gıdalarda canlı kalışları ve çok düşük pH'ın öldürücü etkisine dirençleri ortaya konmuştur. Bu nedenle düşük pH uygulamaları gıdalarda tazeliği ve güvenilirliği olumsuz yönde etkilemektedir. Aynı durum düşük  $a_w$  uygulamaları içinde geçerlidir. Dolayısıyla bu teknolojiler tek başlarına gıda güvenliğini garanti edememektedirler. Bu yüzden, farklı gıdalardaki riskleri ve onların gelişimlerini geriletmek veya kontrol altında tutmak için gereken çevre koşullarının mümkün olduğu kadar doğru belirlenmesi, mikroorganizmaların pH tepkilerini anlamak ve önceden bilebilmek açısından önemlidir (Presser, et al., 1997).

Mikroorganizmaların büyümelerine etki yapan en önemli faktörlerden bir diğeri de sıcaklıktır. Sıcaklık yaşayan organizmaları iki karşıt yönde etkileyebilmektedir. Sıcaklık arttıkça hücredeki kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar artmakta ve

hızlanmaktadır. Fakat belli bir sıcaklığın üzerinde proteinler, nükleik asitler ve diğer hücresel bileşikler geri dönüşsüz bir hasara uğrayabilmektedirler. Bu sebepten her mikroorganizma için gelişmenin görülmeyeceği bir minimum sıcaklık, gelişmenin çok hızlı olduğu optimum sıcaklık ve gelişmenin mümkün olmadığı bir maksimum sıcaklık bulunmaktadır (Madigan et al., 1997).

Tüm bu faktörler ele alındığı zaman gıdalarda gelişebilecek mikroorganizmaların yok edilmesi ya da en azından hasara uğratılması gereksinimi gündeme gelmiştir. Yaygın olarak gıda ve içecek sanayide kullanılan ve çoğu insan tarafından bilinen en azından duyulan yöntemlerden bazıları ısı ile sağlanan pastörizasyon, sterilizasyon ve genelde içeceklere uygulanan fermantasyondur. Pastörizasyon; 100 °C 'nin altındaki sıcaklıklarda vejetatif hücreleri öldürmeye yarayan bir süreçtir, ancak bu süreçte sporlar canlılıklarını korur. Sterilizasyonda ise; gıda doldurulmuş ve kapatılmış kaplarda 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda belli bir süre tutularak ısıtılır, aynı süre ile soğutulur. Bu yöntemlerle, ısıya maruz kalan gıdalarda ısıya bağlı olarak enzimatik değişimler, bozulmalar meydana gelmekte bu da gıdanın tat, koku, besinsel değeri gibi özelliklerinde istenmeyen değişikliklerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu durum tüketicilerde artan, taze ve güvenilir gıda tüketim isteği doğrultusunda son 20 yıldır yeni gıda koruma yöntemleri gelişimini hızlandırmıştır (Manas and Pagan, 2005).

Mikroorganizmaları inaktive (aktivitesini engelleme) etmede gereken ısı miktarını en aza indirerek mikrobiyal inaktivasyon sağlayan yeni koruma teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler daha az enerji gerektirmekte, dolayısıyla uygulama daha ekonomik ve çevre dostu olmaktadır. Termal işlem vejetatif mikroorganizma ve sporları öldürebilmektedir, ancak etkinliği uygulamanın ısı ve süresine bağlıdır. Ne yazık ki uygulamanın boyutu, süresi ve işlem sıcaklığı, besin kaybı, istenmeyen koku oluşumu ve gıdanın fonksiyonel özelliklerinin kaybına yol açmaktadır. Sağlık açısından güvenli gıda basit olarak, "insan tüketimine uygun, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik tehlikeleri kontrol altında tutulan, besin değerini kaybetmemiş gıda" olarak tanımlanabilir. Gıdalarda raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan bir yöntem katkı maddesi ilavesidir. Katkı maddelerinin kullanımı, güvenli gıda üretimini sağlamak amacıyla endüstride kullanılan yöntemlerden birisidir. Ancak gıda katkı maddeleri ile ilgili endişeler ve bu maddelerin kullanımının güvenlik nedeniyle sınırlandırılmış

olması farklı tekniklerin kullanılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır (Javier and Gustavo, 2003).

Termal (ısısal) işleme alternatif olabilecek, termal olmayan (nontermal) alternatiflerden bazıları; pulse-electric field, pulse-light, mikrofiltrasyon, yüksek basınç ve ultrasound olarak belirtilmiştir. Özellikle son yıllarda tüketicinin daha güvenli ve kaliteli ürün talebi, mikroorganizma ve enzimleri inaktive edecek termal olmayan gıda koruma tekniklerine ilgiyi oldukça arttırmıştır. Termal olmayan işleme sırasında, gıdanın ısısı termal işlemede kullanılan ısıdan daha düşük tutulmaktadır. Böylece gıda kalitesinde minimal bir azalma beklenmektedir. Bununla beraber termal olmayan teknolojilerin sadece kalite iyileştirmesi sağlamakla kalmayıp, yerine geçecekleri tekniklerin; bozulmalara sebep olan mikroorganizmaları inaktive ederek, güvenli gıda ömrü sağlamalı, organoleptik ve besinsel özellikleri değiştirmemeli, artık ve tortu bırakmamalı, ucuz ve uygulaması kolay olmalı, yasal düzenlemelere uygun özellikler taşımaları gibi diğer özelliklerini de taşıyor olması gerekmektedir (Mertens and Knorr 1992; Barbosa Canovas et al.1998).

Ultrasound uygulamasının diğer bir deyişle sonikasyonun tek başına kullanımı gıdadaki mikroorganizmayı öldürmesinde çok etkili olmadığı, sonikasyonun sıcaklık, basınç vd. faktörlerle beraber uygulanmasıyla daha iyi bir etki yarattığı, ilerisi için umut vaat edici bir gelişme olduğu düşünülmektedir (Crosby, 1982).

### **Gıda Korumada Kullanılan Termal Olmayan Yöntemler**

Pek çok nontermal koruma tekniği bakterilerin, mayaların ve mantarların vejetatif hücrelerinin inaktivasyonunda son derece etkili bulunmuştur (Cheftel 1995; Wouters and Smelt 1997; Smelt 1998)

## **A. Işınlama**

Işınlama, gıdanın yüksek enerjili iyonlayıcı radyasyonla fiziksel muamelesi şeklinde uygulanan termal olmayan bir gıda koruma yöntemidir. Proseste Kobalt- 60 gama ışınları, elektronik olarak hızlandırılmış elektron demetleri ve x-ışınları kullanılmaktadır (Wood and Bruhn, 2000).

Işınlama gıdalarda patates, soğan ve sarımsakta çimlenme ve filizlenmenin önlenmesi; tahıl, kurutulmuş meyve, sebze ve kabuklu yemişlerdeki böceklerin öldürülerek ya da sterilize edilerek temizlenmesi; meyve ve sebzelerde olgunlaşmanın geciktirilmesi; raf ömrünün uzatılması; et, kanatlı eti ve deniz mahsüllerinde mikroorganizma sayısının düşürülmesiyle gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması; baharat ve şifalı otlardaki mikroorganizmaların azaltılması gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Farkas and Andrassy, 1993).

## **B. Yüksek Basınç İşlemi (HPP)**

Yüksek Basınç işlemi gıdaların ısıtılarak/ısıtma olmaksızın yaklaşık 6,000 atm'ye kadar basınca maruz bırakılmasıyla mikroorganizmaların inaktivasyonunu ya da tüketicilerin arzu ettikleri kalite parametrelerinin sağlanmasını temel alan bir uygulamadır. HPP ile gıdanın kalitesi korunmakta, taze kalması sağlanmakta ve raf ömrü uzatılmaktadır. Proses aynı zamanda hidrostatik basınç işlemi (HHP) ya da ultra yüksek basınç işlemi olarak adlandırılmaktadır.

HPP prosesinde ürün basınca dayanıklı ambalaj malzemesiyle (genelde plastik şişe ya da poşet) pakatlendikten sonra, genellikle su olmak üzere basıncı ileten hidrolik bir sıvı ile dolu olan yüksek basınç odasına yerleştirilmektedir. Hidrolik sıvı bir pompa yardımıyla sıkıştırılmakta ve gıdaya iletilmektedir. Basıncın uygulanma süresi 3-5 dakikadır. Sonrasında işlenen ürün uzaklaştırılmakta ve uygun koşullarda saklanmaktadır. Basıncın her noktaya aynı anda uygulanmasıyla ürün yüksek basınçlarda bile şeklini muhafaza etmektedir. Isıya ihtiyaç duyulmadığı için de mikrobiyal endişe olmaksızın duyuşal özellikler korunmaktadır.

HPP uygulanan gıdaların raf ömrü termal pastörizasyondakine yakındır. Basınç pastörizasyonu ile vejetatif bakteriler yok edilmekte, ürün asidik karakterli olmadığında buzdolabında muhafazaya ihtiyaç duyulmaktadır. Lezzet, yapı ve renk özelliklerindeki değişim açısından termal pastörizasyonun kullanılmadığı durumlarda HPP'nin uygulanması ile pastörize edilmemiş ürünün raf ömrü 2-3 hafta uzatılabilmektedir (Williams, 1994).

### **C. Atımlı Işık (Pulsed Light- PL)**

Atımlı ışık termal olmayan, kısa yoğun atımlı ya da flaşlı beyaz ışığın kullanıldığı mikroorganizmaları yok etmeyi amaçlayan bir sterilizasyon yöntemidir. 200 nm-1 mm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmektedir. Sterilize edilecek bir yüzey yaklaşık olarak yüzeyde 0,01-50 J/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğuna sahip en az 1 atımlı ışığa maruz bırakılır, bu durumda 170-2600 nm arasında değişen dalga boyu dağılımının kullanılması gerekmektedir ([http://www. From Farm to Fork Food Safety Specialist Training Program.htm](http://www.FromFarmtoFork.com), 2007).

### **D. Ultraviyole Işığı (UV)**

Elektromanyetik spektrumun UV bölgesindeki 200-280 nm aralığındaki dalga boylarının dezenfeksiyon amacıyla kullanılması işlemidir. Mikrobiyal inaktivasyon için UV radyan maruz kalmasının ürünün tüm kısımlarında en az 400 J/m<sup>2</sup>'lik düzeyde olması gerekmektedir. UV ışık, aynı DNA dizisindeki timin ve sitozinler arasında çapraz bağlanmaya yol açarak mutasyona sebep olmaktadır. DNA'nın transkripsiyon ve replikasyon faaliyetlerinin bloke olmasıyla hücrenin ölümü gerçekleşmektedir. Ürünün geçirgenliği, reaktörün geometrik şekli, UV kaynağın dalga boyu, gücü ve uygulama şekli, mutasyon düzeyini etkileyen kritik işlem faktörleridir. Yöntem, ozon ve hidrojen peroksit gibi koruyucu ajanlarla birlikte uygulandığında daha başarılı sonuçlar verebilmektedir ([http://www. From Farm to Fork Food Safety Specialist Training Program.htm](http://www.FromFarmtoFork.com), 2007).



## **E. Pulse Elektrik Field (PEF)**

Pulse elektrik alan (PEF) prosesi mikrobiyal inaktivasyonu sağlayan, gıda kalite parametrelerinde yok denecek düzeyde değişime neden olan ve termal olmayan bir gıda koruma yöntemidir. İşlem iki elektrot arasına konulan gıdaya 10-80 kV aralığında yüksek voltaj uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir. İşlem sonrasında gıda aseptik olarak ambalajlanmakta ve buzdolabı koşullarında muhafaza edilmektedir. PEF pastörizasyonu mikroorganizmaları öldürmekte ve bazı enzimleri inaktif hale getirmektedir. Ürünün asidik olmaması halinde, buzdolabı koşullarında muhafaza zorunludur. Termal pastörizasyonun lezzet, yapı ve renk değişimleri nedeniyle uygulanamadığı ısıya duyarlı sıvı gıdalarda PEF büyük avantaj sağlamaktadır (U.S. Food and Drug Administration, 2000).

## **F. Statik ve Hareketli Manyetik Alan (SMF ve OMF)**

Statik ve hareketli manyetik alan gıdalarda mikrobiyal inaktivasyonunu sağlama potansiyeline sahip yöntemlerdir. SMF'de manyetik alan şiddeti zamana bağlı olarak değişmemekte iken OMF'de sabit ya da azalan genlik sinüsodiyal dalgalar şeklindedir. OMF uygulamasında gıda plastik bir poşete konduktan sonra 0-50 °C sıcaklığında 25-100 ms süreyle 5-500 kHz frekans aralığında 1-100 atımlık hareketli manyetik alan içerisine bırakılmaktadır. 500 kHz üzeri frekanslar mikrobiyal inaktivasyonda daha az etkili olmakta, gıdayı ısıtma eğilimi göstermektedir. Manyetik alan uygulamaları atmosferik basınçlar ve orta düzey sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir (<http://www.FromFarmtoForkFoodSafetySpecialistTrainingProgram.htm>, 2007).

### **1.1. Ultrasound**

En basit tanımıyla ultrasound; insan kulağının işitebildiği ses frekanslarının (16-20 kHz) (Hz = Hertz; saniyedeki salınım) üzerinde, 20 kHz ve daha yüksek frekansa sahip ses dalgalarıdır. Genellikle ultrasound cihazları 20 kHz-10 MHz'lik frekanslarda

kullanılmaktadır (Brondum et al., 1998; Butz and Tauscher, 2002). Yüksek güç ultrasound  $1W/cm^2$  lik ses şiddeti yaymaktadır (Mc.Clements, 1995; Leighton, 1998; Villamiel and de Jong, 2000b).

Ultrasound elektrostatik dönüştürücülerle çalışma prensibine dayanmaktadır. Demirli elektriksel materyallerin yüksek frekansta oluşturduğu elektriksel deformasyon sonucu elektriksel bir çekim alanı oluşmakta ve ortamdaki moleküllerin karşılıklı olarak bir çekim kuvveti oluşturması ilkesine dayanmaktadır (Kuttruff, 1988; Raichel, 2000).

Son zamanlarda ultrasonik ses dalgaları büyük ilgi çekmekte ve geniş uygulama alanları bulmaktadır. Ultrasound sadece fen alanında değil, dezenfeksiyon amaçlı olarak gıda maddeleri hazırlığında, ilaç sanayide, evsel atık ürünlerde ve sularda (Leighton and Dumbrell, 2004; Hoffmann et al., 1996) kullanılmaktadır. Biyomedikal alanlardaki uygulamaları en bilinen şekliyle anne karnındaki fetüse teşhis koyma ve terapi üzerinedir (Mizrach et al., 1994).

Ultrasound uygulamalarının sınıflandırılması amacıyla, ses alanında oluşan enerji miktarının, en önemli kriter olduğu belirtilmiştir. Bu enerji miktarı ise;

- ses kuvveti (W),
- ses şiddeti ( $W/m^2$ ) veya
- ses enerji yoğunluğu ( $W/m^3$ )

ile karakterize edilebilmektedir (Knorr et al., 2004).

Gıda endüstrisinde ultrasound birkaç yıldır kullanılmaktadır (Knorr et al., 2004; Mason et al., 1996). Floros ve Liang (1994), gıda üretimi ve işlenmesinde düşük şiddetli ve yüksek frekanslı ultrasound'un kullanılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu endüstriyel beklentiler; tekstür, viskozite ve bir çok katı ya da sıvı gıdaların konsantrasyon ölçümlerini, sebze ve meyve, et, yumurta, süt ve diğer gıdaların bileşenlerinin belirlenmesini, akış düzeyi ve sıcaklık ölçümlerini, ambalajlanmış gıdalara ve yumurta kabuklarına zarar vermeden kontrol edilebilmesini kapsamaktadır.

Hücre inaktivasyonu veya ölümü için uygulanan yüksek ses şiddetli, düşük frekanslı ultrasound (Power Ultrasound) sıvı bir ortamda sonradan değinilecek olan kavitasyona neden olmakta, bu da gıda işlenmesinde, mikroorganizmaların inaktive edilmesinde kullanılmaktadır. Bu olayda mikroorganizmaların hücresel, fiziksel yapılarında bozulmalar ve hücre ölümleri meydana gelmektedir (Guerrero et al., 2001; Alzamora et al., 2003).

Gıda endüstrisi uygulamalarında;

1- Yüksek şiddetli;

high intensity, <100 kHz, <10 Wcm<sup>2</sup> : mikrobiyal, enzimatik inaktivasyon

2- Düşük şiddetli;

low intensity, >100 kHz, <1Wcm<sup>2</sup> : çeşitli fiziko -kimyasal analitik teknikler

olmak üzere iki tür ultrasound kullanılmaktadır.

- Gıdalarda mikroorganizma inaktivasyonunda kullanılan “Power Ultrasound” (20-100kHz)’dur (Piyasena et al., 2003).

Ultrasound teknolojisinin gıda endüstrisinde yaygın kullanılmakta olduğu ve ileride de oldukça yaygın kullanılacağı açıkça görülmektedir.

### 1.1.1. Ultrasound’ un gıda sanayiide kullanım alanları

- Sebze ve meyvelerin gizli çürüklerinin test edilmesi
- Endüstride, katı ve sıvı gıdaların konsantrasyon ölçümü (et, yumurta, süt gibi gıdalarda, gıda bileşiminin tespiti)
- Akış düzeyi ve sıcaklık ölçümleri
- Gıda maddesine karışan tahta parçası, kağıt, cam gibi istenilmeyen materyallerin belirlenmesi
- Bitki dokularında fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, lipid ve protein ekstraksiyonu
- Emülsifikasyon
- Homojenizasyon (süt, krema, ketçap, mayonez)
- Kristalizasyon
- Meyve sularında, renk ve duyuşal değişim olmaksızın ekstraksiyon
- Yüzey dezenfeksiyonu (Etlerde, tavuk karkaslarında)
- Sütlerde pastörizasyon
- Domates salçaları, sularında vizkositeyi arttırma (Enzim inaktivasyonu arttıkça vizkosite artar)
- Gıdalarda dondurma süresini kısaltma

- Mikrobiyal inaktivasyon
- Enzimatik inaktivasyon
- Ambalajlanmış gıdalarda kalite kontrolü (konserve kutuları, meyve suları ve süt gibi ambalajlanmış gıdalarda kutuya zarar vermeden, açmadan ses dalgalarıyla kontrol) (Floros and Liang 1994)

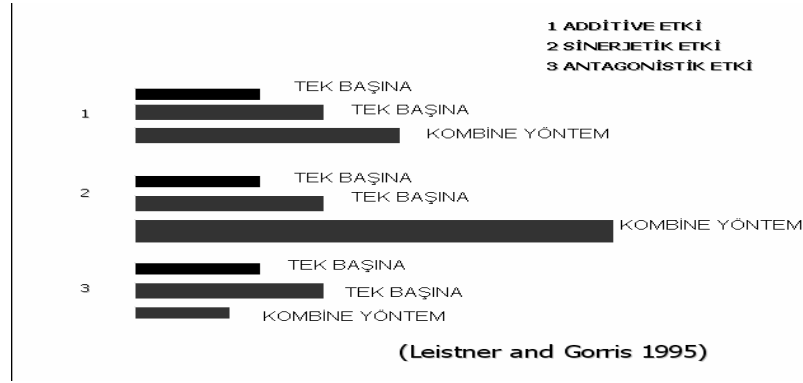
### 1.1.2. Ultrasound' un diğer yöntemlerle kombine edilerek kullanımı

Gıda endüstrisinde nontermal işlemeyi yaygınlaştırmak için, bu teknolojilerin klasik veya yeni metodlarla kombinasyonu üzerinde durulmaktadır. Bu yaklaşım "hurdle teknolojisi" diye adlandırılmakta ve gıda korumasında klasik tekniklerle başarılı bir şekilde uygulanmakta ve kombine gıda koruma uygulamaları daha avantajlı olarak görülmektedir (Leistner and Gorris, 1995). Kombine koruma tekniklerinin de toplamdaki koruma etkisinin sadece –additive- olduğu belirtilmekte ancak gıda kalitesi ve güvenliğinde –sinerjistik- bir etkinin tercih edildiği bildirilmektedir. Bununla beraber, kombine teknolojilerin her zaman avantaj sağlamadığı, bazen antagonistik bir etki oluşturabilecekleri de eklenmiştir. Farklı parametreler kullanılarak yapılan bir çalışmada (pH ve sıcaklık); Tek başına pH kullanıldığında elde edilen inaktivasyon oranını %30, tek başına sıcaklık uygulandığında ise %20 olarak düşünürsek, pH ve sıcaklığın kombine kullanımından elde edilen inaktivasyon oranı %50 olduğunda additive etki, %50'den fazla olduğunda sinerjistik bir etki ve % 50'den az olduğunda ise antagonistik etki sağlanmış olmaktadır (Leistner and Gorris, 1995).

Prensipite pek çok bireysel uygulamanın, tek başına gıdanın güvenliğini ve değişmezliğini sağlayamadığı belirtilmektedir. Termal proseslere alternatif olan nontermal proseslerden biri olan ultrasoundun pH ve su aktivitesi gibi fiziksel faktörlerle kombine kullanımları üzerine de çalışmalar sürdürülmektedir (Piyasena, et al., 2003).

- MANOSONİKASYON (basınç ile ultrasound'un kombine edilmesi) (MS)
- TERMOSONİKASYON (sıcaklık ile ultrasound'un kombine edilmesi) (TS)

- MANOTERMOSONİKASYON (basınç+sıcaklık ile ultrasound'un kombine edilmesi) (MTS) (Javier and Gustavo 2003).



Şekil 1.1. Additive, sinerjetik ve antagonistik etkilerin şematize olarak gösterimi (Leistner and Gorris, 1995)

Manosonikasyon uygulamasının ısı uygulaması ile eş zamanlı yapılmasının da (monotermosonikasyon) yüksek mikrobiyal inaktivasyon sağladığı belirtilmiştir. Pek çok vejetatif hücrede manotermosonikasyonun öldürücü etkisi additif düzeyde bulunmuştur (Raso et al., 1998a; Pagan et al., 1999c).

### 1.1.3. Ultrasound uygulamalarını etkileyen faktörler

Ultrasound ile mikrobiyal inaktivasyon; uygulama koşulları, mikrobiyal özellikler ve çevresel faktörler olarak sınıflandırılan birkaç faktöre bağlı olarak değişmektedir.

## **A. Uygulama koşulları**

Ultrasound ile mikrobiyal inaktivasyon üzerine etki eden başlıca faktörler ultrasound dalga boyutu (amplitüd), süresi, ortam sıcaklığı ve hidrostatik basınç olarak sıralanmıştır.

### **A.1 Ultrasound dalga boyutu**

Bakteriyal vejetatif hücreler ve sporların inaktivasyonunun ultrasound dalgalarının boyutuyla (amplitud) potansiyel olarak arttığı gözlenmiştir (Pagan et al., 1999b; Raso et al., 1998b). Ultrasonik dalgaların amplitüdü yükseldikçe, mikrobiyal inaktivasyonun artışı, birim zamanda patlayan kaviteasyon baloncuklarının sayısındaki artış ile açıklanabilmektedir (Suslick, 1988, 1990).

### **A.2. Uygulama süresi**

Mikrobiyal inaktivasyon, uygulama süresiyle paralel olarak artmaktadır. Canlılık fraksiyonu ile uygulama zamanı arasında belirli bir ilişki gözlenmiştir. Buna dayanarak ultrasound dalgalarına karşı mikrobiyal direnç, desimal redüksiyon zamanından (D değeri) hesaplanmakta; D değeri ise, verilen sıcaklık, pH ve amplitudte canlı hücrelerin sayısını bir logaritmik birim azaltan yada popülasyonun % 90'ını öldürebilmek için gerekli olan süre olarak tanımlanmıştır.

### **A.3. Sıcaklık**

Isı uygulamasının şiddetini azaltmak için, ultrasound uygulamasının basınç altında ve ısı ile yapılmasının (manotermosonikasyon) mikrobiyal inaktivasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Pek çok vejetatif hücrenin inaktivasyonunda bu kombinasyonun additif etkisi gözlenmiştir (Pagan et al., 1999b; Raso et al., 1998b).

*Streptococcus faecium* ve *Bacillus subtilis* sporları üzerine sinerjistik etki sağlanmıştır (Raso et al., 1998a)

#### **A.4. Hidrostatik basınç**

Ultrasound ile maya, bakteri vejetatif hücreleri ve sporların inaktivasyon değeri, uygulama ortamının hidrostatik basıncı ile artmaktadır. Manosonikasyonun mikrobiyal inaktivasyon etkisi potansiyel olarak basınçla (0-200-300 kPa oranında) artmakta, 300 kPa'nın üzerindeki basınç artışları manosonikasyonun inaktive edici etkisini önemli ölçüde değiştirmemektedir.

Ultrasonik dalgaların mikroorganizmalar üzerindeki letal etkisi, hidrostatik basınç ve kavitasyon fenomeniyle ilişkilidir. Ortamda basınç yükseldiğinde, kavitasyon baloncukları daha yüksek bir basınçla patlamakta ve yoğunluğu artmakta ancak birim zaman başına patlayan baloncuk sayısı azalmaktadır. Patlama yoğunluğu, yüksek basınçlarda daha kuvvetli olmasına rağmen, azalan baloncuk patlaması sayısı, belirli bir basınç değerinin üzerinde ultrasoundun öldürücü etkinliğinin azalışını açıklamaktadır (Whillock and Harvey, 1997).

### **B. Mikrobiyal özellikler**

#### **B.1. Mikroorganizmalar**

Büyük hücreli organizmaların küçük hücrelere, çubuk şekilli bakterilerin de kok türlerine göre ultrasounda karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Ahmed and Russell, 1975; Jacobs and Thornley, 1954). Gram pozitif hücreler Gram negatiflere oranla ultrasounda daha dirençlidirler. Gram pozitiflerin Gram negatiflere göre daha kalın bir peptidoglukan tabakasına sahip oluşu, gram negatiflerde ise membran üzerinde yer alan lipoprotein tabakasının bulunuşu mikroorganizmaların ultrasounda olan dirençlerinde etkili faktörlerdir. Anaerobik türlerin aerobiklere göre, bakteri sporlarının vejetatif

hücrelere göre daha dirençli oldukları da belirtilmiştir (Ahmed and Russell, 1975; Sanz et al., 1985).

Vejetatif hücrelerin ultrasounda karşı farklı direncine rağmen, inaktivasyon etkisi üzerine hidrostatik basınç ve amplitud düzeyi etkisinin mikroorganizmadan bağımsız olduğu belirtilmiştir (Pagan et al., 1999b).

## **B.2. Büyüme fazı**

Ultrasound dalgalarına karşı mikrobiyal direnç üzerine, büyüme fazının etkisi üzerine farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı uzmanlar bu faktörün etkili olmadığını savunurken, bazıları da *E. coli*'nin log büyüme fazında, sabit faza oranla ultrasounda daha duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir (Hamre, 1949; Allison et al., 1996).

## **B.3. Büyüme ısısı**

*Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica* gibi farklı mikroorganizmaların direncinin büyüme ısısından bağımsız olduğu belirtilmiştir (Pagan, 1997).

## **B.4. Sublethal ısı uygulamaları**

Mikroorganizmalar ısı ile şoklandığında, ısı dirençleri oldukça artmaktadır. Yüksek direncin nedeni, bakterileri ısıya karşı koruyan 'ısı şok proteinleri' denilen proteinlerin sentezlenmesi olabileceği düşünülmektedir.

Pagan ve ark. (1999a) *L. monocytogenes*'in 45 °C'de 180 dak. ısı şoklamasıyla 62 °C'deki ısı direncinin 6 kat daha arttığını gözlemlemişlerdir. Bunun yanı sıra önceden sublethal bir ısı uygulaması görmüş hücrelere, manotermosonikasyon uygulamasının, lethal etkisinin belirli sıcaklık derecelerinde sinerjistik olduğunu belirtmişlerdir.



## **C. Çevresel Faktörler**

### **C.1. pH**

Genelde mikroorganizmaların ısı direnci asidik ortamda azalmaktadır. Bununla beraber, bazı araştırmacılar mikroorganizmaların ultrasound direncinin ortam asitliğinden bağımsız olduğunu belirtmişlerdir (Pagan et al., 1999c; Kinsole et al., 1954).

### **C.2. Su aktivitesi**

Azalan su aktivitesinin mikrobiyal ısı direncini büyük ölçüde etkilediği iyi bilinmektedir (Hansen and Rieman, 1963). Su aktivitesindeki azalmanın ultrasounda karşı mikrobiyal direnci arttırmakta olduğu, fakat bu artışın düşük olduğu belirtilmiştir. Ortama % 50-57 sukroz eklenmesiyle *Salmonella enteriditis* ve *L. monocytogenes*' in ısı direncinin sırasıyla 30 ve 25 kat; manosonikasyon direncinin ise sadece iki kat arttığı kaydedilmiştir (Pagan, 1997; Alvarez et al., 2003). Ortamda su aktivitesi azaldığında, bu mikroorganizmaların manotermosonikasyonla inaktivasyonunda sinerjistik bir etki de gözlenmiştir.

### **C.3. Uygulama ortamının yapısı**

Genelde ultrasound uygulamalarına mikrobiyal direnç, gıda ortamında artmaktadır (Jacobs and Thornley, 1954). Bu koruyucu etki, ürünün yapısına bağlı bulunmaktadır. *L. monocytogenes*'in manosonikasyon uygulamasına direncinin pH'sı 7 olan McIlvaine tamponu ve kaymaksız sütte aynı olduğu gözlenmiştir (Pagan et al., 1999a). Bununla beraber sıvı yumurtada *Salmonella senftenberg*'in direncinin pH'sı 7

olan McIlvaine tamponuna göre iki kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Manas et al.,2000).

#### **1.1.4. Mikrobiyal inaktivasyon mekanizması**

İnaktivasyon metodu olarak ultrasoundun araştırılmasına 1960'larda başlanmıştır. Denizaltı tatbikatlarında oluşan ses dalgalarının, balıkları öldürdüğü keşfedilmiştir (Earnshaw et al., 1995).

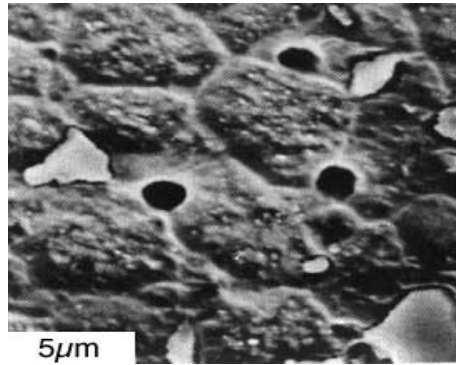
Yüksek yoğunluklu ultrasound sıvı ortamda yayılırken kavitasyon (cavitation) adı verilen bir fenomen meydana gelmekte ve yüksek basınç bölgeleri oluşmaktadır. Kavitasyon olayı sırasında içleri gazla dolu yüksek enerjili küçük baloncuklar meydana gelmekte (Maisonhaute et al., 2002; Krefting et al., 2004; Leighton, 2007) ve sonikasyon devam ederken bu baloncuklar patlayarak, yüksek basınç ve sıcaklık oluşmaktadır (Harvey and Loomis, 1929, Sala et al., 1995). Şok dalgaları kinetik enerjiye transfer edilerek bir ses dalgası ve titreşim oluştururlar. Oluşan ses dalgası 570 km'lik hızla hareket eder. Patlamalar nedeniyle, baloncuğun çevresindeki moleküllerin birbirlerine şiddetle çarpışmaları sonucu oldukça yüksek ısı (5500 °C) ve basınç (50 MPa) noktaları oluşmaktadır (Leighton, 1998). Bu noktalarda oluşan ısı ve basınç süresinin 1 µs'den az, sıvının ısınma ve soğuma hızının 10<sup>9</sup> °C/s olduğu belirtilmiştir (Flint and Suslick, 1991). Bu patlamalardan kaynaklanan basınç değişimleri ultrasoundun başlıca bakterisit etkisini oluşturmaktadır. Yüksek ultrasoundun etkisi, birim zamanda patlayan baloncukların sayısı ve yoğunluğuna, uygulamanın özelliğine ve uygulama ortamının yapısına bağlı olarak değişebilmektedir.

Bir ortamın kavitasyon eşiği (kavitasyon oluşturma için gerekli minimum basınç salınımı) bir dizi faktörle belirlenmektedir. Bu faktörler arasında erimiş gaz, hidrostatik basınç, sıvının spesifik ısısı, sıvının gerilimi sayılabilmektedir. Ultrasonik frekansın 2,5 MHz in altında olması gerektiği ve bu değer in üstünde kavitasyon oluşamayacağı bilinmektedir (Allinger, 1975).

Kavitasyonun etkileri; mekanik (akustik basınç), optik (ses şiddeti ile oluşan ışık çıkması), kimyasal (hidroksil, serbest radikallerin oluşması ve reaksiyon göstermeleri) ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir (Burkhard and Michael, 1996; Kujipers, 2002).

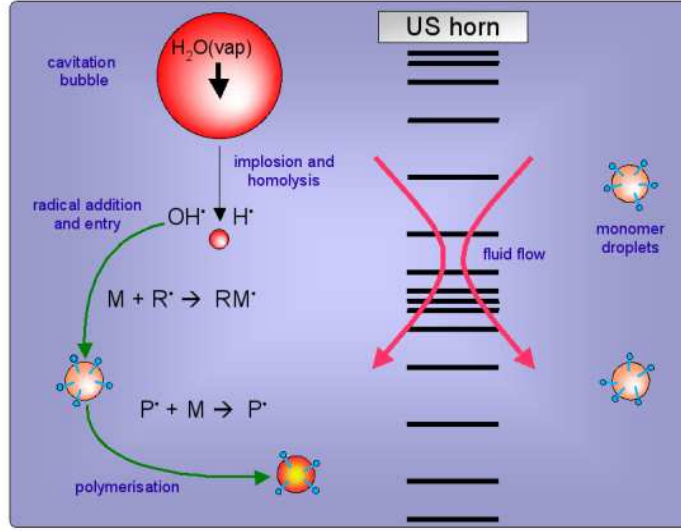
Ses dalgalarının mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkileri konusunda; hücre membranlarının incilmesi ve geçirgenliğinin bozulması lokal ısınma ve serbest radikallerin oluşumu gibi mekanizmalar olabileceği belirtilmiştir (Butz and Tauscher, 2002; Fellows, 2000).

Her çeşit ultrasound dalgası mikroorganizmaların hücre duvarında bazı hasarlar meydana getirir ve bu hasarlar canlılığın normal fiziksel ve canlılık aktivitelerini etkiler (Dimitrier et al., 2005). Bunun yanında mikroorganizmanın parçalanmasını, ısıya olan duyarlılığını etkiler. Tabi bu etmenler mikroorganizma cinsine, büyüklüğüne ve ortamdaki diğer şartlara da bağlıdır (Garcia et al., 1989; Wase and Patel, 1985).

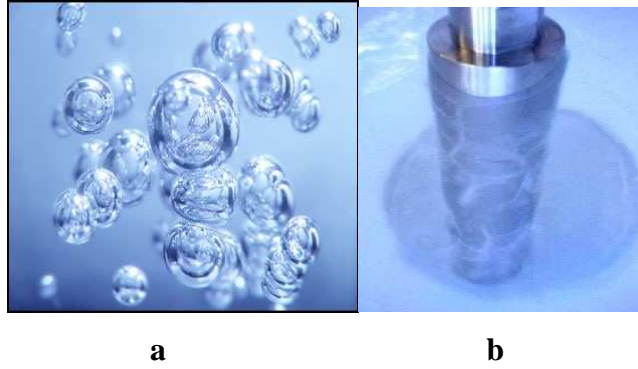


Şekil 1.2. Kavitasyon olayının hücre duvarında meydana getirdiği yarıklar

Kavitasyonun kimyasal etkilerinden biri de serbest radikallerin, hidroksil radikallerinin oluşmasıdır. Hidroksil radikaller kavitasyonun ultrasonik alanda yarattığı aktiviteye bağlı olarak meydana gelir. Sıvı bir ortama uygulanan ultrasound sonucu sıvının alanda hareket etmesiyle kavitasyon baloncuğu patlar ve  $\text{OH}^-$  ve  $\text{H}^+$  reaktif radikalleri üretilir. Bu radikaller de ortam sıcaklığının yükselmesinde rol oynarlar (Lea et al., 2005). Bu radikaller oksijen ile reaksiyona girerek  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hidrojen peroksit) meydana getirirler (Şahin, vd., 2004).



Şekil 1.3. Kaviteasyon oluşum mekanizması  
([www.nanonanonano.net/projects/sonochem/](http://www.nanonanonano.net/projects/sonochem/))



Şekil 1.4. Ultrasound uygulaması sırasında meydana gelen kaviteasyon olayı ve mikrobaloncuklar a) mikrobaloncuklar b) kaviteasyon dalgaları

## 1.2. Ultrasound ve Diğer Yöntemlerin Kombine Edilerek Kullanılması İle Yapılan Çalışmalar

Tsukamoto ve ark.(2004) ultrasound'un hücre inaktivasyonunu *Saccharomyces cerevisiae* mayasında incelemişler ve ultrasonik dalgaların büyüklüğünün (amplitüd) hücre inaktivasyonundaki etkisini gözlemlemişlerdir. Sonuçta düşük amplitüdde canlı

kalan hücre sayısının yüksek amplitüdüdekine göre daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.

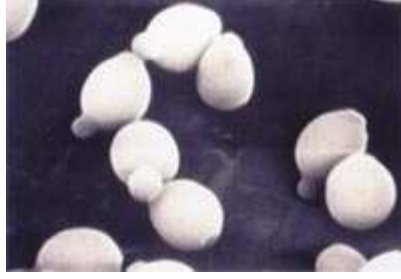
Borthwick ve ark.(2005), aynı sürede maya hücrelerindeki hasarların 267 kHz'lik şiddette, düşük frekanslı (20 kHz) şiddete göre daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Ultrasound uygulamalarının diğer dezenfeksiyon teknikleriyle beraber kullanılması, örneğin; antibiyotiklerle (Peterson and Pitt, 2000), sıcaklık (Villamiel and de Jong, 2000a; Lopez- Malo et al., 2005; Alvarez et al, 2006), hipoklorit (Duckhouse et al., 2004), basınç (Piyasena et al., 2003), TiO<sub>2</sub> fotokataliz (Dadjour et al., 2006) veya UV ışınlanması (Blume and Neis, 2004) gibi yöntemlerle beraber sinerjistik bir etki göstermektedir. Düşük frekanslı ultrasound biyofilmlerdeki *E. coli* hücrelerine uygulandığında, bakterinin gentamisin antibiyotiğine karşı çok hassas olduğu gözlenmiştir.

Benzer olarak düşük frekanslı (20kHz) ultrasound'un 45-60 °C sıcaklıkla beraber *Aspergillus flavus* ve *Penicillium digitatum* sporlarında canlılıkları üzerine çok iyi redüksiyonlar oluşturmuştur. Bu faktörlerin ayrı ayrı uygulanmasına karşın, beraber uygulanması daha iyi sonuçlar vermektedir (Lopez- Malo et al., 2005).

Hücre zarı geçirgenliğinin ultrasound şok etkisiyle bozulması Tabatabaie ve Mortazavi (2008) tarafından bazı laktik asit bakterileri üzerinde araştırılmıştır. 20 kHz'de 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dak.'lık ultrasound uygulamaları sonunda bakteri hücreleri Transmission Electron Microscope ile incelenmiştir. Ultrasound uygulanmış hücrelerde yapısal bozulmalar ve yarıklar meydana geldiği görülmüştür. Bu durumda hücre zarı geçirgenliği artmakta ve sonuçta hücreye koagülasyonda gerekli ve önemli olan  $\beta$ - galaktozidaz gibi bir enzimin dışarı salgılanmasına neden olmaktadır. Ayrıca ultrasound uygulaması sonunda süre arttıkça canlı kalan laktik asit bakteri sayısının da buna paralel olarak azaldığını belirlemişlerdir.

Rediske ve ark. (1998), *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde eritromisin antibiyotiğinin etkisini 70 kHz'lik şiddette ultrasound uygulayıp ve uygulamadan çalışmışlardır. Ultrasound etkisi yalnız başına *P. aeruginosa* üzerinde inhibe edici (baskılayıcı) bir etki göstermezken, antibiyotik ve ultrasound beraber uygulandığında hücrelerde 1-2 log birim azalış meydana gelmiştir.



Şekil 1.5. *Z.rouxii*'nin morfolojik görüntüsü (<http://kiifc.kikkoman.co.jp/english/exhibit/index.htmlhakkou.html>)

### 1.3. *Zygosaccharomyces rouxii*'nin (*Z. rouxii*) Genel Özellikleri

*Z.rouxii*, osmotolerant, hemiascomycetes gruplarını içeren bir mayadır (De Montigny et al. 2000). Haploid hücreleri globular, elipsoid veya ovoid tir. Geniş pH aralıklarında (1.8-8) (Tokuoka, 1993), yüksek şeker ve tuz konsantrasyonlarında, düşük miktarda su içeren gıdalarda gelişimini sürdürebilir. Alkole karşı toleranslıdır. Bunun yanında etanol, kükürt dioksit ve asetik asiti de tolere edebilmektedir (Reed and Nagodawithana, 1991).

Bu özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde adından söz ettiren bir mayadır. Fermente gıdalarda bozulma etmenidir. Ekmekte beyaz ve krem renge dönüşüm meydana getirirken, balda gaz ve baloncuk oluşumu ile kendini gösterir (Legan and Voyset, 1991). Ancak salgıladığı bazı maddelerin patojenik veya mutajenik bir etki yapıp yapmadığı konusunda literatürde pek fazla bilgi yoktur.

*Z.rouxii*, ultrasound ve sıcaklık uygulamasına ortamda antimikrobiyaller olmadan direnç gösterir. Ultrasound amplitüdü, uygulama zamanı ve antimikrobiyal konsantrasyonu arttıkça maya sayısında azalmalar gözlenir (Scientific Committee On Food, 1999).

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Besiyerleri

##### **Besiyeri 1: Sabouraud -2% Dextrose Broth (SDB, Merck)**

Et peptonu	5 g
Kazein peptonu	5 g
D(+) Glukoz	20 g
pH	5.6 - 5.8

30 g SDB tartılarak 1 litre deiyonize suya ilave edilmiş, ısıtılarak çözüldürülmüş ve tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüplerin ağzı hafif kapatılarak 121°C'de 15 dak otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Tüpler daha sonra maya ekimi yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

##### **Besiyeri 2: Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco™)**

Peptic Digest of Animal Tissue	5 g
Pankreatik kazein	5 g
Dekstroz	40 g
Agar	15 g
pH	5.6 – 5,8

65 g SDA tartılarak 1 litre deiyonize suya ilave edilmiş, ısıtılarak çözüldürüldükten sonra 121 °C'de 15 dak otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası besiyerinin 45° C'ye soğuması beklenildikten sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür. Deneyle sırasında besiyerinin dilüsyon sıvısını çabuk emebilmesi için besiyeri dökülmüş petrieler 35 °C'ye ayarlanmış +, - 1 °C hassasiyetli etüve ters şekilde konarak (kapaktaki buharın besiyerine düşmemesi için) 24-48 saat süreyle kurumaya bırakılmıştır. Etüvden çıkarılan besiyerleri buzdolabında saklanmıştır.

### 2.1.2. Çözeltiler

#### 1- Citrate tamponunun hazırlanması:

##### Çözelti 1: 0,1 M Sitrik Asit (Carlo Erba Reagent)

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	21 g
Deiyonize su	1000 ml

21 g  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  tartılarak 1 litre deiyonize suya ilave edilmiş ve erimesi beklenilmiştir.

##### Çözelti 2: di- Sodium hydrogen phosphate (Merck)

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	35.6 g
Deiyonize su	1000 ml

35.6 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  tartılarak 1 litre deiyonize suya ilave edilmiş ve erimesi beklenilmiştir.

Hazırlanan sitrik asit ve di- Sodium hydrogen phosphate çözeltilerinden aşağıda verilen hacimlerde alınarak pH 4 ve 7 tamponu elde etmek üzere bir erlende



birleştirilmiş, pH metre yardımıyla pH'ları ölçülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası hazırlanan çözeltilerin pH'ları tekrar ölçülmüştür.

İstenen pH	Alınacak Hacim (ml)	
	Çözelti 1- 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Çözelti 2- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
pH= 4.0	61.45	38.55
pH= 7.0	18.15	81.85

## 2- Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) Hazırlanması:

### Çözelti 3: Sodium chloride (Carlo Erba Reagents )

NaCl	9 g
Deiyonize su	1000 ml

9 g NaCl tartılarak 1 litre deiyonize suya ilave edilmiş, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası FTS steril tüplere 4.5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüpler daha sonradan dilüsyon yapımı için kullanılmak üzere saklanmıştır.

## 3- Su Aktivitesi 0.94 $a_w$ Olan Citrate Tamponu' nun Hazırlanması:

Gliserol ( $C_3 H_8 O_3$ )	246 ml
Sitrat Tamponu	1000 ml

Su aktiviteleri 0.99  $a_w$  olan, önceden hazırlanmış, steril edilmemiş 1000 ml'lik pH 4 ve 7 tamponu içine 246 ml glycerol anhydrous (Merck) ilave edilmiştir. Çözeltilerin su aktiviteleri su aktivite cihazı (Aqua lab) ile ölçülmüştür. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası su aktiviteleri tekrar ölçülerek kontrol edilmiştir.

## **2.2. Metod**

### **2.2.1. Test mikroorganizması**

Bu çalışmada kullanılan test mikroorganizması *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229 suşu United States Department of Agriculture (USDA, Midwest Area-National Center for Agricultural Utilization Research Microbial Genomics & Bioprocessing Research Unit 1815 N University Street- Peoria, Illinois 61604)'dan alınmıştır.

### **2.2.2. Stok kültürün hazırlanması**

Liyofilize kültür aseptik koşullarda açılıp Sabouraud %2 Dekstrose Broth besiyerine transfer edilerek, 30 °C'de 45-48 saat inkübe edilmiştir. Broth kültürü daha sonra yatık Sabouraud Dekstrose Agar tüplerine ve petrilere çekilerek, 30 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiş ve 4 °C'de saklanmıştır.

Sonikasyon çalışmalarında kullanılmak üzere inokulum hazırlamak amacıyla, *Z. rouxii* Y229 suşu, SDA petrisinden alınarak SDB tüpüne ekilmiş ve 30 °C'de 45-48 saat inkübe edilmiştir.

### 2.2.3. Stok kültürdeki *Z. rouxii* sayısının belirlenmesi

Yapılacak olan her çalışmadaki başlangıç hücre sayısını belirlemek amacıyla iki gün önceden SDB'ye ekilen maya kültürü önce vortekste iyice karıştırıldıktan sonra içinden 0.5 ml alınmış, 4.5 ml fizyolojik tuzlu su bulunan tüpe aktarılarak  $10^{-1}$ 'lik ilk dilüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan ilk dilüsyon vortekste karıştırılarak içinden 0.5 ml kültür alınmış, bir başka 4.5 ml FTS içeren dilüsyon tüpüne aktarılarak  $10^{-2}$ 'lik dilüsyon elde edilmiştir. Aynı işlemler  $10^{-6}$ 'lık dilüsyon elde edilinceye kadar tekrarlanmıştır. Daha önceden dökülüp, buzdolabına konan SDA petripleri ısınması için buzdolabından çıkarılmış ve arka yüzeyleri ekim yapılacak sayıda bölünerek etiketlenmiştir. İlk üç dilüsyondaki maya yoğunluğu fazla olacağı için son üç dilüsyon iki paralelli şekilde 0.02 ml damlatma yöntemiyle petriye ekilmiştir. Dilüsyon sıvısını emen petri ters çevrilerek 30 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda elde edilen koyu, beyaz renkli, kabarık kolonilerin sayımı yapılmış ve aşağıdaki formül kullanılarak başlangıç stok süspansiyonunun mililitresindeki canlı *Z.rouxii* sayısı belirlenmiştir.

$$\text{Hücre Sayısı/ml} = \text{KS} \times \text{SF} / \text{H (ml)}$$

$$\text{Seyreltme Faktörü} = 1 / \text{Dilüsyon Oranı}$$

**KS:** Koloni sayısı ortalaması

**SF:** Seyreltme faktörü

**H:** Pipetlenen hacim

### 2.2.4. Sonikasyon çalışmasında kullanılan yöntem

Bu çalışmada; ultrasoundun, sıcaklık, pH ve su aktivitesi ile kombine edildiğinde meydana getirdiği etki araştırılmıştır.

Bu amaçla % 40 ( $49.6 \mu\text{m} = 0.3 \text{ W/ml}$ ) ve % 80 ( $99.2 \mu\text{m} = 0.73 \text{ W/ml}$ ) olmak üzere iki farklı amplitüd, 40, 45, 50, 55 °C olmak üzere dört farklı sıcaklık derecesi pH 4 ve 7 olmak üzere iki farklı pH, 0.94 ve 0.99  $a_w$  (su aktivitesi) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kombinasyonlar aşağıdaki Çizelge 2.1’de daha açık bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan sıcaklık, pH, su aktivitesi ve amplitüd değerleri

SICAKLIK	% 40 AMPLİTÜD	% 80 AMPLİTÜD	KONTROL
40 °C	2 pH (4 ve 7) 2 a <sub>w</sub> (0.94 ve 0.99)	2 pH (4 ve 7) 2 a <sub>w</sub> (0.94 ve 0.99)	2 pH (4 ve 7) 2 a <sub>w</sub> (0.94 ve 0.99)
45 °C	2 pH (4 ve 7) 2 a <sub>w</sub> (0.94 ve 0.99)	2 pH (4 ve 7) 2 a <sub>w</sub> (0.94 ve 0.99)	2 pH (4 ve 7) 2 a <sub>w</sub> (0.94 ve 0.99)
50 °C	0.99 a <sub>w</sub> (pH 4) 0.94 a <sub>w</sub> (pH 4 ve 7)	0.99 a <sub>w</sub> (pH 4) 0.94 a <sub>w</sub> (pH 4 ve 7)	0.99 a <sub>w</sub> (pH 4) 0.94 a <sub>w</sub> (pH 4 ve 7)
55 °C	0.94 a <sub>w</sub> (pH 7 ve 4)	0.94 a <sub>w</sub> (pH 7 ve 4)	0.94 a <sub>w</sub> (pH 7 ve 4)

Sonikasyonlarda 13 mm’ lik solid prob ve ultrasound cihazının 100 ml’ lik haznesi kullanılmıştır.

Belirli aralıklarla sonikasyon haznesinden alınan örneklerin mililitresindeki *Z.rouxii* sayısı damlatma ve yayma plaka yöntemiyle belirlenmiştir. Damlatma yöntemi ile ekimde; 0.02 ml kültür, dilüsyonu yapılmış tüpten alınarak petriye ekilmiş ve kuruması beklenilmiştir. Yayma plaka yöntemi (55 °C için yapılmıştır) ile ekimde ise 0.1 ml kültür, dilüsyonu yapılmış tüpten alınarak petrinin bir kenarına aktarılmıştır. Steril dragalski spatülü, içinde saf alkol bulunan behere daldırılıp ateşte yakıldıktan sonra, ekim yapılmamış petri yüzeyinde soğutulmuştur. Ekimli kısım üzerinden başlanarak petrinin her yerine yayılması sağlanmıştır.

Sonikasyon işlemine başlamadan önce steril 100 ml’lik su ceketli sonikasyon haznesi ve sonikasyon probu su banyolu ultrasound cihazına (poly Science, SONICS Vibra cell) takılmış, su banyosu çalışma sıcaklığından daha alt bir değere (çalışma sıcaklığının 5-10 °C aşağısı) ayarlanmıştır. Sıcaklığın yükselmesini beklerken 99 ml tampon çözelti sonikasyon haznesine konmuş, sonikasyon probu sıvının içine tam merkeze gelecek şekilde (% 40 amplitüde 2.5 cm, % 80 amplitüde 3 cm) batırılmıştır. Sonikasyon haznesinin içindeki sıvının sıcaklığını ölçmek amacıyla 1-2

saat önceden steril kabinde (ESCO) UV ile steril edilmiş sıcaklık probu haznedeki sıvı içine sonikasyon probuna değmeyecek şekilde batırılmıştır. Sıcaklık probu, ayarlanan su banyosu değerinin 1-2 derece altını gösterince, cihaz 5 dk'lık ısıtma işlemi yapmak üzere çalıştırılmıştır. Isıtma işlemindeki amaç; su banyosunun çalışma sıcaklığına yükselmesini sağlamaktır. Bu aşamada her 1 dakika sonunda probun enerjisi (watt) ve sıcaklığı not edilmiştir. 5 dakika sonunda çalışma sıcaklığına yükselen tampon çözeltiye vortekste iyice karıştırılmış sayımı yapılmış stok kültürden 1 ml eklenmiştir. Sıcaklık, amplitüd ve enerjisi gösteren alet, çalışma planındaki zaman aralıklarına ve çalışılacak olan amplitüde göre (%40 ve ya % 80) ayarlanmış ve ultrasound cihazı çalıştırılmıştır. Sonikasyon işlemi sırasında da watt ve sıcaklık not edilmiştir. Cihaz ayarlanan zaman aralıklarında durunca cihaz kapağı açılarak haznedeki 0.5 ml örnek alınmış içinde 4.5 ml FTS bulunan dilüsyon tüpüne aktararak  $10^{-1}$ 'lik dilüsyonu yapılmıştır. Sonra cihazın kapağı kapatılarak alet çalıştırılmış, ikinci zaman diliminde yine aynı işlem tekrarlanmıştır. Ultrasound cihazının çalıştığı zaman diliminde kontaminasyonu önlemek için ateş yanında ve zaman kaybını önlemek için hızlı çalışılmıştır. Planlanan çalışma zamanı bitince bütün zamanlar için yapılmış olan ilk dilüsyonlar tek tek vortekste karıştırılarak 0.5 ml kültür tüpten alınmış, içinde 4.5 ml FTS bulunan tüpe aktararak  $10^{-2}$ 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. Belirlenen sayıda dilüsyonlar hazırlandıktan sonra, her dilüsyon tüpü vortekste karıştırılmış ve daha önceden petrilere dökülmüş alt tarafından bölünerek etiketlenmiş SDA besiyerine ekimi yapılmıştır.

Petriye ekilen dilüsyon, besiyeri içine diffüze olduktan sonra ters çevrilerek 30 °C'de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonucu oluşan koyu, beyaz renkli, kabarık kolonilerin sayımı yapılmıştır.

Sonikasyon uygulamadan sadece sıcaklık etkisini araştırmak amacıyla yapılan kontrol grubu çalışmalarında çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır. Önceden su banyosu çalışılacak olan sıcaklığa ayarlanmıştır. Steril 250 ml'lik erlene sonikasyon işleminde kullanılan çözüldüden 99 ml, boş 250 ml'lik aynı tip bir erlene de musluk suyundan 99 ml konarak erlenler aynı anda su banyosuna yerleştirilmiştir. Burada boş erlene su konmasının amacı erlenlerdeki çözüldülerin sıcaklığının istenilen su banyosu sıcaklığına gelip gelmediklerini kontrol etmek amaçlıdır ki; bunun için su bulunan erlene termometre konarak sıcaklık ölçümü yapılmıştır.

Çalkalamalı su banyosuna aynı anda konan erlenlerden içinde çözelti bulunan erlene, vortekste karıştırılmış, sonikasyon işleminde kullanılmış olan aynı stok kültürden 1 ml eklenmiş ve zaman tutulmuştur. Belirlenen ilk zamanda kültür eklenen erlenden 0.5 ml alıp içinde 4.5 ml FTS bulunan dilüsyon tüpüne aktarılarak ilk dilüsyon elde edilmiştir. Belirlenen zaman dilimine kadar aynı işlemler tekrar edilmiştir. Dilüsyonu yapılan tüpler tek tek vortekste karıştırılarak SDA besiyerine ekimleri yapılmıştır. Bu işlemler ateşin yanında, sayım, sonikasyon ve kontrol çalışmasında aynı stok kültür kullanıldığı için aynı gün yapılmıştır. Petrilerdeki ekimler kuruduktan sonra ters çevrilerek 30 °C'de 48-72 saat süreyle inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonucu oluşan koyu beyaz, kabarık kolonilerin sayımı yapılmıştır.

#### **2.2.5. İnaktivasyon denemelerinde kullanılan ultrasonic processor' ün özellikleri**

Sonikasyon uygulamalarında, 750 Watt'lık Ultrasonic Processor (Sonics and Materials Inc. Vibra Cell VCX 750, U.S.A) kullanılmıştır. Cihazın sıcaklık ölçen paslanmaz çelik probu bulunmaktadır. Ultrasonic Processor' ün converter'in (CV 33, piezoelectric lead zirconate titanate crystals-PZT) çapı 21/2" (65.5 mm), uzunluğu 71/4" tir (183 mm). Converter 20 kHz sabit frekansta ses dalgası üretmektedir. Titanyum alaşımından yapılmış (TI-6AL-4V), 13 mm çapa sahip, maksimum 124 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) amplitüdde, otoklavlanabilir solid prob ses dalgalarının sıvıya iletiminde kullanılmıştır.

Aşağıda Şekil 2.1, 2.2 ve 2.3'te sonikasyon işleminin gerçekleştirildiği düzenek ve kullanılan prob verilmiştir.



Şekil 2.1. Sonikasyon işleminin gerçekleştirilmiş olduğu düzenek



Şekil 2.2. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid prob



Şekil 2.3. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid prob'un uç kısmının yakından görünüşü

### 2.2.6. İstatistiksel metodlar

Bu çalışmada *Z. rouxii* inaktivasyonunun değerlendirilmesinde veya modellenmesinde Birinci Derece Reaksiyon Kinetiği Modeli'nden (First Order Kinetic) yararlanılmıştır (Ertuğrul ve ark., 2003).

Buna göre inaktivasyonun gerçekleştiği koşullar altında, var olan hücre sayısının her birim zamanda belli bir oranı inaktif hale gelir.

Model;

$$N / N_0 = e^{-kt} \text{ veya } \ln N = \ln N_0 - kt \text{ şeklinde gösterilebilir.}$$

Ancak mikrobiyolojik çevrimlerde  $\log_{10}$  dönüşümü tercih edildiği için, model;

$$\log N = \log N_0 - k' t \text{ şeklinde kullanılmıştır.}$$

Desimal azalma süresi olan D değeri, k değerinden (bu modelin eğiminden) doğrudan hesaplanmıştır.

$$D = -\frac{1}{k'}$$

Denklemlerde;

$N_0$  = inaktivasyon işlemine tabi tutulan kültürdeki hücre miktarı (kob/ml)

t = inaktivasyon ortamında örnek alınana kadar geçen süre (dak.)

N = t anında alınan örnekte canlı kalan hücre miktarı (kob/ml)

K = inaktivasyon eğrisinin eğimi ( $\text{dak}^{-1}$ )



$k'$  = log çevrimi yapılmış inaktivasyon eğrisinin eğimi ( $\text{dak}^{-1}$ )

D = deneyin yapıldığı inaktivasyon şartları altında kültür veya süspansiyondaki canlı hücre sayısının bir logaritmik devre veya %90 oranında azalması için gereken süre (dak.)

Verilerin bu modele uygulanması doğrusal regresyonla yapılmış ve bu amaçla Microsoft, Excel programı kullanılmıştır.

D değerlerinin inaktivasyon faktörleri ile değişimine ait varyans analizinde SPSS Ver. 11.5 kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ultrasound dalgalarının (20 kHz) *Z. rouxii* üzerindeki inaktive edici etkisi araştırılmıştır. *Z. rouxii*'nin sonikasyonla inaktivasyonuna farklı ortam koşullarının etkisi de belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, farklı ortam sıcaklığı, pH'sı ve su aktivitesi oluşturularak, bu ortamlardaki *Z. rouxii* hücre süspansiyonuna % 40 ve % 80 olmak üzere iki farklı amplitüd düzeyinde uygulamalar yapılmıştır. Sonikasyon işlemi sırasında, sonikasyon haznesinden belirli aralıklarla örnek alınarak, bu örneklerdeki canlı kalan *Z. rouxii* sayısı belirlenmiştir. Sonikasyon uygulamalarından elde edilen "canlı kalan hücre sayıları" ile inaktivasyon grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafiklerdeki eğim ve  $R^2$  değerlerinden, D değerleri (desimal reduksiyon zamanı) hesaplanmıştır. Sonikasyonlu ve sonikasyon uygulamaksızın (kontrol çalışmaları) yapılan işlemlerden elde edilen D değerleri arasında, istatistiksel olarak önemli bir farkın olup olmadığı da varyans analizi ile belirlenmiştir.

#### 3.1. 40 °C'de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

40 °C'de iki farklı pH ve iki farklı  $a_w$  değerine sahip sitrat tamponunda % 40 ve % 80 sonikasyon düzeyinde yapılan uygulamalardan ve sonikasyonsuz uygulamalardan elde edilen D değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. 40 °C'de yapılan tüm uygulamalara ait inaktivasyon grafikleri de Şekil 3.1- 3.24'te gösterilmiştir. 0.99  $a_w$ 'de % 40 ve % 80 amplitüdde yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri karşılaştırıldığında, amplitüd düzeyinin yüksek olduğu durumda D değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. 0.99  $a_w$ 'de pH 4 ve pH 7'de yapılan sonikasyon uygulamalarında, pH 7'deki D değerlerinin daha fazla olduğu gözlenmiştir, örneğin, pH 4 % 40 için ortalama D değerleri 1.90, % 80 için 1 dak. iken, pH 7 % 40 için 3.57, % 80 için 2.98 dakikadır. Benzer şekilde 0.94  $a_w$ 'de, % 40 ve % 80 amplitüddeki uygulamalardan elde edilen D değerleri karşılaştırıldığında, % 80 amplitüdde D değerlerinin daha kısa olduğu belirlenmiştir.

40 °C'de yapılan sonikasyon uygulanmayan çalışmalarda sonikasyon uygulanana göre çok daha yüksek D değerleri elde edilmiştir. Sonikasyon

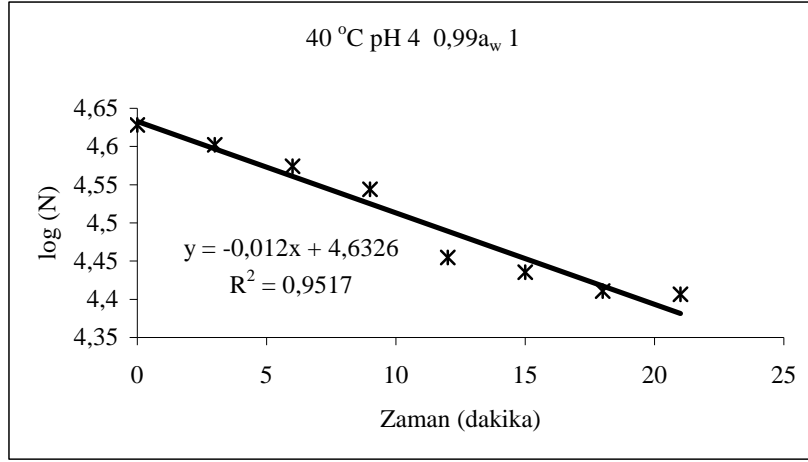
uygulanmayan kontrol grubu çalışmalarda, pH 4'deki D değerleri pH 7'deki D değerlerinden daha fazladır. pH 4'de ve 0.99  $a_w$ 'de yapılan çalışmanın ortalama D değeri 116.29 dak. iken, pH 7, 0.99  $a_w$ 'de yapılan çalışmanın ortalama D değeri, 62.06 dak. olmuştur, aynı durum 0.94 $a_w$ 'de yapılan çalışmalar için de geçerlidir.

Sonikasyon uygulanmayan ve iki paralel halinde yapılan çalışmalardan elde edilen bazı D değerleri arasında büyük farklar bulunmaktadır. Sadece sıcaklığın *Z. rouxii* inaktivasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için çalışmaya dahil edilen bu kontrol grubu denemeleri, çalkalamalı su banyosunda ve 100 ml sitrat tamponu içeren erlenlerde yapılmıştır. Sıcaklığa maruz kalma süresi içinde, erlendeki *Z. rouxii* hücrelerinin, örnekleme yapıldığı anlarda yeterince homojen dağılmamasının bu duruma neden olduğu düşünülmektedir. Sonikasyon haznesinden yapılan örnekleme ve sayım sonrasında bu durumla karşılaşma oranı daha azdır. Çünkü sonikasyon sırasında, sonikasyona maruz kalan sıvıda oldukça güçlü bir sirkülasyon meydana gelmekte ve bu da hücrelerin sonikasyon haznesi içindeki tampon çözeltide çok daha iyi bir şekilde dağılmasını sağlamak ve yapılan tekerrürler arasındaki uyum daha fazla olmaktadır.

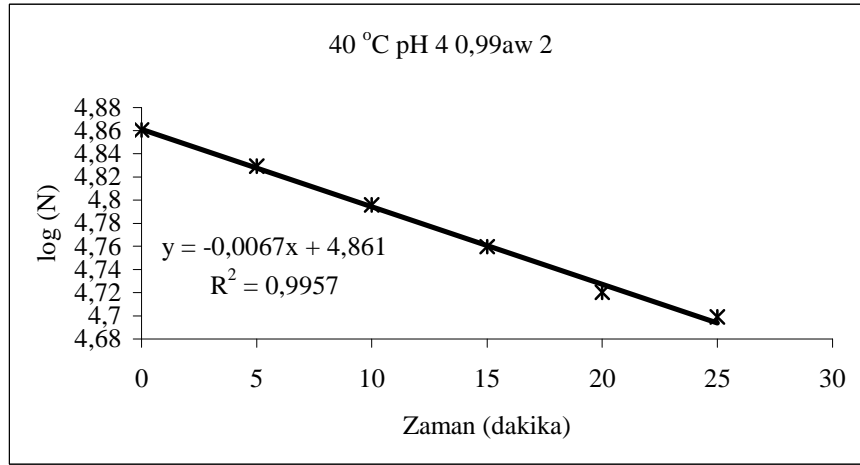
Aynı pH'da 0.99 ve 0.94  $a_w$  değerlerinde yapılan işlemlerde sonikasyon uygulanmış ve uygulanmamış çalışmalardaki D değerleri arasında büyük farklar ortaya çıkmıştır. Aynı pH'da *Z. rouxii* hücrelerinin azalan su aktivitesi etkisiyle, 0.94  $a_w$ 'de 0.99  $a_w$ 'ye oranla sonikasyona daha dirençli olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.1. 40 °C, 0.99 ve 0.94 a<sub>w</sub>, pH 4 ve 7’de sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri ve ortalamaları.

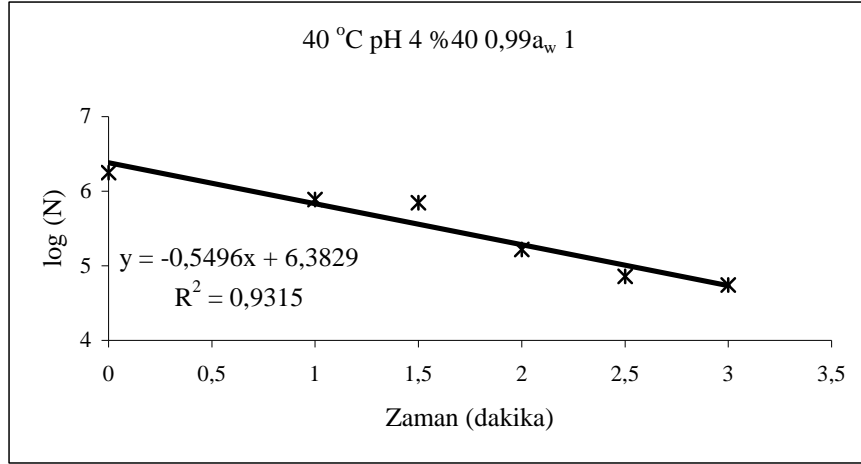
		Sonikasyon düzeyi	D değerleri (dakika)		
			1. deneme	2. deneme	ortalama
0.99 a <sub>w</sub>	pH 4	0	83.33	149.25	116.29
		40	1.82	1.99	1.90
		80	0.95	1.05	1
	pH 7	0	41.49	82.64	62.06
		40	4.12	3.02	3.57
		80	2.78	3.18	2.98
0.94 a <sub>w</sub>	pH 4	0	192.31	181.82	187.06
		40	14.1	27.55	20.82
		80	10.67	11.17	10.92
	pH 7	0	49.75	37.45	43.6
		40	18.12	18.9	18.51
		80	14.47	15.08	14.77



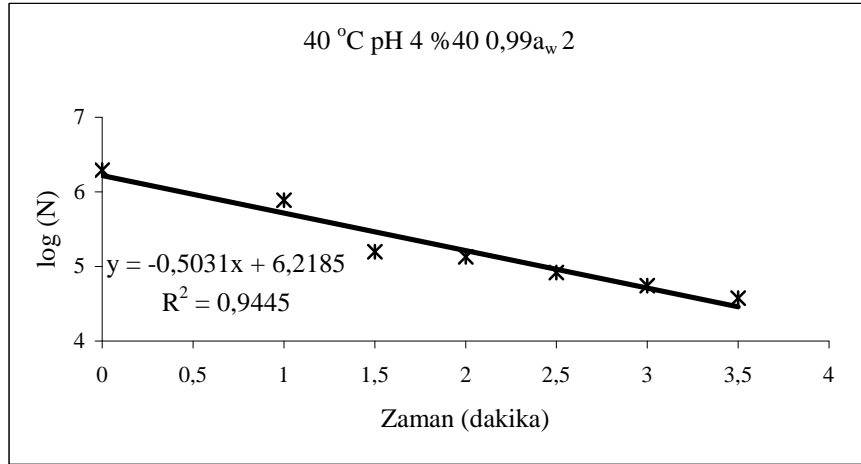
Şekil 3.1. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



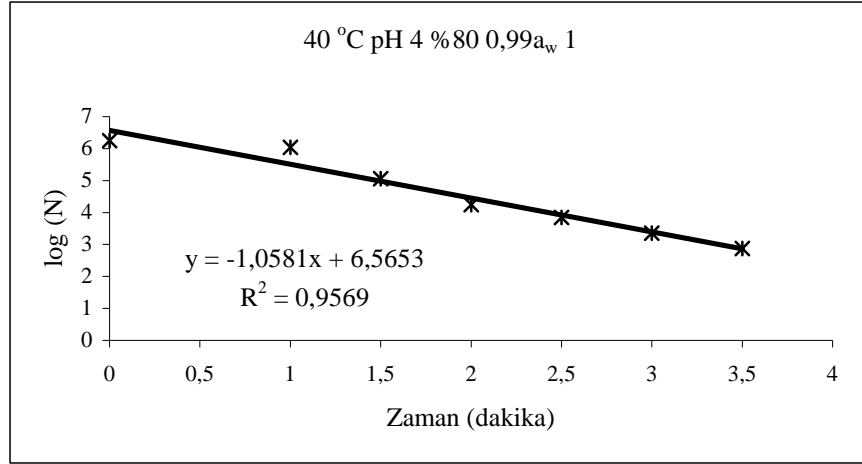
Şekil 3.2. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



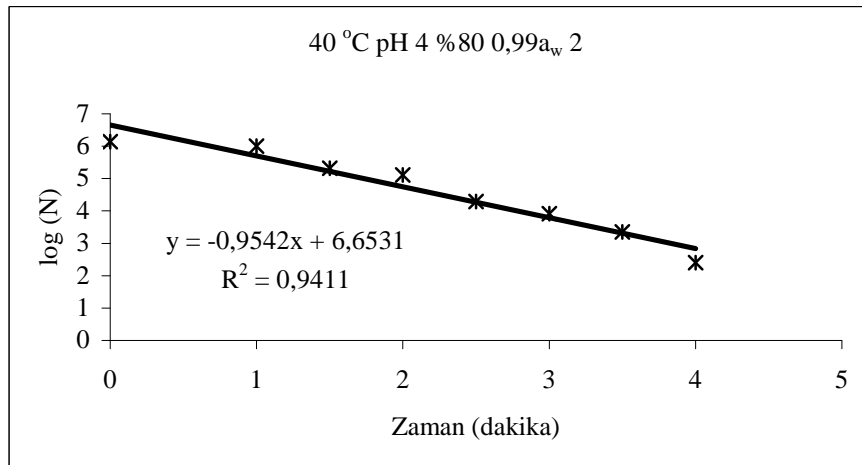
Şekil 3.3. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



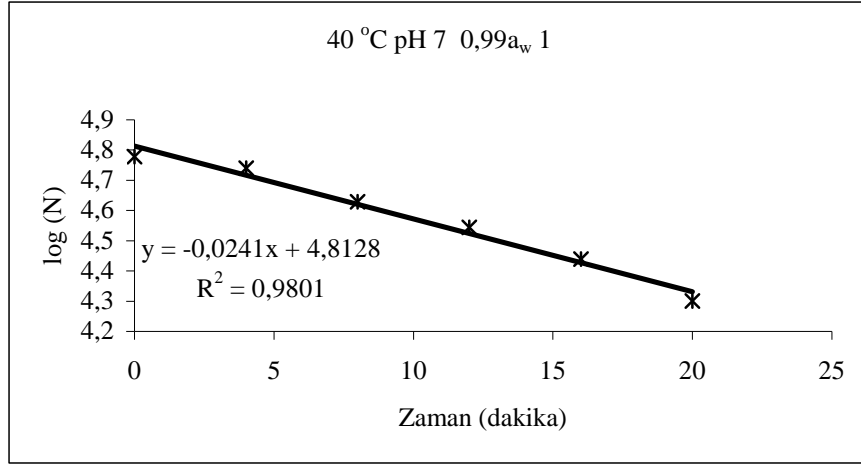
Şekil 3.4. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



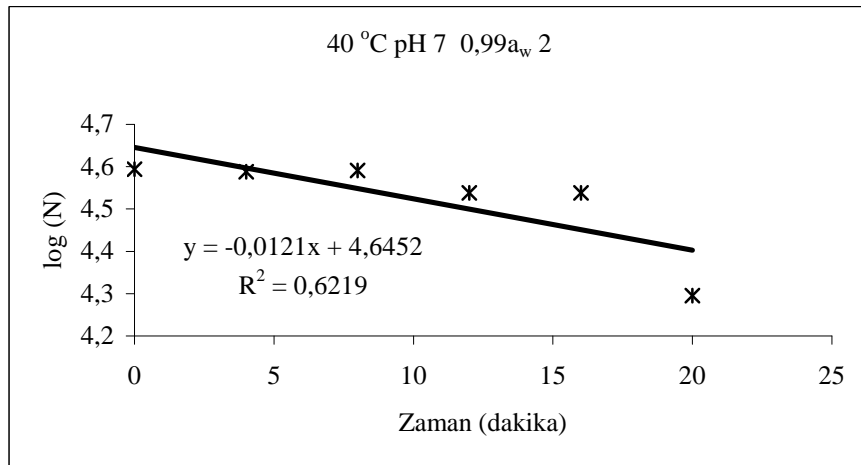
Şekil 3.5. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.6. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

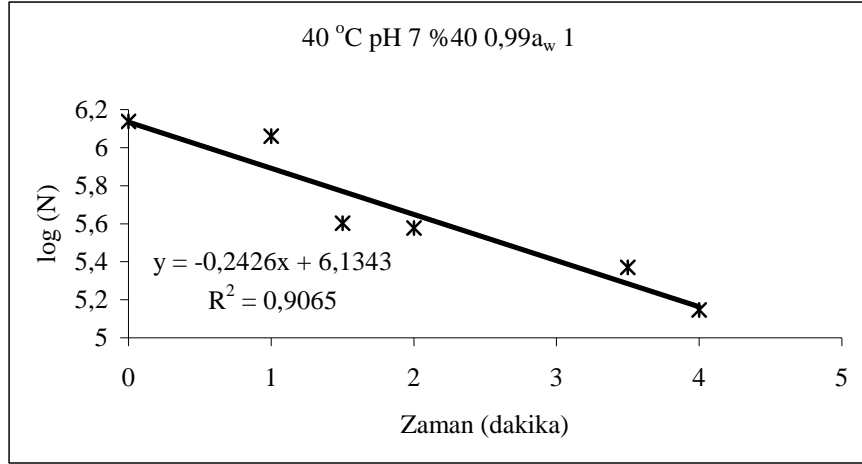


Şekil 3.7. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.

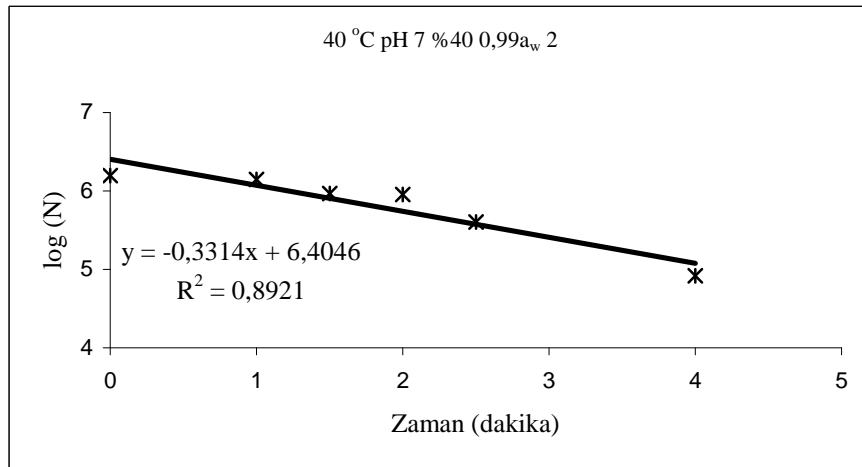


Şekil 3.8. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

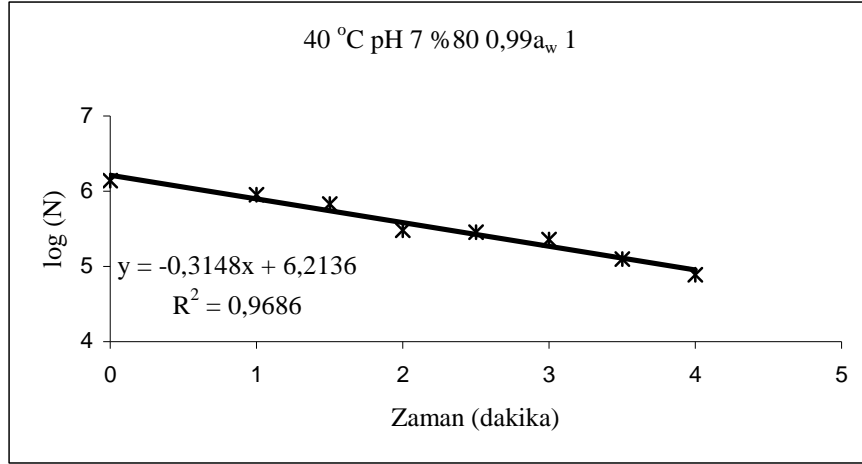




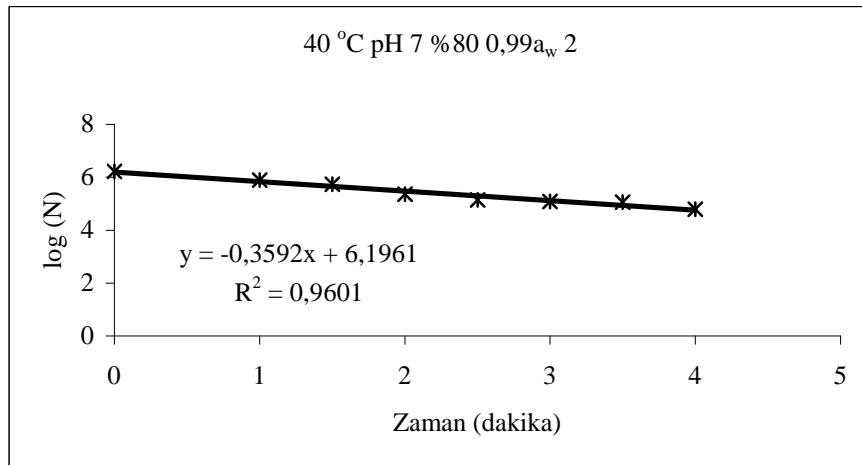
Şekil 3.9. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



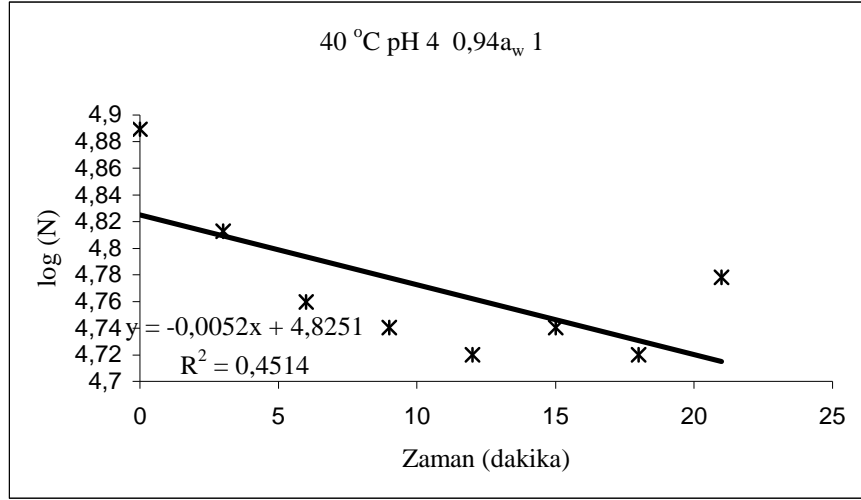
Şekil 3.10. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



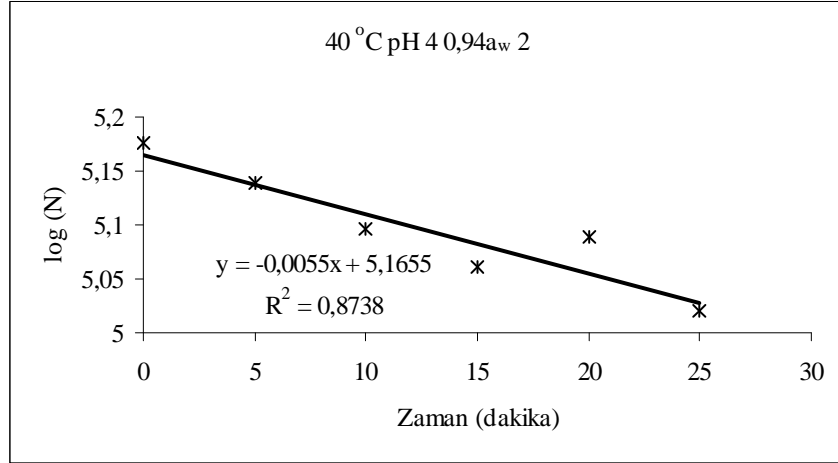
Şekil 3.11. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.99, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



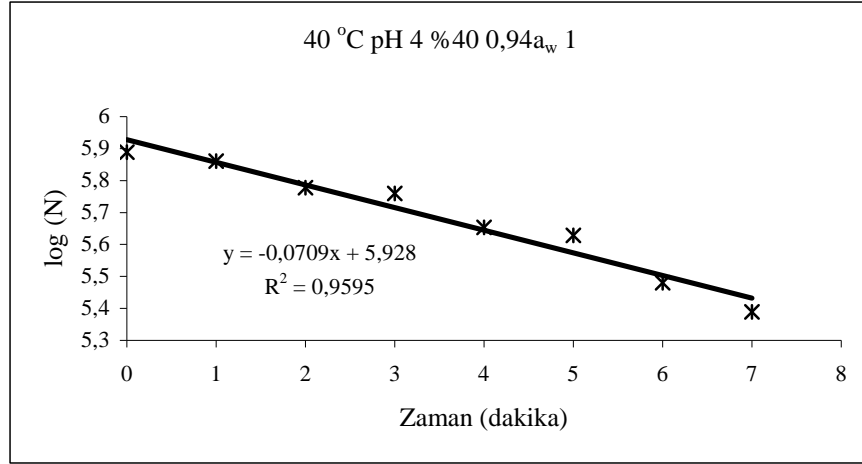
Şekil 3.12. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.99, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



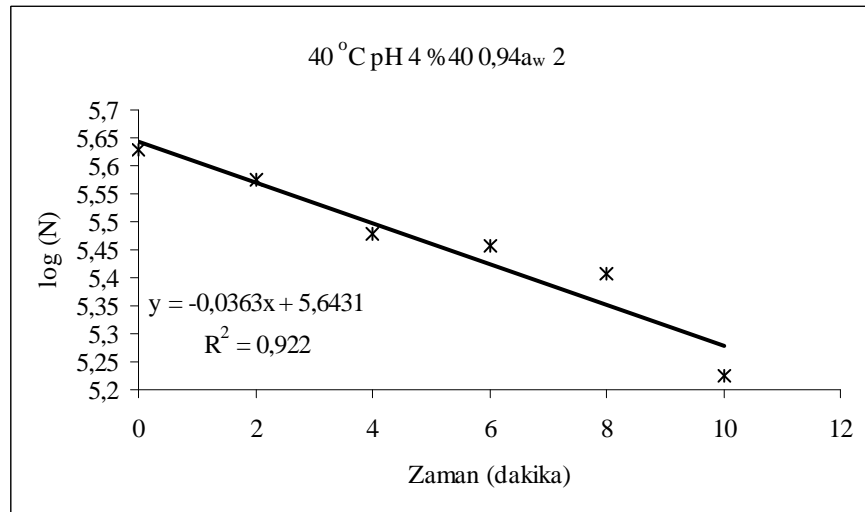
Şekil 3.13. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



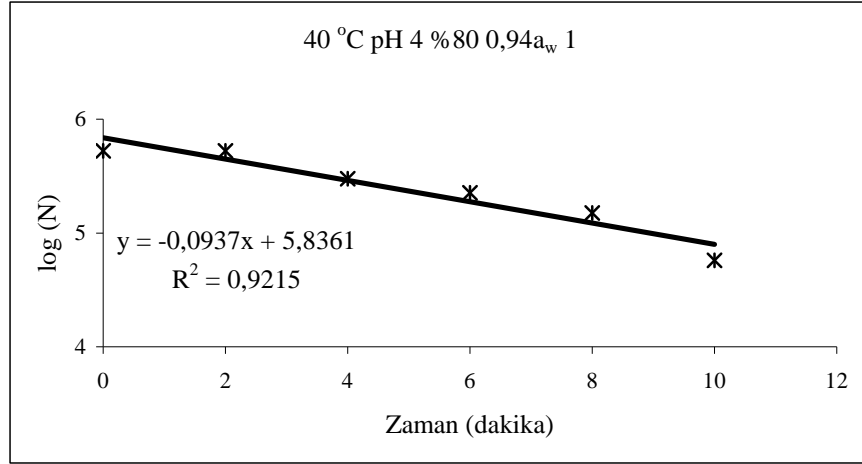
Şekil 3.14. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



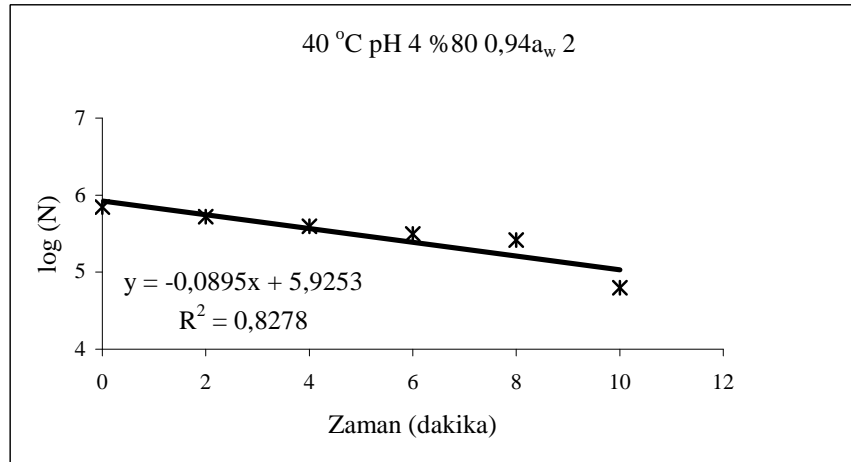
Şekil 3.15. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



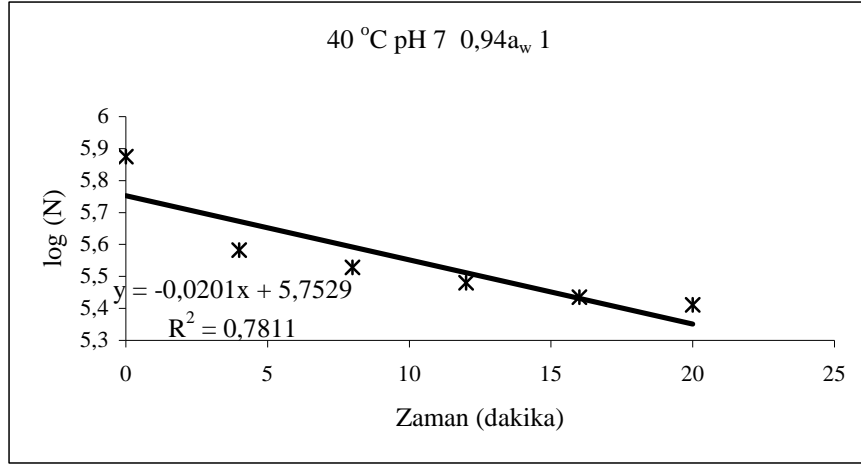
Şekil 3.16. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



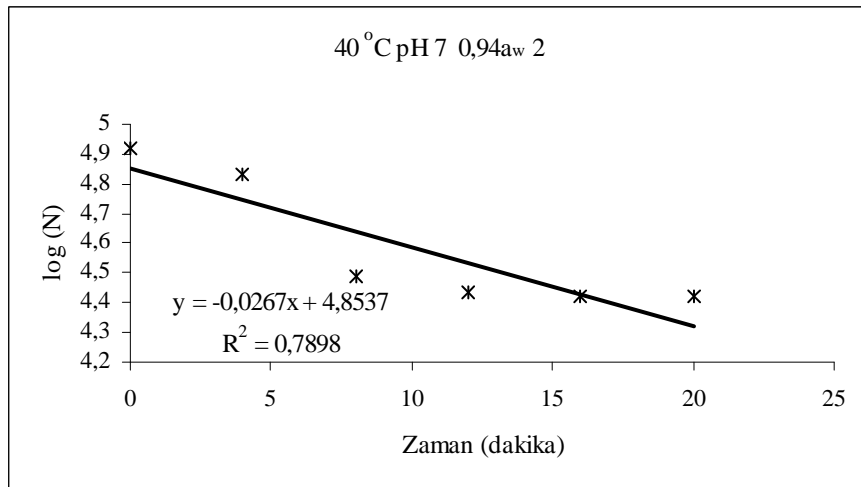
Şekil 3.17. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



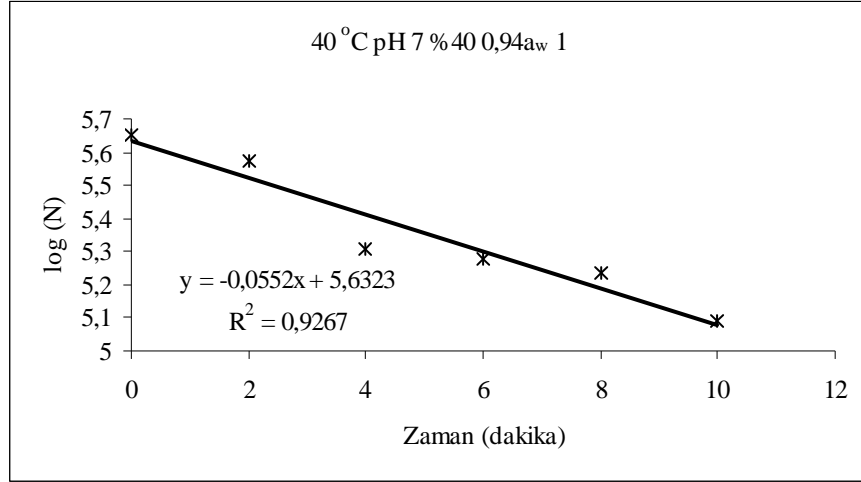
Şekil 3.18. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



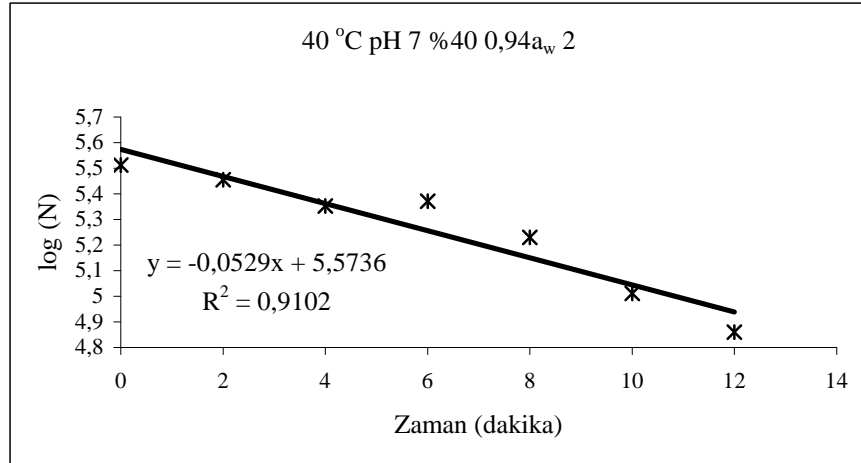
Şekil 3.19. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



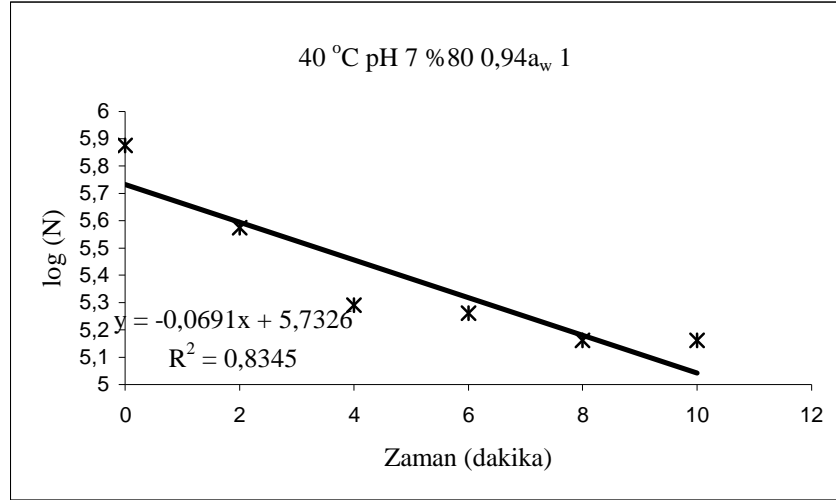
Şekil 3.20. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 40 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



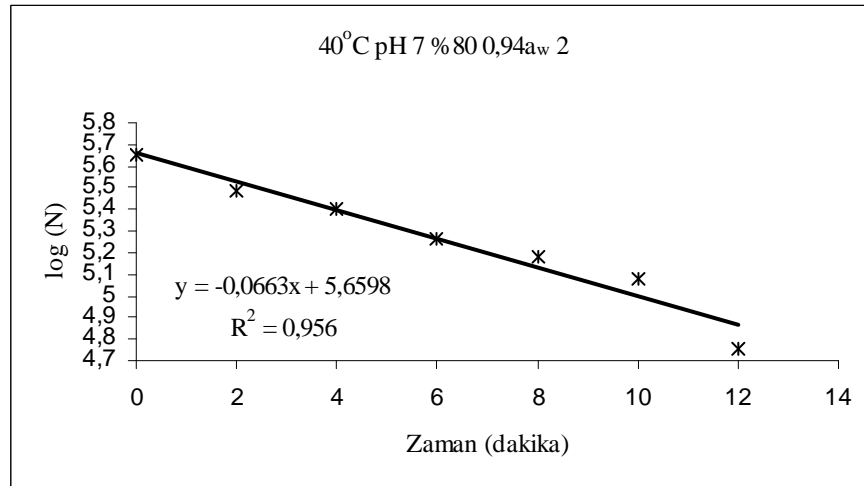
Şekil 3.21. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.22. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



Şekil 3.23. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.24. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 40 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

### 3.2. 45 °C’de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

45 °C’de iki farklı pH ve iki farklı  $a_w$  değerine sahip sitrat tamponunda % 40 ve % 80 sonikasyon düzeyinde yapılan uygulamalardan ve sonikasyonsuz uygulamalardan



elde edilen D değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. 45 °C’de yapılan tüm uygulamalara ait inaktivasyon grafikleri ise Şekil 3.25 - 3.47 arasında gösterilmiştir. 0.99 a<sub>w</sub>’de % 40 ve % 80 amplitüde yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri karşılaştırıldığında, amplitüd düzeyinin yüksek olduğu durumda D değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. 0.99 a<sub>w</sub>’ye sahip ortamda pH 4 ve 7’de, % 40 ve % 80 amplitüd arasındaki D değerleri karşılaştırıldığında birbirine yakın bulunmuştur. 0.94 a<sub>w</sub>’de, pH 4 ve 7’deki % 40 ve % 80 amplitüder arasındaki fark ise 0.99 a<sub>w</sub>’dekine göre daha fazladır.

45 °C’de yapılan sonikasyon uygulanmayan çalışmalarda sonikasyon uygulananlara göre çok daha yüksek D değerleri elde edilmiştir. pH 7, 0.99 a<sub>w</sub>’de ortalama D değerleri sonikasyonsuz çalışmada 12.23 iken %40 için 1.7, % 80 için 0.97 dak. olarak bulunmuştur. Aynı durum 0.94 a<sub>w</sub> için de geçerli olmuştur. Sonikasyon uygulanmayan çalışmalarda pH 4’deki D değerleri, pH 7’deki D değerlerinden daha fazla bulunmuş, *Z. rouxii* asit ortamda pH 7’ye oranla sıcaklığa daha dirençli olmuştur.

Sonikasyon uygulanmayan ve iki paralel halinde yapılan çalışmalar arasında önemli farklar bulunmaktadır. Bunun nedeni bölüm 3.1.’de açıklanmıştır.

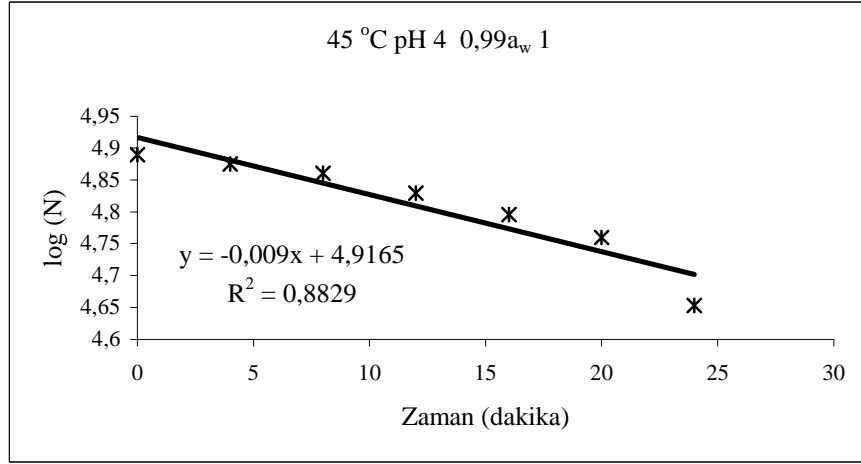
Benzer bir çalışmada Lopez-Malo ve Palou (2005), *Z. bailii*’nin sonikasyonla (20 kHz, 90µm) inaktivasyonunu, pH’sı 3.5 olan % 2’lik Sabouraud Glucose Broth’da, üç farklı a<sub>w</sub> değerinde (0.99, 0.97, 0.95) ve üç farklı sıcaklıkta (45, 50, 55 °C) belirlemiştir. 45 °C’deki termal uygulamalardan (TT) elde ettikleri D değerlerinin, termoultrasonikasyon (TUT) uygulamalarındakilere göre önemli düzeyde büyük olduğunu bildirmişlerdir (p<0.05). 45 °C’de, 0.99, 0.97 ve 0.95 a<sub>w</sub>’de TT ve TUT uygulaması sonucunda, D değerlerinin sırasıyla 15.4’den-7.4’e, 26.8’den-8.6’ya ve 43.5’den-12.9’a düştüğünü gözlemlemişlerdir. 45 °C, pH 4, 0.99 ve 0.94 a<sub>w</sub>’de yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz D değerleri bu çalışmayla karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda, pH 4’de 0.99 ve 0.94 a<sub>w</sub>’de, sadece sıcaklık uygulamalarından elde edilen D değerleri sırasıyla ortalama 98.66 ve 140.1 dak. olmuştur. Oysa aynı koşullarda sonikasyon yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri % 80 amplitüde (99.2 µm = 0.73 W/ml) 0.99 ve 0.94 a<sub>w</sub> için sırasıyla ortalama 0.58 ve 4.33 dak. olarak belirlenmiştir. İki çalışma arasında, ortamın a<sub>w</sub>’sinin düşüşüne bağlı olarak maya hücrelerinin sonikasyona ve termal uygulamalara olan direncinin artışı belirgindir. Ancak sonikasyon uygulamalarında bizim çalışmamızda elde edilen D değerleri daha kısadır. Bunun nedeni; çalışmamızda uygulanan sonikasyon şiddetinin daha yüksek

olması, sonikasyon ortamının farklı olması, kullanılan maya türünün farklı olması şeklinde açıklanabilir.

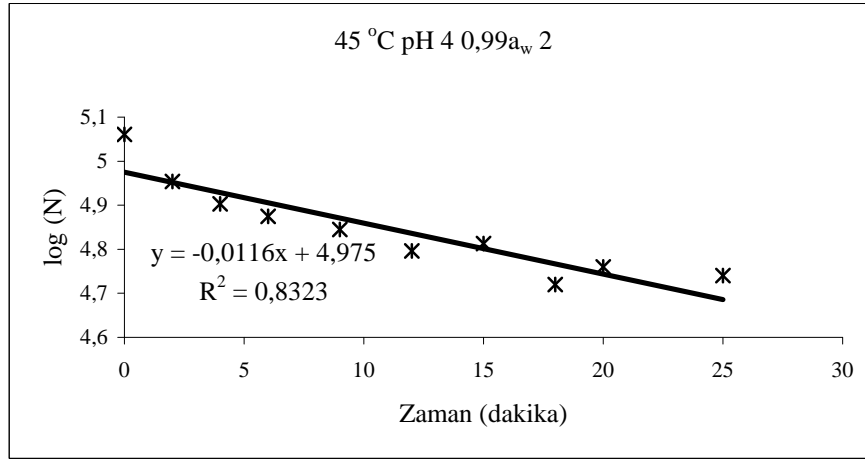
Çizelge 3.2. 45 °C, 0.99 ve 0.94 a<sub>w</sub>, pH 4 ve 7’de, sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri ve ortalamaları.

		Sonikasyon düzeyi	D değerleri (dakika)		
			1. deneme	2. deneme	ortalama
0.99 a <sub>w</sub>	pH 4	0	111.11	86.21	98.66
		40	1.34	1.51	1.42
		80	0.66	0.51	0.58
	pH 7	0	12.97	11.49	12.23
		40	1.66	1.74	1.7
		80	0.9	1.04	0.97
0.94 a <sub>w</sub>	pH 4	0	113.64	166.67	140.1
		40	10.59	13.62	12.10
		80	4.69	3.97	4.33
	pH 7	0	48.31	15.82	32.06
		40	8.67	–	–
		80	3.19	3.58	3.38

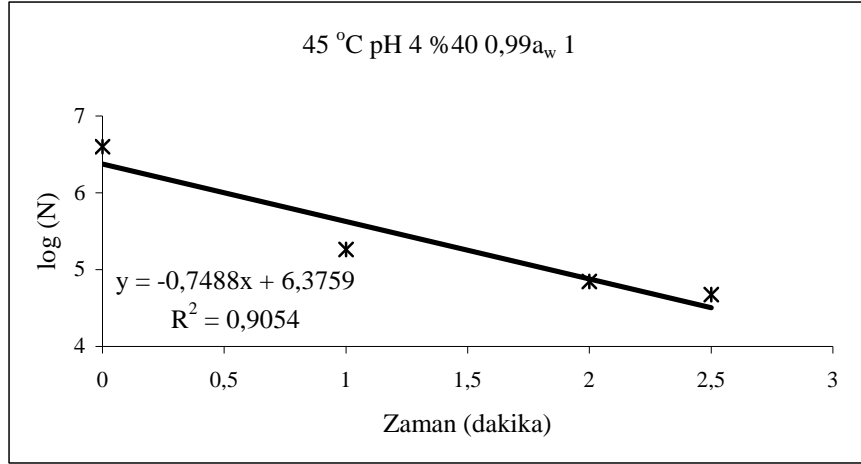
(-): İstatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.



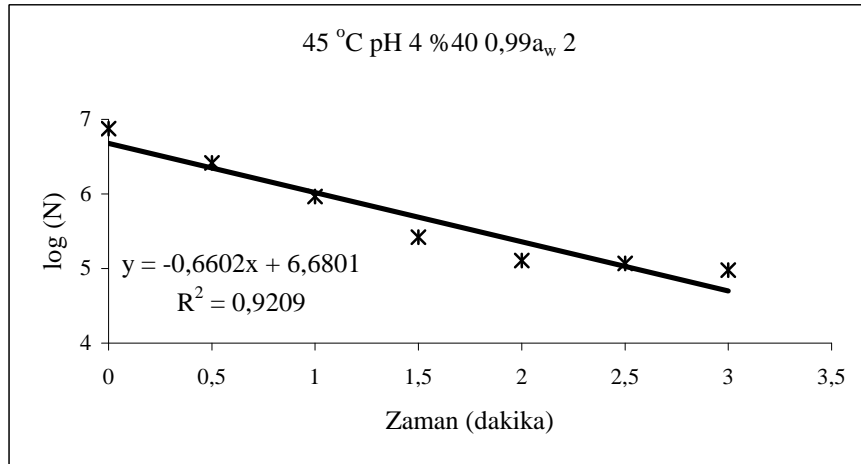
Şekil 3.25. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



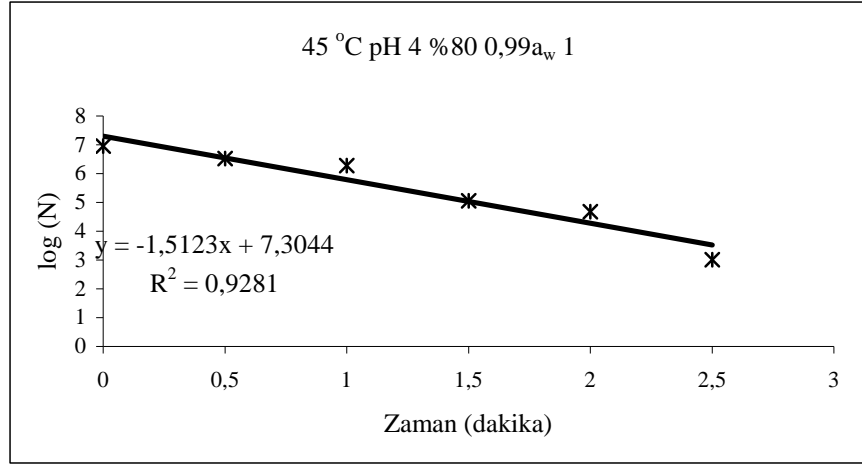
Şekil 3.26. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



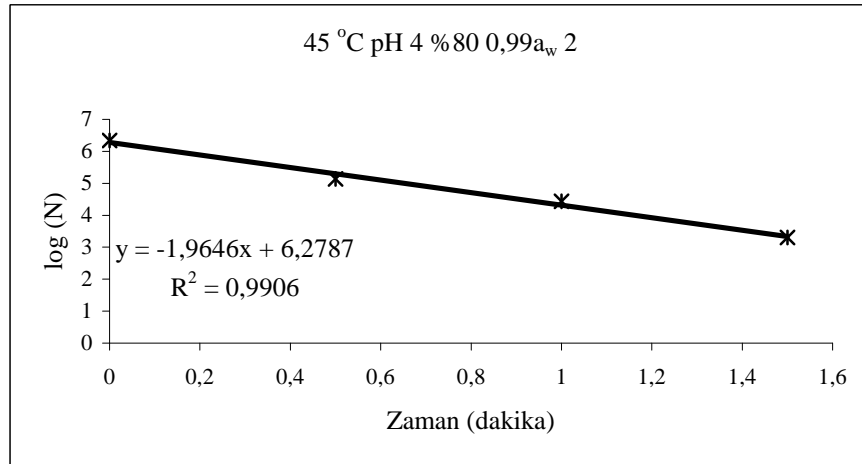
Şekil 3.27. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



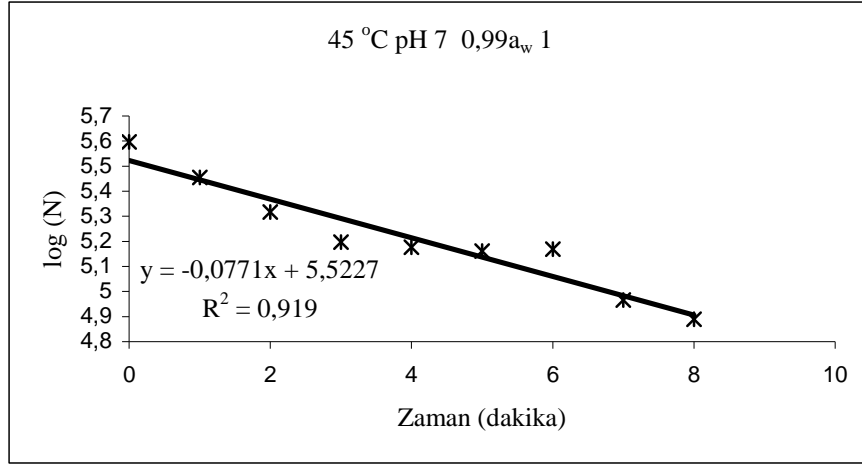
Şekil 3.28. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



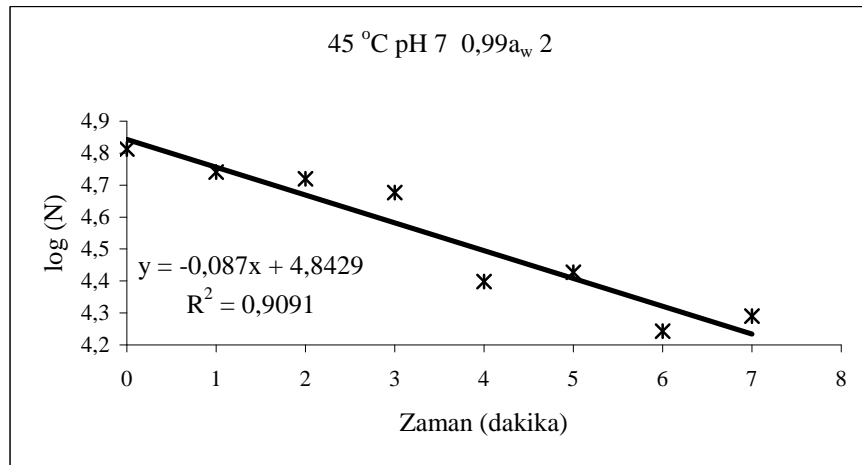
Şekil 3.29. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



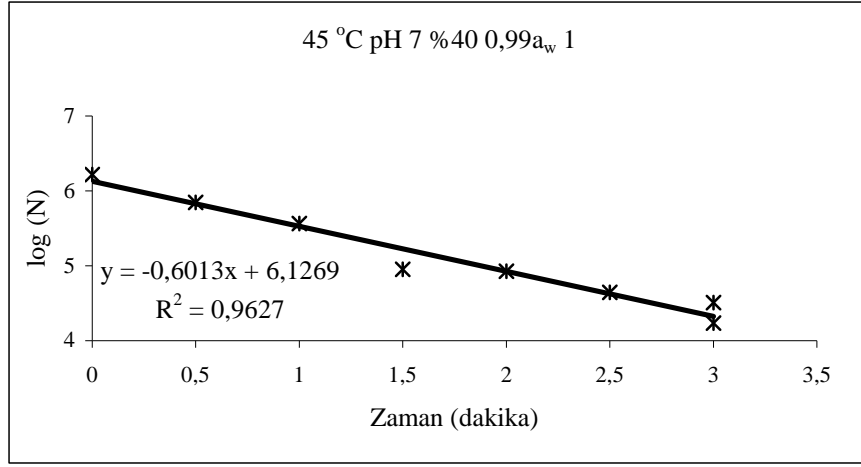
Şekil 3.30. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



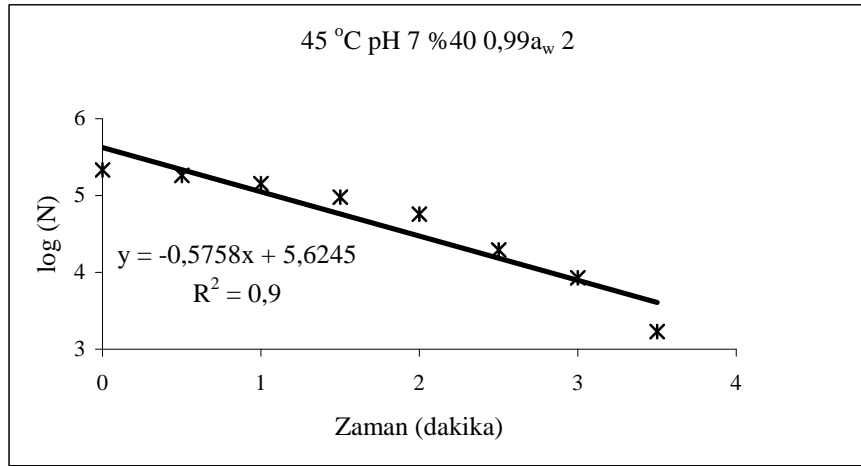
Şekil 3.31. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



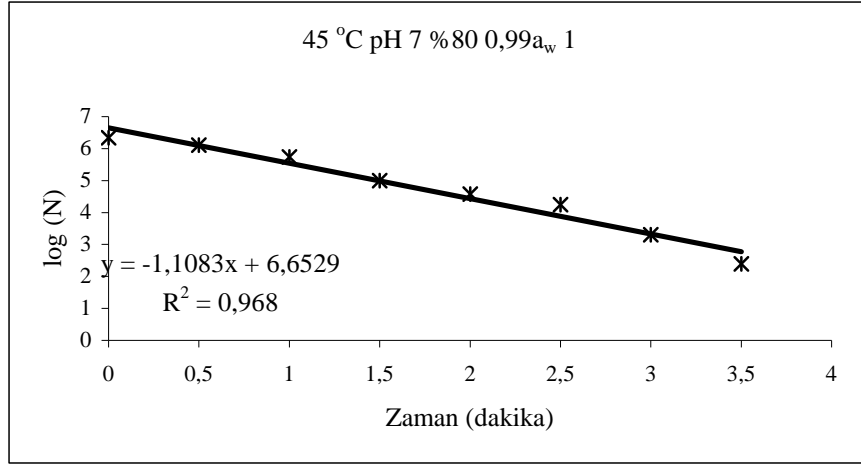
Şekil 3.32. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.99$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



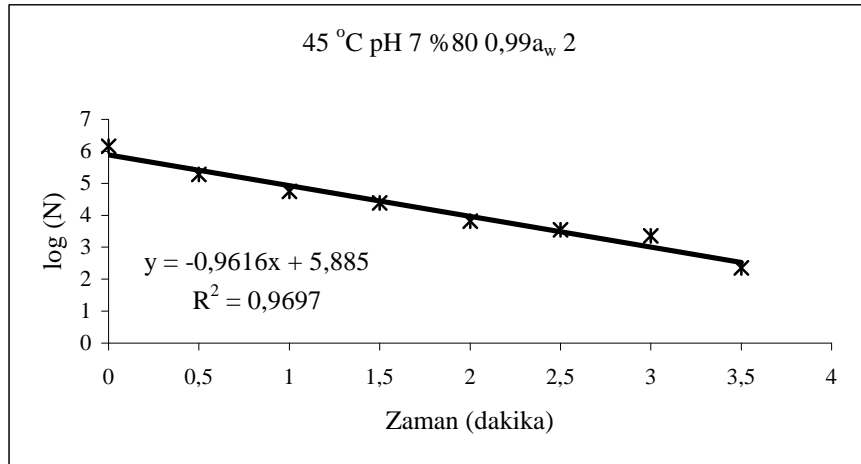
Şekil 3.33. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.34. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

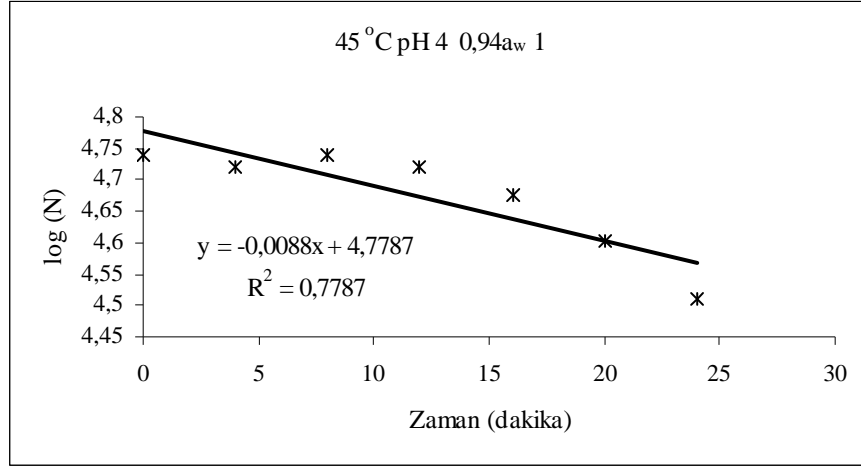


Şekil 3.35. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.

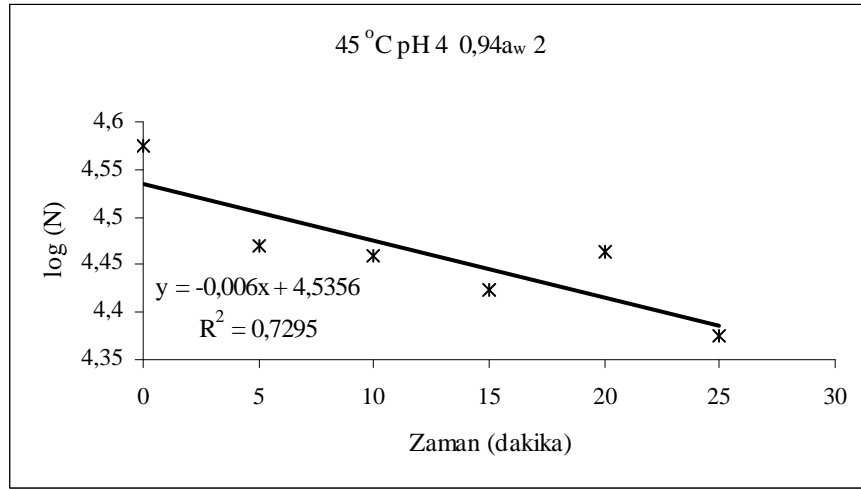


Şekil 3.36. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.99, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

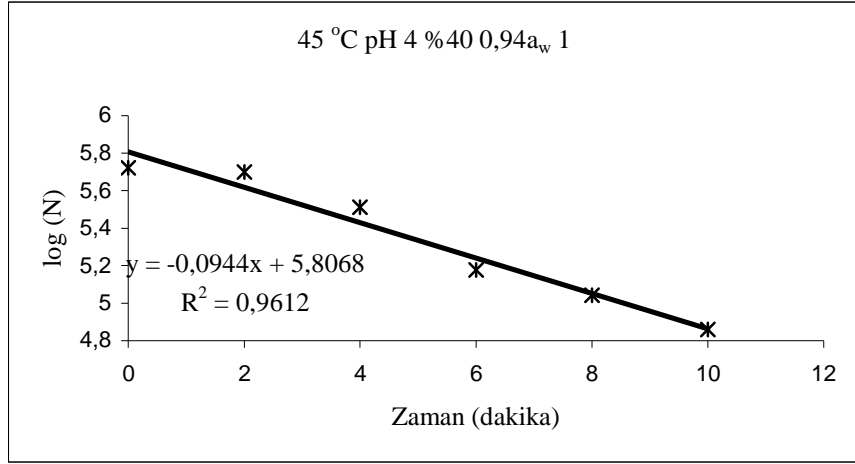




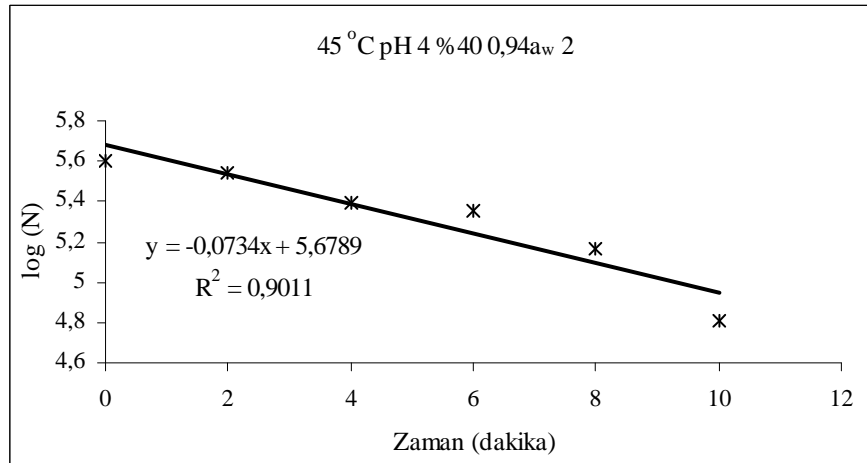
Şekil 3.37. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



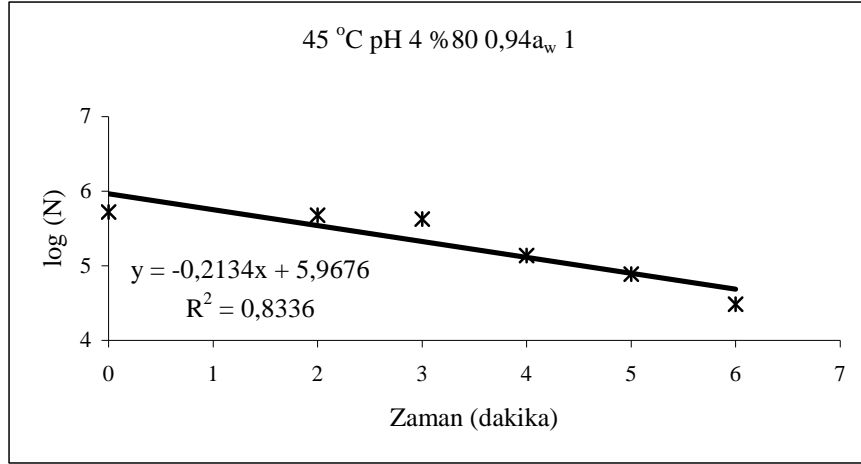
Şekil 3.38. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



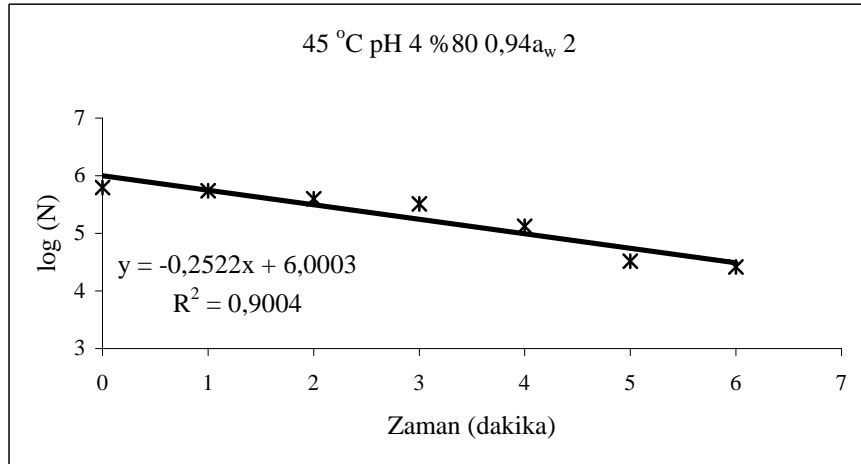
Şekil 3.39. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



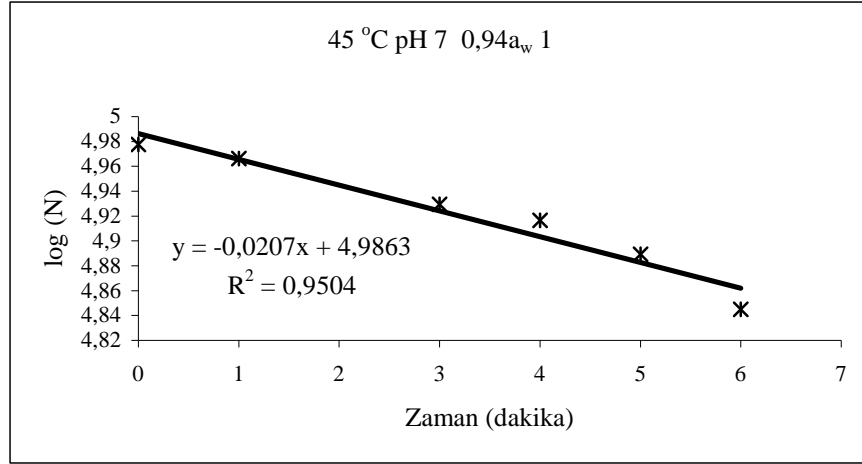
Şekil 3.40. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



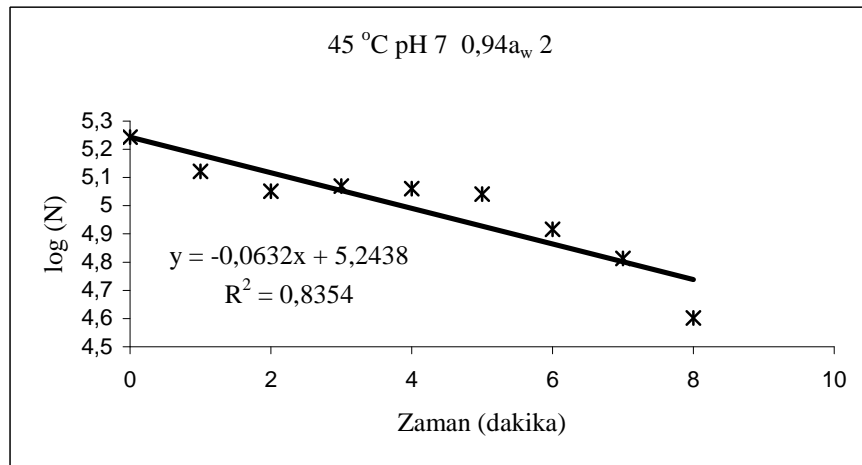
Şekil 3.41. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



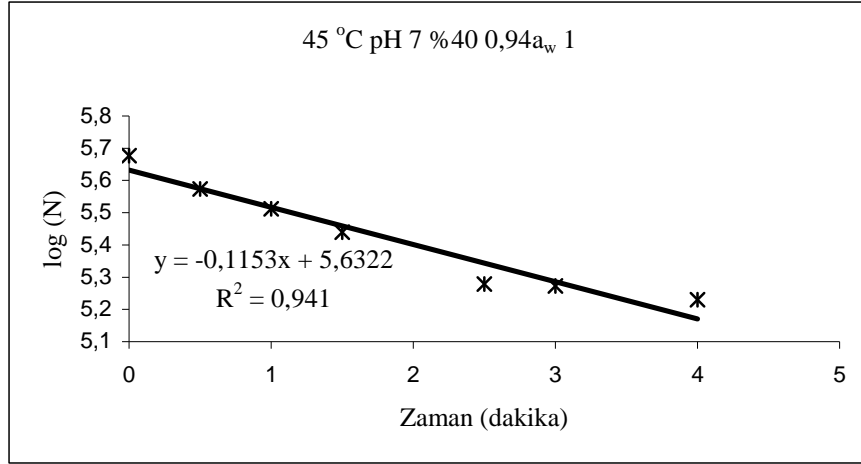
Şekil 3.42. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



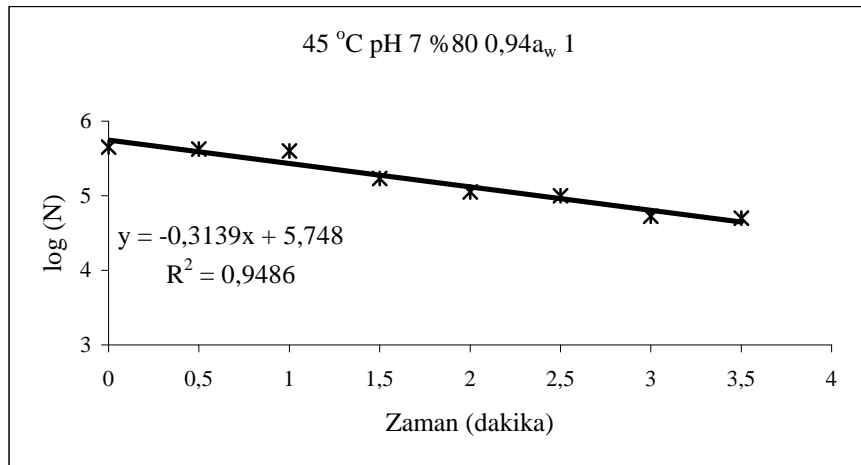
Şekil 3.43. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



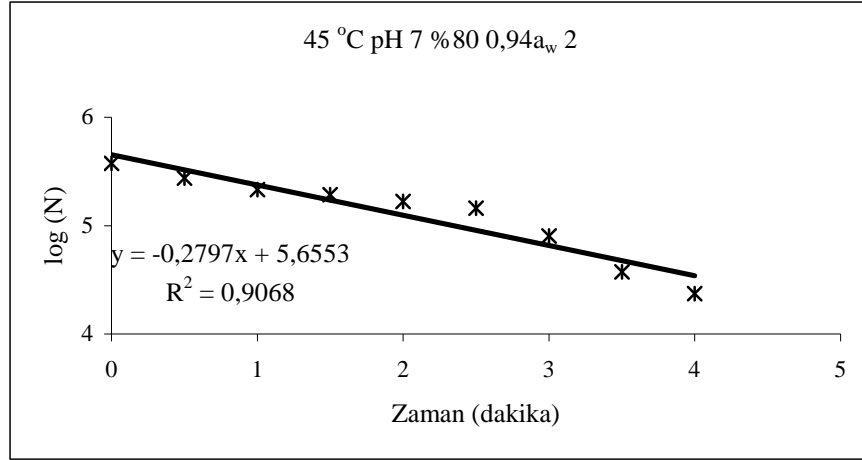
Şekil 3.44. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 45 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



Şekil 3.45. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w$  = 0.94, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.46. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w$  = 0.94, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.47. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 45 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

### 3.3. 50 °C’de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

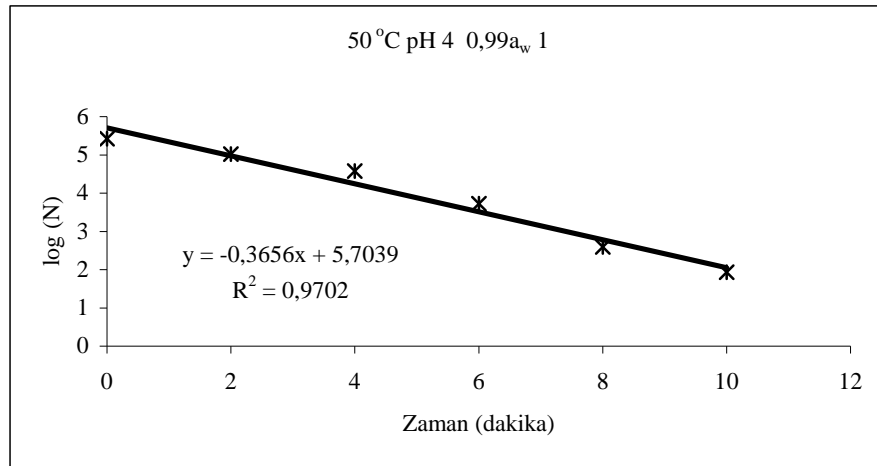
50 °C’de 0.94 a<sub>w</sub>’de pH 4 ve pH 7’de sonikasyon ve kontrol çalışmaları yapılmışken, 0.99 a<sub>w</sub>’de sadece pH 4’de yapılan çalışmalardan inaktivasyon eğrileri oluşturulmuştur. 0.99 a<sub>w</sub> pH 7’de yapılan sonikasyon uygulamalarından ise inaktivasyon eğrileri oluşturulamamıştır. Bunun nedeni, 0.99 a<sub>w</sub> pH 7’de yapılan çalışmalarda, bizim örnek alabilme sıklığımızdan daha kısa sürede hızlı bir inaktivasyon olmasıdır. 45 °C’de yapılan çalışma da göz önüne alınarak, pH 7’de ve 0.99 a<sub>w</sub>’de *Z. rouxii*’nin sonikasyon uygulamalarına daha hassas olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2.). Bu nedenle Çizelge 3.3’de sadece 0.99 a<sub>w</sub> de pH 4’e ait D değerleri verilmiştir. 50 °C’de yapılan tüm uygulamalara ait inaktivasyon grafikleri de Şekil 3.48 ve 3.64 arasında gösterilmektedir. Yaptığımız diğer sıcaklık değerlendirmelerinde olduğu gibi sonikasyon uygulamalı ve uygulamaz çalışmalardaki ortalama D değerlerindeki azalış burada da görülmektedir. 0.99 a<sub>w</sub>, pH 4 ile 0.94 a<sub>w</sub> pH 4 sonikasyon çalışmaları karşılaştırıldığında düşük su aktivitesi değerinde daha yüksek D değerleri elde edilmiştir. Örneğin; 0.99 a<sub>w</sub>, pH 4’de sonikasyonsuz, % 40 ve % 80 sonikasyon düzeylerindeki D değerleri sırasıyla, 2.74, 0.77 ve 0.63 dak. iken, 0.94 a<sub>w</sub>’de değerler, 17.86, 5.46 ve 2.54 dak. olmuştur. 0.94’lük su aktivitesi değerinde iki ayrı pH’da

yapılan çalışmalarda da *Z. rouxii* hücreleri pH 4’de 7’ye oranla sonikasyona daha dirençli çıkmıştır.

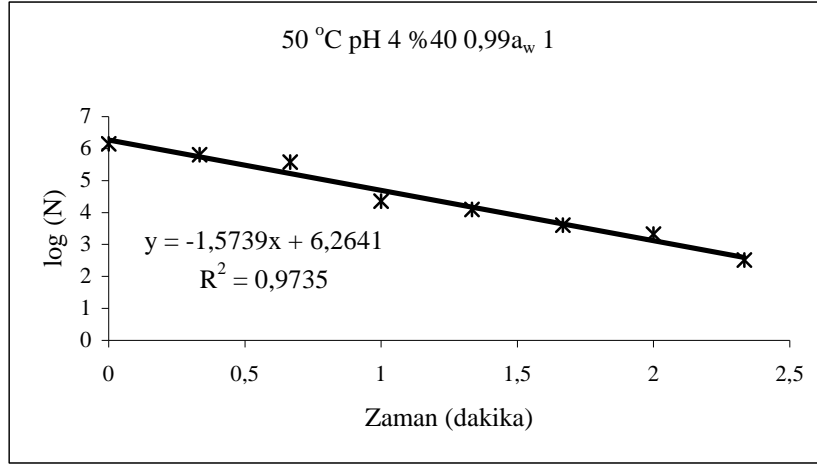
Çizelge 3.3. 50 °C, 0.99 a<sub>w</sub>, pH 4 ve 0.94 a<sub>w</sub> pH 4 ve 7’de sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri ve ortalamaları.

		Sonikasyon düzeyi	D değerleri (dakika)		
			1. deneme	2. deneme	ortalama
0.99 a <sub>w</sub>	pH 4	0	2.74	–	–
		40	0.64	0.91	0.77
		80	0.64	0.63	0.63
0.94 a <sub>w</sub>	pH 4	0	18.69	17.04	17.86
		40	5.04	5.88	5.46
		80	2.85	2.24	2.54
	pH 7	0	16.08	53.76	34.92
		40	3.50	3.04	3.27
		80	0.94	0.81	0.87

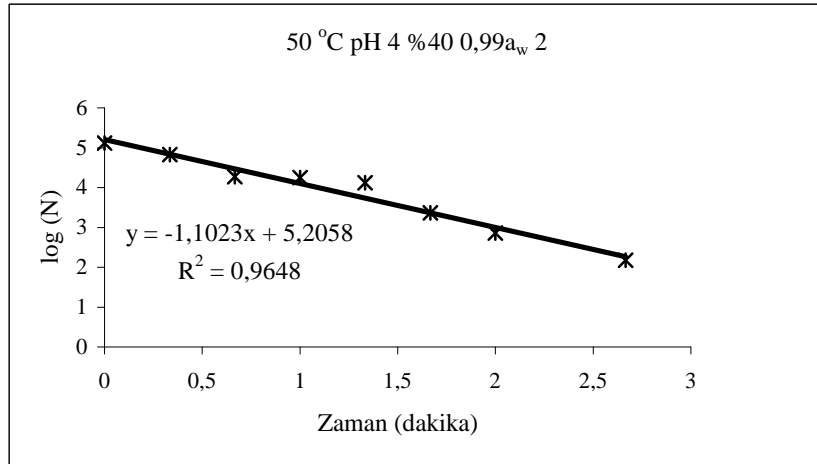
(-): İstatistiksel değeri alınmamıştır.



Şekil 3.48. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.99, 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.

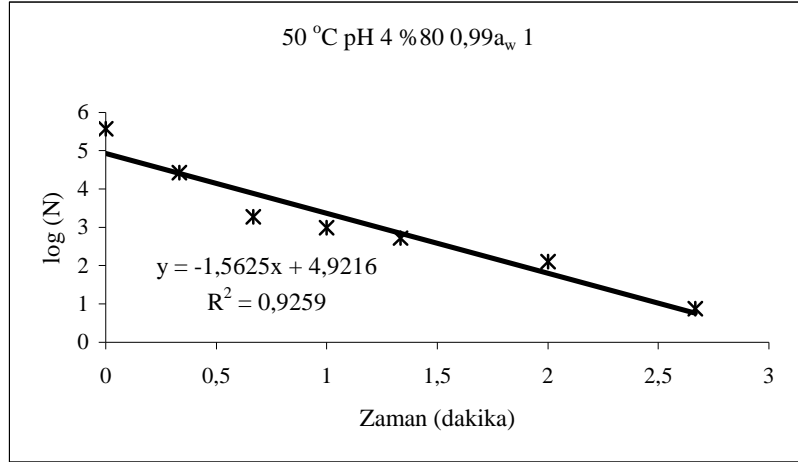


Şekil 3.49. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.

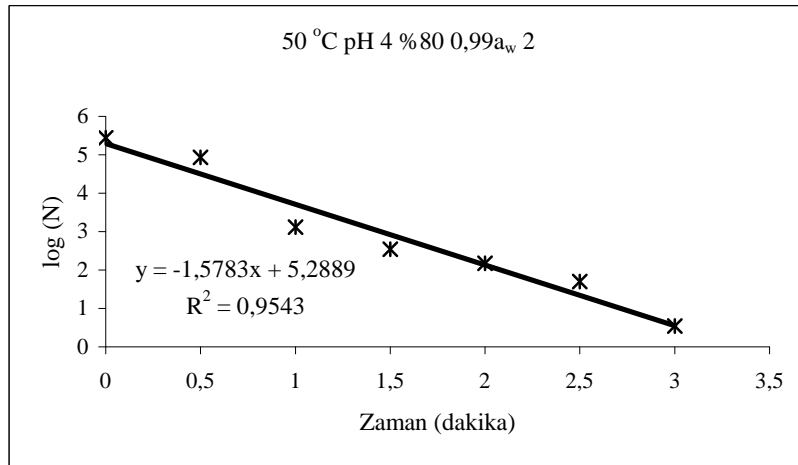


Şekil 3.50. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

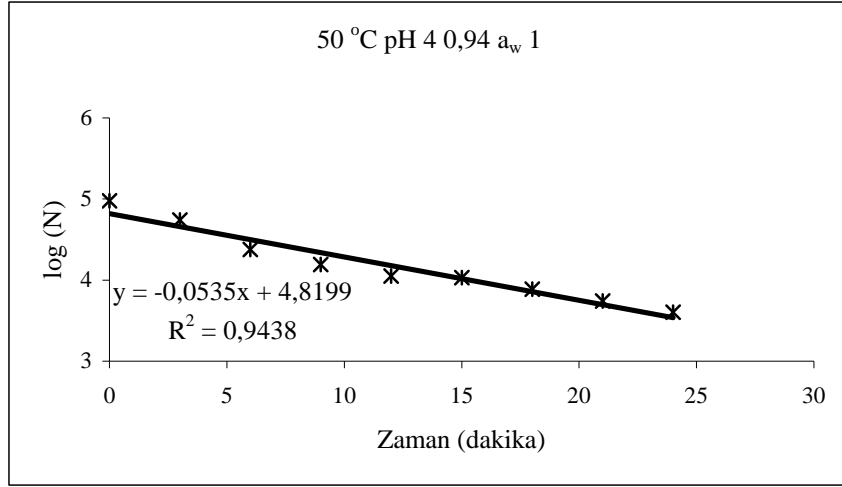




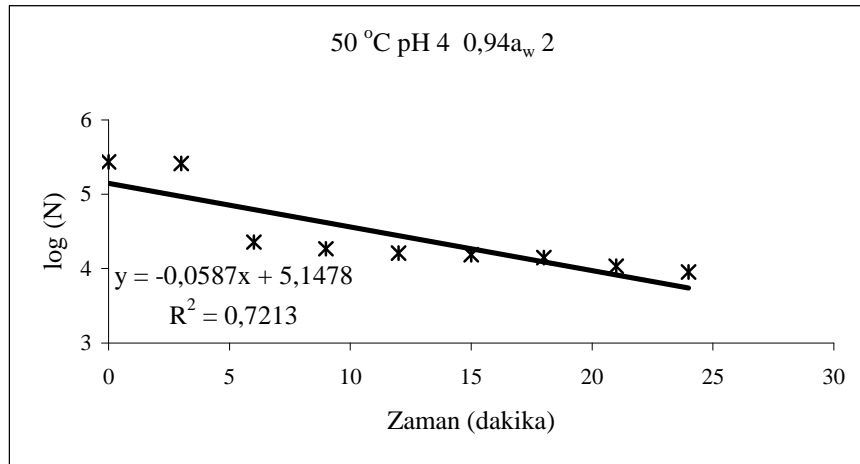
Şekil 3.51. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



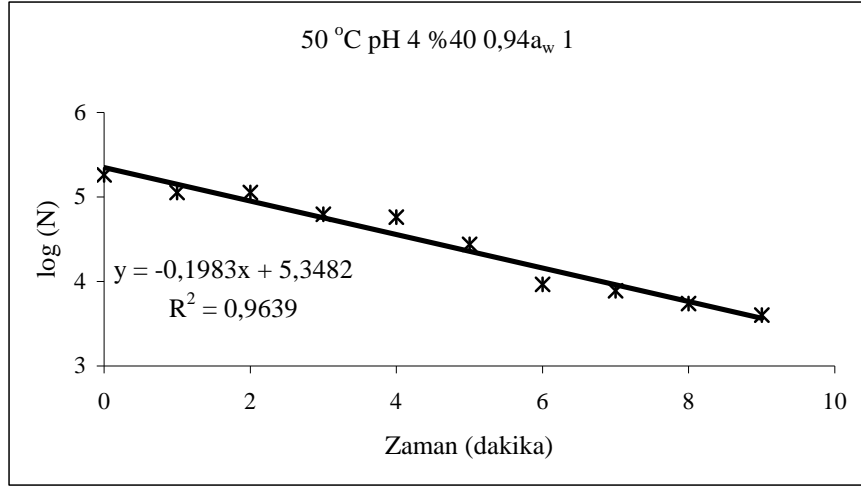
Şekil 3.52. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.99$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



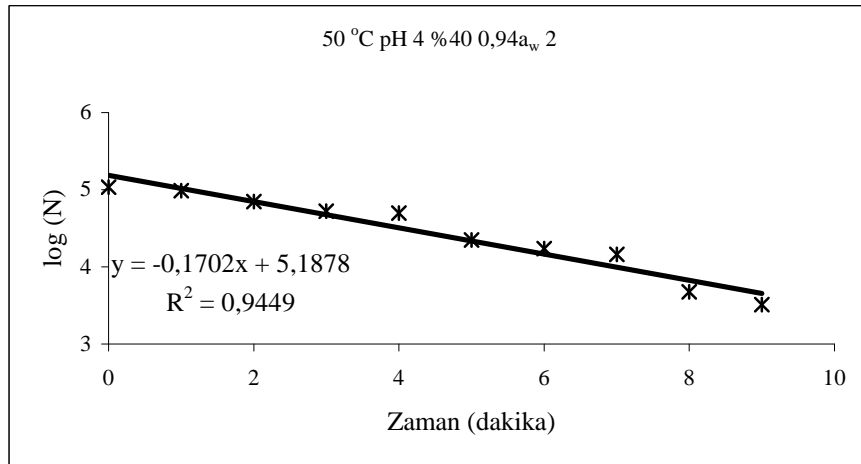
Şekil 3.53. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



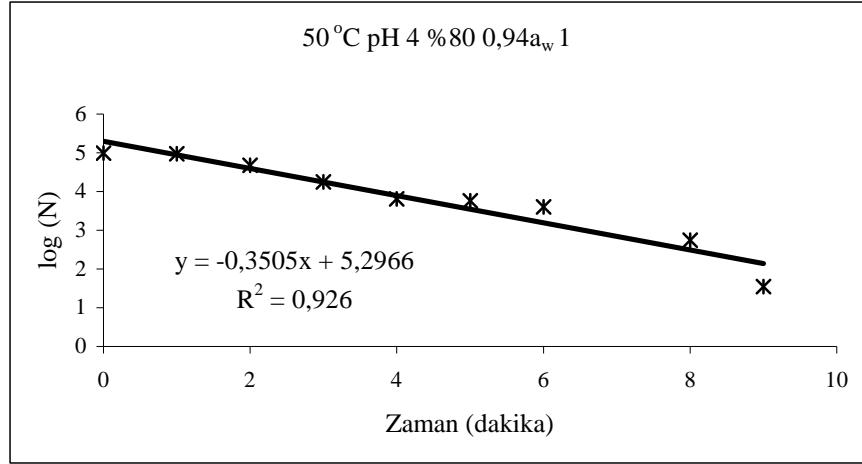
Şekil 3.54. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



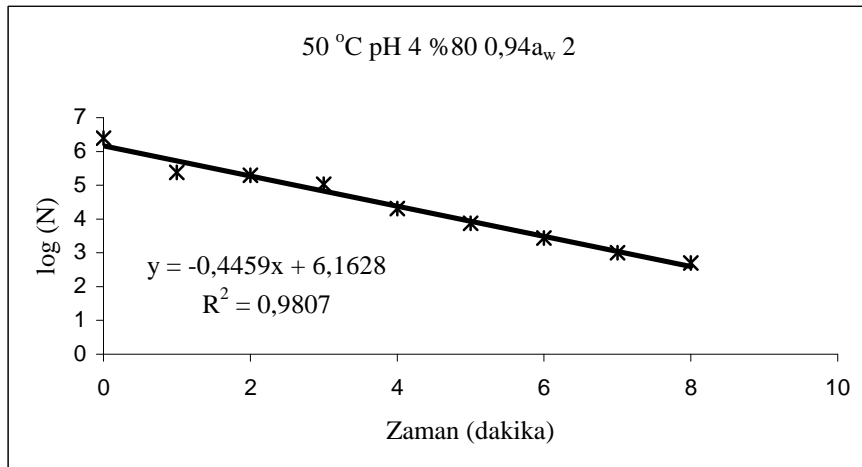
Şekil 3.55. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



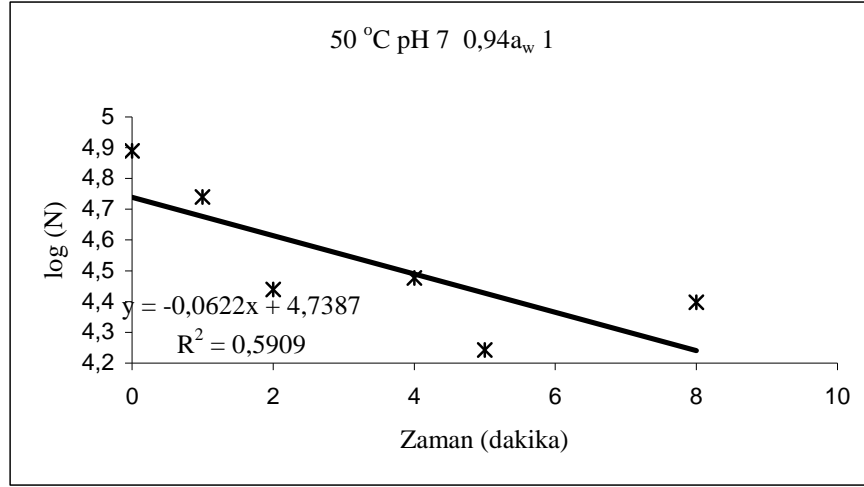
Şekil 3.56. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



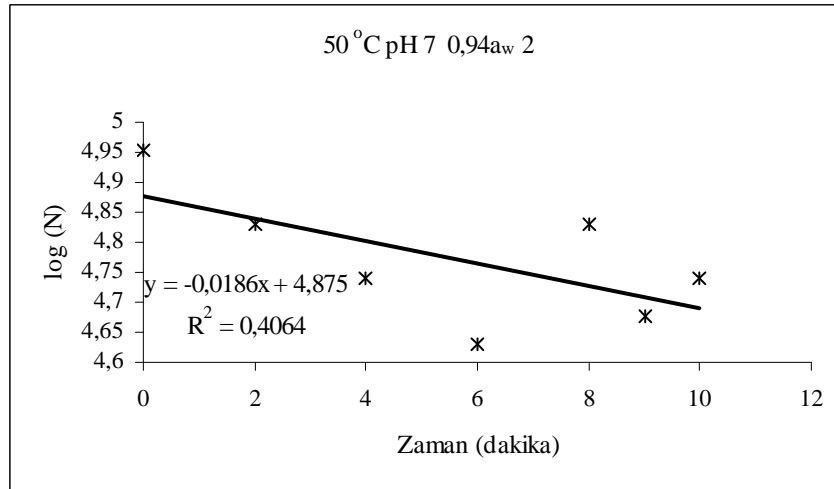
Şekil 3.57. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



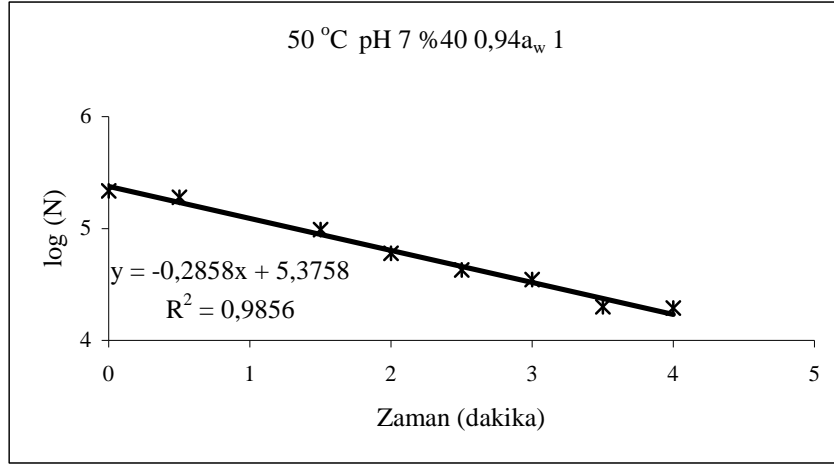
Şekil 3.58. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



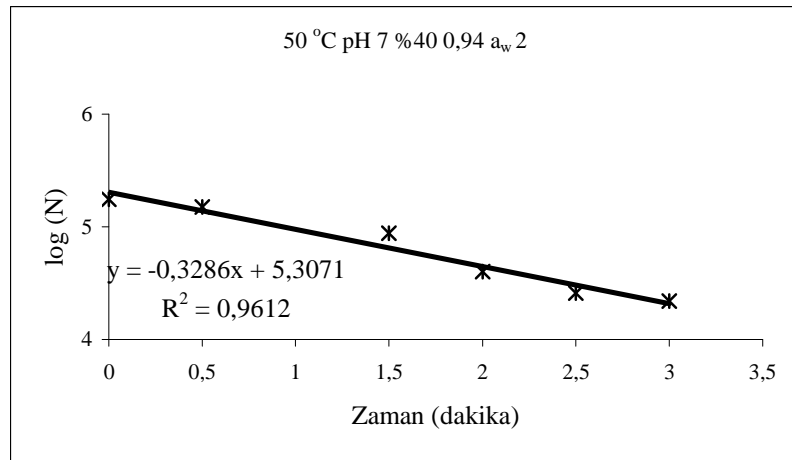
Şekil 3.59. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



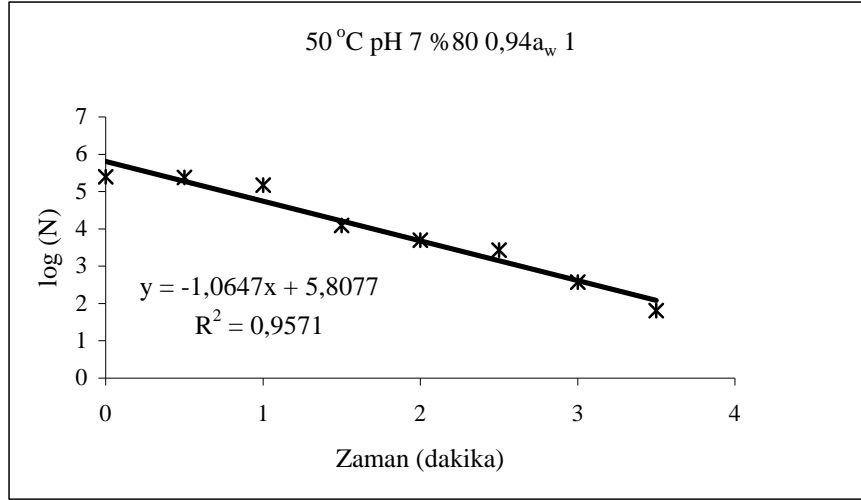
Şekil 3.60. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7, a<sub>w</sub> = 0.94, 50 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



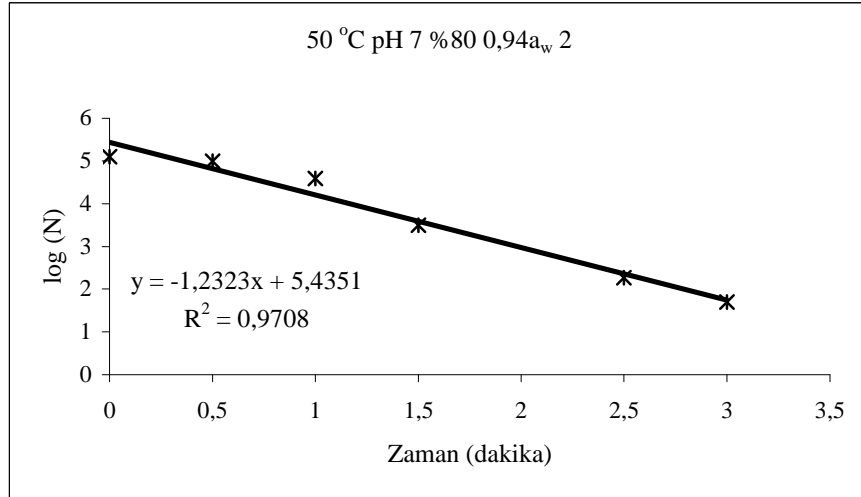
Şekil 3.61. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.62. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.



Şekil 3.63. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.64. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 50 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 2.

### 3.4. 55 °C’de Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

55 °C’deki çalışmalar sadece 0.94  $a_w$ ’deki ortamlarda gerçekleştirilmiştir, bunun nedeni, 0.99  $a_w$ ’deki ortamlarda 20 saniyeden daha kısa bir sürede tam bir inaktivasyon meydana gelmesidir. Kullanılan düzenek ve örnek alma olanakları, ancak 20 saniye’de bir örnek alınmasına olanak vermektedir. Bu nedenle çalışma sadece 0.94  $a_w$ ’de yapılmıştır (Çizelge 3.4). 55 °C’de yapılan tüm uygulamalara ait inaktivasyon grafikleri de Şekil 3.65 ve 3.70 arasında gösterilmektedir.

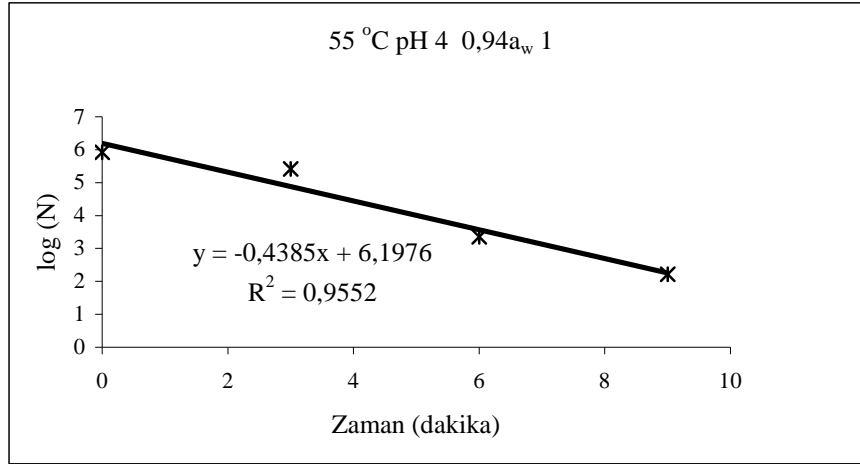
55 °C’de yapılan çalışmalarda pH 4 ve 7 arasında D değerleri açısından fark belirlenmemiştir. Aynı şekilde amplitüd düzeyinin artışı D değerlerinin düşüşü üzerinde etkili olmamıştır (% 40 için 0.22, % 80 için 0.18 dak.). 55 °C’deki termal uygulamalardan elde edilen D değerleri, 40-50 °C arasındaki termal uygulamalara oranla oldukça küçüktür. 55 °C’deki sonikasyon yapılan çalışmalardaki D değerlerindeki düşüşler pH ve  $a_w$  farkından etkilenmeksizin, aynı olmuştur. Yani 55 °C’de meydana gelen D değeri düşüşündeki asıl etken sıcaklık artışıdır, sonikasyonun D değerini azaltmadaki payı diğer uygulama sıcaklıklarına göre oldukça az olmuştur.

Benzer bir çalışmada Guerrero ve ark. (2001), 20 kHz, 71.4 - 107.10  $\mu\text{m}$  arasında değişen amplitüd düzeylerinde, pH’sı 3 ve 5.6’ya ayarlanmış Sabouraud broth’ta 35, 45, 55 °C’lerde *S. cerevisiae* inaktivasyonunu çalışmışlardır. Çalışmamızdaki bulgulara benzer olarak, 55 °C’de D değerlerinin diğer uygulama sıcaklıklarıyla (35 ve 45 °C) karşılaştırıldığında önemli düzeyde ( $p < 0.05$ ) azaldığını, ancak sonikasyonun bu azalmada etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada elde ettikleri D değerleri; 71.4  $\mu\text{m}$  (% 60) için pH 3 ve 5.6’da sırasıyla 0.6 ve 4.3 dak., 83.3  $\mu\text{m}$  (% 70) için 1 ve 2.1 dak., 95.2  $\mu\text{m}$  (% 80)’de 1.7 ve 1.9 dak. ve 107.1  $\mu\text{m}$  (% 90)’de ise 1.7 ve 1.3 dak. olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak pH ve amplitüd düzeyi değişiminin D değerleri üzerine etkisi önemsiz bulunurken, burada asıl öldürücü etkenin sıcaklık olduğunu rapor etmişlerdir

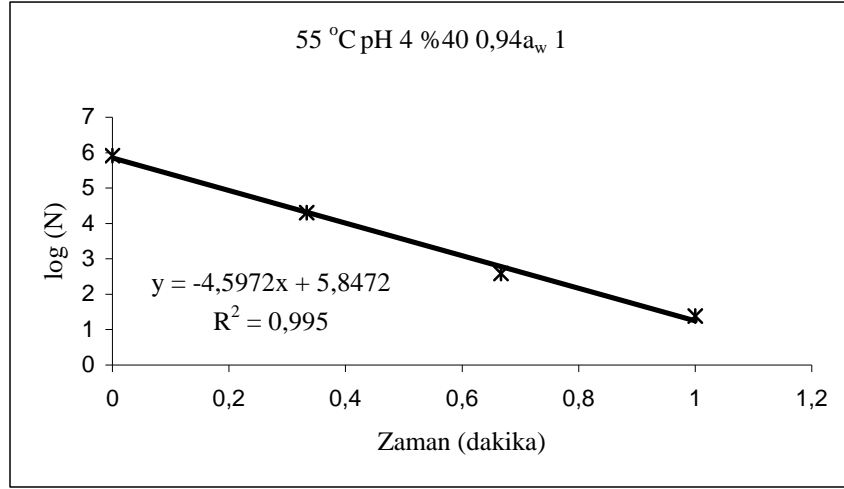


Çizelge 3.4. 55 °C, pH 4 ve 7, 0.94 a<sub>w</sub>'de sonikasyonsuz, %40 sonikasyon, %80 sonikasyon uygulamalarından elde edilen D-değerleri.

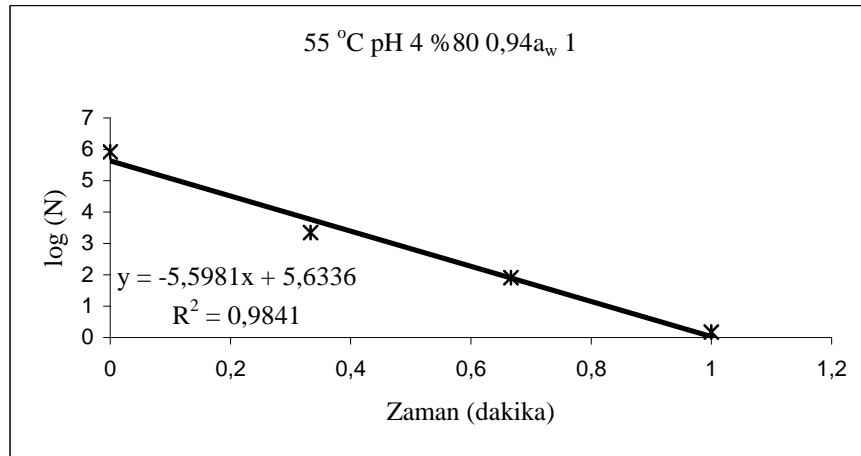
		Sonikasyon düzeyi	D değeri (dak.)
0.94 a <sub>w</sub>	pH 4	0	2.28
		40	0.22
		80	0.18
	pH 7	0	2.57
		40	0.22
		80	0.18



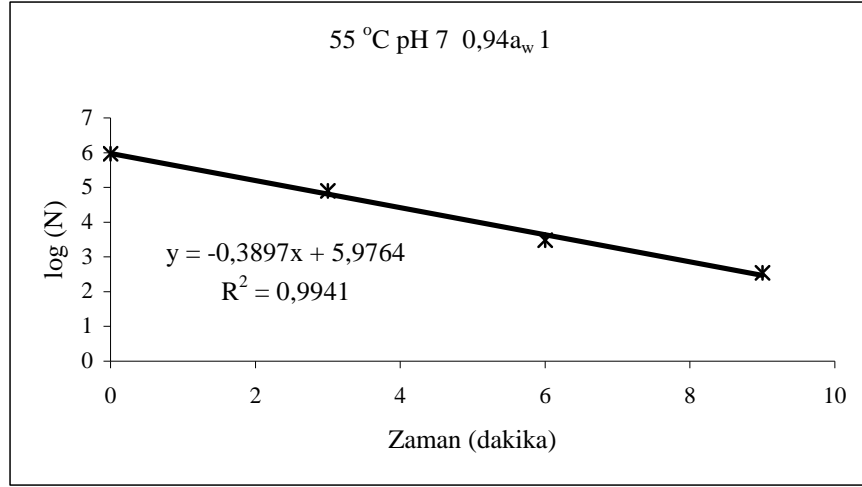
Şekil 3.65. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 55 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



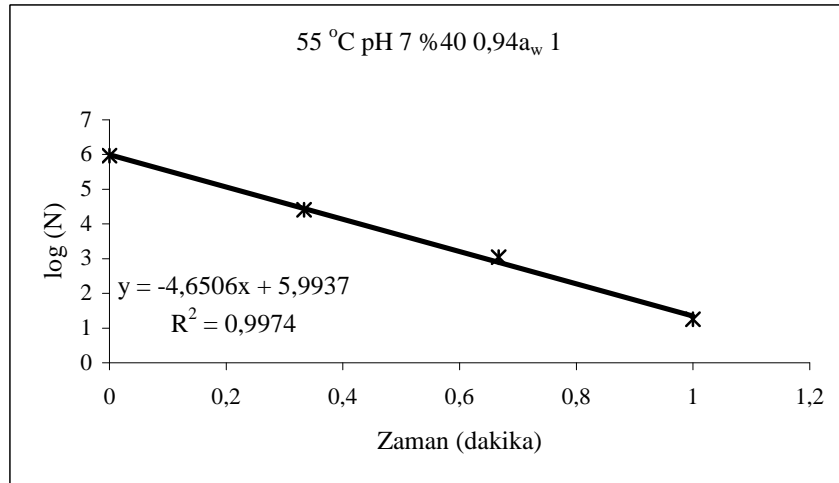
Şekil 3.66. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



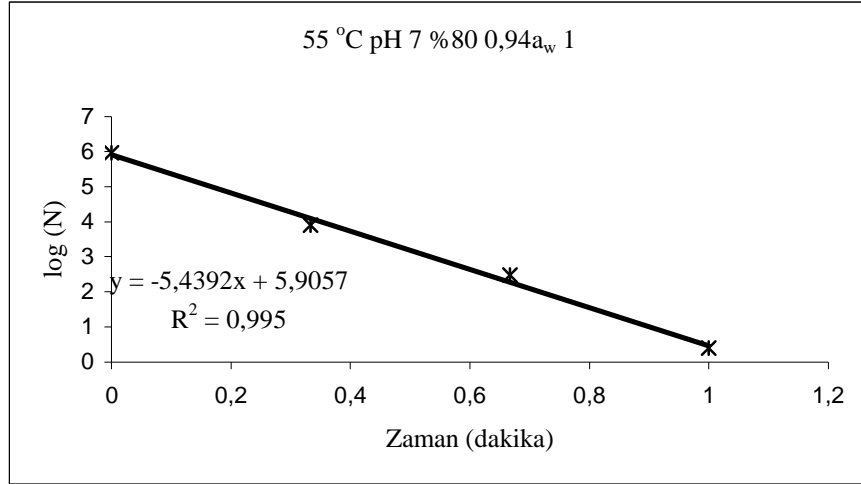
Şekil 3.67. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =4, a<sub>w</sub> = 0.94, 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.68. Sonikasyonsuz (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan kontrol grubu çalışmasından elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.69. % 40 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.



Şekil 3.70. % 80 amplitüd düzeyinde (sitrat tamponu pH =7,  $a_w = 0.94$ , 55 °C) yapılan sonikasyondan elde edilen inaktivasyon grafiği 1.

### 3.5. *Z. rouxii*'nin İnaktivasyonunda D Değerleri Üzerine ; Sonikasyon Şiddeti, pH, $a_w$ ve Sıcaklığın Etkisinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Sonikasyon yapılan ve yapılmayan durumlarda, *Z. rouxii* inaktivasyonu üzerine farklı ortam koşullarının etkisi belirlenmiştir. Bu etkiler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve aşağıda tek tek ele alınmıştır.

#### 3.5.1. Sonikasyonun D değerleri üzerine etkisi

% 40 ve % 80 amplitüdde yapılan sonikasyonlu ve ultrasound uygulanmayan çalışmalardan (kontrol grubu çalışmaları) elde edilen D değerlerinin ortalaması; sıcaklık, pH ve  $a_w$  farkı gözetilmeksizin hesaplanmıştır. Buna göre, kontrol çalışmalarında D değerleri ortalama 65.1 dak. iken, % 40 sonikasyon uygulanan çalışmalarda bu değer ortalama 6.4 dakikaya inmiştir. Sonikasyon uygulamasının şiddeti arttığında ise ortalama D değeri neredeyse yarıya inmiştir (3.6 dak.) (Çizelge 3.5). Sonikasyon düzeyleri birbirleriyle karşılaştırıldığında % 40 ve % 80 sonikasyon şiddetinde yapılan uygulamalar arasında önemli bir istatistiki fark gözlenmemiştir

( $p>0.05$ ). Sonikasyon yapılan ve yapılmayan çalışmalarda, *Z. rouxii* için belirlenen D değerleri arasında oldukça önemli ( $p=0.000$ ) farklar meydana gelmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. Farklı sonikasyon düzeyinde yapılan ve sonikasyon yapılmayan çalışmalardan elde edilen ortalama D değerleri.

	Çalışma sayısı	Ortalama D değeri(dak)	Standart sapma	Standart hata	%95 Güvenilirlik aralığı		En küçük değer	En yüksek değer
					Alt sınır	Üst sınır		
0	23	65,10	60,81	12,68	38,80	91,40	2,28	192,31
40	23	6,44	7,34	1,53	3,26	9,62	,22	27,55
80	24	3,59	4,48	,91	1,70	5,49	,18	15,08
Toplam	70	24,74	44,86	5,36	14,04	35,44	,18	192,31

Çizelge 3.6. Farklı sonikasyon şiddetlerinin birbirleriyle karşılaştırılması ve D'ye bağlı değişkenlik.

Sonikasyon düzeyleri	Ortalama D değerleri(dak)	Standart hata	Önemlilik	%95 Güvenilirlik aralığı		
				Alt sınır	Üst sınır	
0	40	58,66 (*)	10,37	,000	37,94	79,38
	80	61,50 (*)	10,27	,000	41,00	82,00
40	0	-58,66 (*)	10,37	,000	-79,38	-37,94
	80	2,84	10,27	,783	-17,65	23,34
80	0	-61,50 (*)	10,27	,000	-82,00	-41,00
	40	-2,84	10,27	,783	-23,34	17,65

\* Önemlilik düzeyi  $p<0.05$

### 3.5.2. Su aktivitesinin D değerleri üzerine etkisi

0.99 ve 0.94  $a_w$ 'de yapılan tüm çalışmalardan elde edilen D değerlerinin ortalamaları; sıcaklık, pH ve sonikasyon yapıp yapılmadığı gözetilmeksizin Çizelge 3.7'de verilmiştir. Düşük su aktivitesinde (0.94  $a_w$ ) yapılan çalışmaların ortalama D değerleri, yüksek  $a_w$ 'de (0.99  $a_w$ ) yapılanlardan daha büyük olmuştur. Aynı sıcaklık ve

pH düzeyi eşleşmeyen uygulamalar çıkarıldıktan sonra, (55 °C çıkarılmıştır) elde edilen D değerleri ortalamaları Çizelge 3.8’de verilmiştir. Çizelgeye göre düşük su aktivitesinin D değerlerini büyüttüğü ve dolayısıyla sonikasyonun inaktive edici etkisini önemli düzeyde azalttığı söylenebilir.

İki farklı  $a_w$ ’deki ortamlarda yapılan termal uygulamalar ve sonikasyon uygulamalarındaki D değerleri arasında önemli ( $p=0.007$ ) bir fark meydana gelmiştir, düşük  $a_w$ ’de D değerleri büyümüşür (Çizelge 3.9).

İki farklı  $a_w$ ’de yapılan tüm kontrol grubu çalışmalarda (pH ve sıcaklık farkı gözletilmeksizin)  $a_w$ , D değerleri üzerinde önemli ( $p=0.004$ ) bir etken olmuştur. Oysa, sonikasyonun iki farklı  $a_w$ ’de yapıldığı çalışmalarda (pH ve sıcaklık farkı gözletilmeksizin) D değerleri arasında önemli fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Farklı  $a_w$ ’lerdeki ortamlara sonikasyon uygulaması sonucu elde edilen D değerleri üzerine, pH’ın önemli bir faktör olduğu da ( $p=0.016$ ) belirlenmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.7. Yapılan tüm  $a_w$  çalışmalarının ortalama D değerleri.

$a_w$	Ortalama D değeri (dak)	Çalışma sayısı	Standart sapma
94	27,30	41	48,28
99	21,11	29	40,08
Toplam	24,74	70	44,86

Çizelge 3.8. Aynı sıcaklık, pH düzeyleri eşleşmeyen uygulamalar çıkarıldıktan sonra hesaplanan ortalama D değerleri (55 °C hariç).

		Ortalama D değeri (dak)	Çalışma sayısı	Standart sapma	Standart hata
Çift 1	D94	36,38	28	55,54	10,496
	D99	21,80	28	40,64	7,68

Çizelge 3.9. İki farklı  $a_w$  değerinde aynı sıcaklık ve pH’da yapılan uygulamalar eşleştirilerek yapılan istatistiksel değerlendirme.

		Çiftler arasındaki farklılıklar				t	Serbestlik derecesi	Önemlilik	
		Ortalama D değeri(dak)	Standart sapma	Standart hata	%95 Güvenilirlik aralığı				
					Alt sınır	Üst sınır			
Çift 1	D94 -D99	14,59	26,66	5,04	4,24	24,92	2,89	27	,007

### 3.5.3. Ortam pH’sının D değerleri üzerine etkisi

pH 4 ve 7’de yapılan sonikasyonlu ve sonikasyon uygulanmayan çalışmalardan elde edilen D değerlerinin ortalaması, sıcaklık ve  $a_w$  farkı gözetilmeksizin hesaplanmıştır (Çizelge 3.10). pH 4 ve pH 7’de yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri sırasıyla 39.26 ve 15.42 dak. olarak belirlenmiştir. Buna göre *Z. rouxii*’nin pH 4’de uygulamalara daha dirençli olduğu söylenebilir. Çizelge 3.11’de ise pH 4 ve pH 7’de yapılan çalışmaların D değerleri üzerindeki etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve *Z.rouxii*’nin pH 7’deki uygulamalara (sonikasyon uygulamalı ve uygulamaz) gösterdiği duyarlılık farkı önemli bulunmuştur ( $p=0.012$ ).

Çizelge 3.10. pH 4 ve 7’de yapılan tüm çalışmalardan elde edilen ortalama D değerleri

		Ortalama D değeri (dak)	Çalışma sayısı	Standart sapma	Standart hata
Çift 1	D4	39,26	31	61,62	11,06
	D7	15,42	31	20,30	3,64

Çizelge 3.11. Farklı pH'larda yapılan uygulamaların D değeri üzerine etkisini gösteren istatistiksel değerlendirme.

		Çiftler arasındaki farklılıklar				t	Serbestlik derecesi	Önemlilik	
		Ortalama D değeri (dak)	Standart sapma	Standart hata	%95 Güvenilirlik aralığı				
					Alt sınır	Üst sınır			
Çift 1	D4 - D7	23,83	49,49	8,88	5,68	41,98	2,68	30	,012

#### 3.5.4. Sıcaklığın D değerleri üzerine etkisi

Çalışmada dört farklı sıcaklıkta sonikasyon uygulaması ve paralelinde aynı sıcaklıkta sonikasyonsuz kontrolleri yapılmıştır. pH ve  $a_w$  farkı gözetilmeksizin, yapılan tüm sıcaklık uygulamalarından elde edilen D değerleri belirlenmiştir ve Çizelge 3.12 'de verilmiştir. Uygulama sıcaklığı 40 °C'den 55 °C'ye yükseldiğinde D değeri yaklaşık 40 kat azalmıştır. Sonikasyon işleminin farklı sıcaklıklarda yapılmış olması *Z. rouxii* inaktivasyonu üzerinde önemli etkiye sahiptir ( $p=0.000$ ) (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.12. Farklı sıcaklıklarda yapılan tüm çalışmalardan elde edilen ortalama D değerleri.

Sıcaklık	Ortalama D değeri (dak)	Çalışma sayısı	Standart sapma
40	40,29	24	57,14
45	27,12	23	46,15
50	7,96	17	13,26
55	,94	6	1,15
Toplam	24,74	70	44,86



### 3.6. *Z. rouxii*'nin İnaktivasyonunda D Değerleri Üzerine İnteraksiyonların Etkilerinin Değerlendirilmesi

Farklı pH,  $a_w$  ve sıcaklık kombinasyonlarında yapılan çalışmaların *Z. rouxii* inaktivasyonu üzerindeki etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 3.13'de görüldüğü gibi, D değerleri üzerine sonikasyon, pH, sıcaklık ( $p=0.000$ ) ve  $a_w$  ( $p=0.004$ ) etkili olmuş ve etkileri önemli bulunmuştur. Ayrıca, sonikasyon \* pH, sonikasyon \* sıcaklık, pH \* sıcaklık, sonikasyon \* pH \* sıcaklık, pH \*  $a_w$  ve sonikasyon \* pH \*  $a_w$ 'nin D değerleri üzerine birlikte etkileri de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Çizelge 3.13. D değerleri üzerine sonikasyon, pH,  $a_w$  ve sıcaklığın kombine etkisine ait varyans analizi.

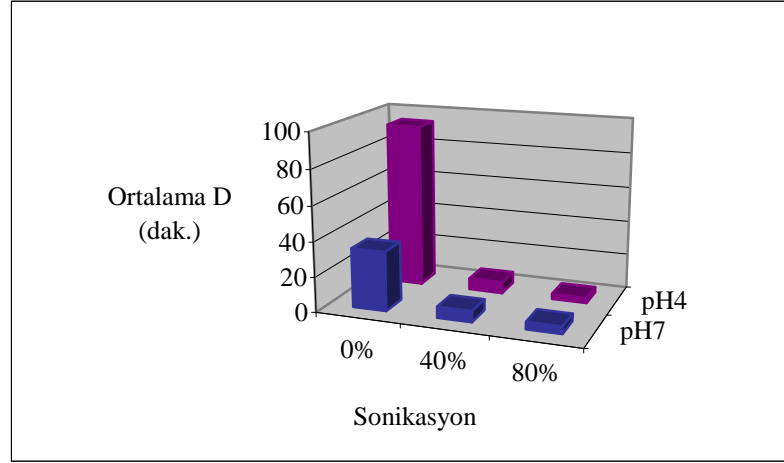
D'ye bağlı değişkenlik

Varyans kaynakları	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Önemlilik
Düzeltilmiş model	132710,86(a)	38	3492,39	17,45	,000
Intercept	20310,85	1	20310,85	101,49	,000
S (Sonikasyon)	25901,64	2	12950,82	64,71	,000
pH	3563,01	1	3563,01	17,80	,000
T (Sıcaklık)	14739,65	3	4913,21	24,55	,000
$a_w$ (Su aktivitesi)	1907,96	1	1907,96	9,53	,004
S * pH	7120,99	2	3560,49	17,79	,000
S * T	15825,97	6	2637,66	13,18	,000
pH * T	5128,52	3	1709,50	8,54	,000
S * pH * T	10798,15	6	1799,69	8,99	,000
S * $a_w$	475,61	2	237,80	1,18	,318
pH * $a_w$	1114,83	1	1114,83	5,57	,025
S * pH * $a_w$	1899,10	2	949,55	4,74	,016
T * $a_w$	669,52	2	334,76	1,67	,204
S * T * $a_w$	518,03	4	129,51	,64	,633
pH * T * $a_w$	334,35	1	334,35	1,67	,206
S * pH * T * $a_w$	782,92	2	391,46	1,95	,158
Hata	6203,91	31	200,12		
Toplam	181768,35	70			
Düzeltilmiş toplam	138914,78	69			

a R Squared = ,955 (Adjusted R Squared = Düzeltilmiş R kare = ,901)

### 3.6.1. D değerleri üzerine sonikasyon ve pH'nın birlikte etkisi

D değerleri açısından, farklı pH'larda yapılan sonikasyon uygulamaları ve termal uygulamalar arasındaki fark önemli ( $p=0.000$ ) bulunmuştur (Çizelge 3.13). Ancak sonikasyonun % 40 ve ya % 80 amplitüdde uygulandığı çalışmalarda, ortam pH'sının 4 ya da 7 olması, D değerleri açısından belirgin bir fark yaratmamıştır (Şekil 3.71). *Z. rouxii* termal uygulamalarda pH 4 ortamında daha dirençli olmuş ve D değeri pH 7'dekine oranla çok daha büyük olmuştur.

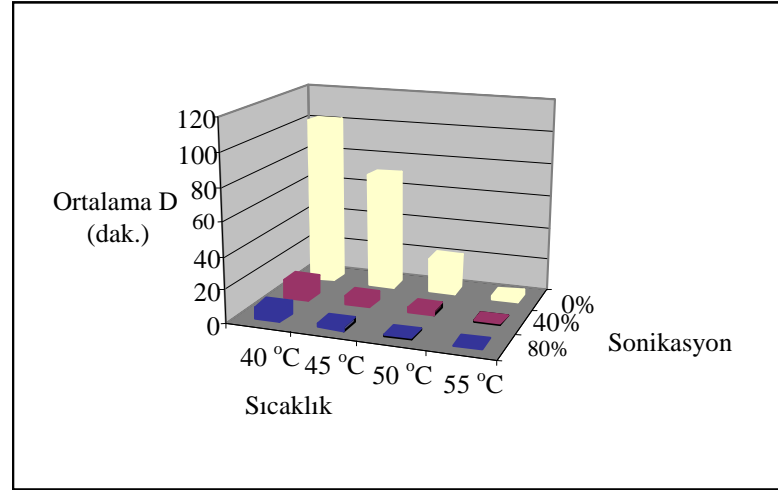


Şekil 3.71. D değerleri üzerine sonikasyon ve pH'ın birlikte etkisi.

### 3.6.2. D değerleri üzerine sonikasyon ve sıcaklığın birlikte etkisi

Sadece termal uygulama yapılan çalışmalarda *Z.rouxii*'nin D değerleri arasındaki fark önemli ( $p=0.000$ ) bulunmuştur. Buna bağlı olarak sonikasyonun farklı sıcaklıklarda uygulanışından elde edilen D değerleri arasındaki fark da oldukça önemlidir ( $p=0.000$ ) (Çizelge 3.13). Sonikasyonun % 40 ve ya % 80 amplitüdde uygulanması, 40, 45 ve 50 °C'lerdeki ortalama D değerleri arasında belirgin bir fark yaratırken 55 °C'de bu fark oldukça azalmıştır. Örneğin 40 °C'de % 40 ve % 80 amplitüdde yapılan çalışmalardaki ortalama D değerleri sırasıyla 11.2 ve 7.4 dak. iken,

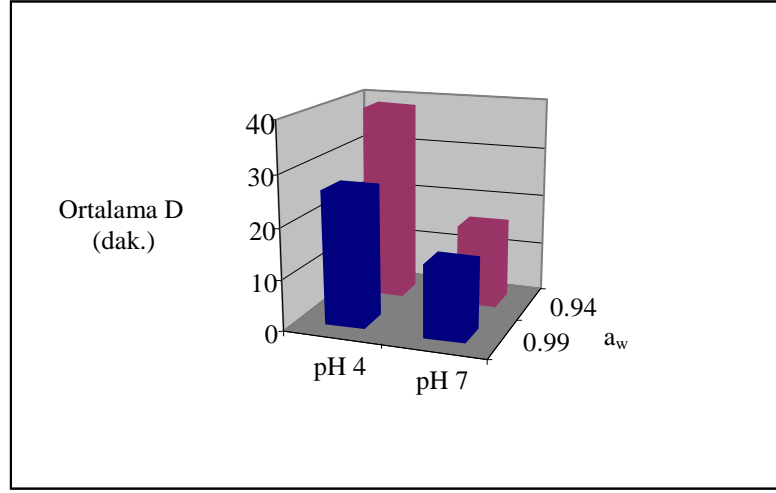
55 °C’de yapılan çalışmada bu değerler aynı sırayla 0.21 ve 0.18 dak. olmuştur (Şekil 3.72).



Şekil 3.72. D değerleri üzerine sonikasyon ve sıcaklığın birlikte etkisi.

### 3.6.3. D değerleri üzerine pH ve su aktivitesinin birlikte etkisi

0.94 ya da 0.99  $a_w$ 'de, pH 4 ve ya pH 7'de sonikasyon uygulamalı ve uygulamasız yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri arasındaki fark önemli ( $p < 0.05$ ) olmuştur (Çizelge 3.13). 0.94  $a_w$ 'de pH 4'de yapılan çalışmalardan elde edilen D değerleri pH 7'de elde edilenlerden daha büyük olmuştur (Şekil 3.73). Sonikasyon yapılan ortamda  $a_w$  düşüşüne bağlı olarak maya hücrelerinin sonikasyona olan direncinin arttığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Lopez-Malo ve Palou (2005),'nin yapmış olduğu çalışmada da rapor edilmiştir (Bkz. Bölüm 3.2.). Düşük pH'da, (3.5) ortamın  $a_w$ 'sinin düşüşüne bağlı olarak maya hücrelerinin sonikasyona ve termal uygulamalara olan direnci artmıştır. 45 °C'deki bulgularına göre, termal uygulamalardan (TT) elde ettikleri D değerlerinin, termoultrasonikasyon (TUT) uygulamalarındakilere göre önemli düzeyde büyük olduğunu bildirmişlerdir ( $p < 0.05$ ).



Şekil 3.73. D değerleri üzerine pH ve su aktivitesinin birlikte etkisi.

#### 4. SONUÇ

Çalışmamızda, bazı meyve sularına model ortam oluşturulabileceği düşünülerek iki farklı pH (pH 4 ve pH 7) ve  $a_w$  (0.99 ve 0.94) değerinde sitrat tamponu kullanılarak, farklı sıcaklık düzeylerinde (40, 45, 50 ve 55 °C) sonikasyona maruz bırakılmış *Z. rouxii*'nin, bu koşullardaki inaktivasyonu incelenmiştir. Aynı koşullarda sadece ısı işlem uygulanan çalışmalarla karşılaştırılarak, *Z. rouxii*'nin inaktivasyonu üzerinde ilave bir etkisi olup olmadığı belirlenmiştir.

Farklı pH,  $a_w$  ve sıcaklık düzeylerinde sonikasyona maruz kalan *Z. rouxii*'nin D değerleri, aynı koşullardaki termal uygulamalardan elde edilen D değerlerinden oldukça küçüktür. Ultrasound uygulamalarında, sonikasyonun inhibe edici etkisi, artan akustik güç şiddeti (amplitüd düzeyi) ile birlikte artmıştır. Bunun nedeni, belirli bir sıcaklık düzeyinde birim hacme uygulanan gücün artışıdır ve buna bağlı olarak desimal reduksiyon için gerekli süre azalmıştır. Ayrıca sonikasyon yapılan ortamın  $a_w$  ve pH'ı, inaktivasyon düzeyi açısından etkili olmuş, düşük  $a_w$  değerlerinde yapılan sonikasyon uygulamalarından hesaplanan D değerleri, her zaman yüksek  $a_w$ 'de yapılanlardan daha büyük olmuştur. Ayrıca, *Z. rouxii*'nin sonikasyon uygulamalarına olan direnci pH 4' de, pH 7'dekinden daha fazladır. Ancak, yüksek sıcaklık düzeylerinde yapılan sonikasyonlarda,  $a_w$  ve pH değişimleri D değerleri açısından belirgin farklar yaratmamış, yükselen sıcaklık inaktivasyon düzeyini etkilemede daha önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, düşük sıcaklıklarda uygulanan ısı işlemlerde sonikasyonun maya inaktivasyonunda sinerjistik bir etki gösterdiği söylenebilir. Dolayısıyla, yüksek sıcaklıklardaki pastörizasyon işlemlerinde yapısal özellikleri bozulabilen sıvı gıdalara, daha kısa süreli ısı işlem uygulayarak, yeterli mikrobiyal inhibisyon elde etmede, avantaj sağlama potansiyeli bulunmaktadır. Ancak alternatif olarak görülen bu işlemin, endüstriyel boyuttaki uygulamalarının ekonomik olup olmayacağı, ya da uygulanabilir olup olmayacağı konusunda çalışmalar yapılması gerekmektedir. Özellikle sürekli sistemlerdeki etkinliği üzerinde yapılacak çalışmaların, endüstriyel uygulamalar için önemi büyüktür. Su aktivitesi ve pH gibi etkenlerin, ultrasoundun maya üzerindeki inaktive edici etkisinde meydana getirdiği değişimler de

göz önüne alındığında, uygulamaların gerçek gıda ortamlarındaki etkinliğini belirleyen çalışmaların yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır.

## 5. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, F. I. K. and Russell, C., 1975, Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in the killing of microorganisms, *Journal of Applied Bacteriology*, 39, 31-41.
- Allinger, H., 1975, Ultrasonic disruption, *American Laboratory*, 10, 75–85.
- Allison, D. G., D'Emanuele, A., Egington, P. and Williams, A. R., 1996, The effect of ultrasound on *Escherichia coli* viability, *Journal of Basic Microbiology*, 36, 3-11.
- Alvarez, I., Manas, P., Sala, F.J. and Condon, S., 2003, Inactivation of *Salmonella enteritidis* by ultrasonic waves under pressure at different water activities, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 668-672.
- Alvarez, I., Manas, P., Virto, R. and Condon, S., 2006, Inactivation of *Salmonella senftenberg* 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities, *Int.Journal Food Microbiology*, 108, 218-225.
- Alzamora, S.M., Lopez-Malo, A., Guerrero, S. and Palou, E., 2003, Plant antimicrobials combined with conventional preservatives for fruit products, In *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*, S. Roller (Ed.) Woodhead Publishing, Ltd., UK, 235-249.
- Barbosa-Canovas, G. V., Pothakamury, U.R., Palou, E. and Swanson, B. G., 1998, *Nonthermal preservation foods*, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Blume, T. and Neis, U., 2004, Improved wastewater disinfection by ultrasonic pre-treatment, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 333-336.
- Borthwick, K.A.J., Coakley, W.T., McDonnell, M.B., Nowotny, H., Benes, E. and Grfschl, M., 2005, Development of a novel compact sonicator for cell disruption, *Journal Microbiology Meths.*, 60, 207-216.
- Brondum, J., Egebo, M., Agerskov, C. and Busk, H., 1998, Online pork carcass grading with the autoform ultrasound system, *Journal of Animal Science* 76, 1859-1868.
- Burkhard, F. and Michael, R., 1996, The thermo acoustic effect and its use in ultrasonic power determination, *Ultrasonics* 34, 563– 566.
- Butz, P. and Tauscher, B., 2002, Emerging Technologies, Chemical Aspects, *Food Research International*, 35(2/3), 279-284.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Cheftel, J.C. 1995, High-pressure microbial inactivation and food preservation, Food Science Technology. Int., 1, 75-90.
- Crosby, L., 1982, Juices pasteurized ultrasonically, Food Production/Management, September, 16p.
- Dadjour, M.F., Ogino, C., Matsumura, S., Nakamura, S. and Shimizu, N., 2006, Disinfection of *Legionella pneumophila* by ultrasonic treatment with TiO<sub>2</sub>, Water Res., 40, 1137-1142.
- De Montigny, J., Straub, M-L., Potier, S., Tekala, F., Dujon, B., Wincker, P., Artiguenave, F. and Souciet, J-L., 2000, Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8 *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEBS Lett*, 487, 52–55.
- Dimitrier, B., Toukach, F. and Ehlers, S., 2005, Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall , Trends In Microbiology, 13(12), 569-574.
- Duckhouse, H., Mason, T.J., Phull, S.S. and Lorimer, J.P., 2004, The effect of sonication microbial disinfection using hypochlorite, Ultrasonics Sonochemistry, 11, 173-176.
- Earnshaw, R.G., Appleyard, J. and Hurst, R.M., 1995, Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure, International Journal of Food Microbiology 28, 197-219.
- Ertuğrul, N., Kunduhoğlu, B. ve Çoksöyler, N., 2003, *Escherichia coli* Kültüründe canlı hücre sayısının değişimi üzerine sıcaklığın etkisinin matematiksel modellerle belirlenmesi, 3.Gıda Mühendisliği Kongresi Dergisi, Ankara, 657-671,
- Farkas, J. and Andrassy, E., 1993, Interaction of ionising radiation and acidulants on the growth of the microflora of a vacuum-packed chilled meat product, International Journal of Food Microbiology 19, 145– 152.
- Fellows, P., 2000, Food processing technology, principles and practice (2<sup>nd</sup> ed.), New York: CRC Press.
- Flint, E.B. and Suslick, K. S., 1991, The temperature of cavitation, Science, 253, 1397-1398.
- Floros, J.D. and Liang, H., 1994, Acoustically asisted diffusion through membranes and biomaterials, Food Technology, 48(12), 79-84.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Garcia, M.L., Burgos, J., Sanz, B. and Ordonez, J.A., 1989, Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*, *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 619-628.
- Guerrero, S., Lopez-Malo, A. and Alzamora, S.M., 2001, Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude, *Innovation Food Science Emerging Technology*, 2, 31-39.
- Hamre, D., 1949, The effect of ultrasonic waves upon *Klebsiella pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Miyagawanella felis* and *influenza virus A*, *Journal of Applied Bacteriology* 57, 279-295.
- Hansen, N. H. and Rieman, H., 1963, Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms, *Journal of Applied Bacteriology*, 26 (3), 314-333.
- Harvey, E. and Loomis, A., 1929, The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves, *Journal of Bacteriology*, 17, 373-379.
- Hoffmann, M.R , Hua, I. and Höchemer, R., 1996, Application of ultrasonic irradiation for the degradation of chemical contaminants in water, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3 163–172.
- Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrel, K.D. and CFliver, D.O., 1994, Foodborne disease handbook, diseases caused by bacteria, Vol 1, Marcel Dekler Inc., NY.
- ICMSF, 1996, Microorganisms in foods 5, microbiological specifications of food pathogens, Chapman and Hall, New York.
- Jacobs, S. E. and Thornley, M. J., 1954, The lethal action of the ultrasonic waves on bacteria suspended in milk and other liquids, *Journal of Applied Bacteriology* 17, 38-56.
- Javier, R. and Gustavo V., 2003, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (3), 265-285.
- Jay, J.M., 1996, *Modern food microbiology*, (5<sup>th</sup>ed.), Chapman and Hall, New York.
- Kinsole, H. E., Ackerman, J. and Reid, J., 1954, Exposure of microorganisms to measured sound fields, *Journal of Bacteriology*, 68, 373-380.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. and Lee, D., 2004, Applications and potential of ultrasonics in food processing, *Food Science and Technology*, 15, 261-266.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Krefting, D., Mettin, R. and Lauterborn, W., 2004, High-speed observation of acoustic cavitation erosion in multibubble systems, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 119–123.
- Kuijpers, M.W.A, Kemmere, M.F. and Keurentjes, J.T.F., 2002, Calorimetric study of the energy efficiency for ultrasound-induced radical formation, *Ultrasonics* 40, 675–678.
- Kuttruff, H., 1988, *Physik und Technik des Ultraschalls*, Stuttgart: S. Hirzel Verlag.
- Lea, S.C., Price, G.J. and Walmsley, A.D., 2005, A study to determine whether cavitation occurs around dental ultrasonic scaling instruments, *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 233-236.
- Legan, J.D. and. Voyset, P.A., 1991, Yeast spoilage of bakery products and ingredients, *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 361–371.
- Leighton, TG., 1998, The Principles of cavitation In: Povey MJW, T.J., Mason, (Ed.) *Ultrasound in food processing*, Blackie Academic and Professional, London, 151-178.
- Leighton, T.G. and Dumbrell, H.A, 2004, New approaches to contrast agent modelling, in: *Proceedings of the first conference in advanced metrology for ultrasound in medicine*, J. Phys. Conf. Ser. 1, 91-96.
- Leighton, TG., 2007, What is ultrasound?, *Prog Biophys Molecüler Biology*, 93, 3–83.
- Leistner, L. and Gorris, L.G.M., 1995, Food preservation by hurdle technology, *Trends Food Science Technology*, 6, 41-46.
- Lopez-Malo, A., Palou, E., Jimenez-Fernandez, M., Alzamora, S.M. and Guerrero, S., 2005, Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials, *Journal of Food Eng.*, 67, 87-93.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker J., 1997, *Brock Biology of Microorganisms*, PP. 8<sup>th</sup> edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Maisonhaute, E., Prado, C., White, PC. and Compton, RG., 2002, Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: shear stress in ultrasonic cleaning, *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 297–303.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Manas, P., Pagan, R., Raso, J., Sala, F.J. and Condon, S., 2000, Inactivation of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella seftenberg* by ultrasonic waves under pressure, *Journal of Food Protection* 63 (4), 451-456.
- Manas, P. and Pagan, R., 2005, Microbial inactivation by new technologies of food preservation, *Tecnología de los Alimentos*, Facultad de Veterinaria, Universidad 98, 1387-1399.
- Mason, T.J., Paniwink, L. and Lorimer, J.P., 1996, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 253-260.
- McClements, D.J., 1995, Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing, *Trend Food Science*, 6, 293-299.
- Mertens, B. and Knorr, D., 1992, Developments of nonthermal processes for food preservation, *Food Technology*, 46, 124-133.
- Mizrach, A., Galilli, N. and Rosenhouse, G., 1994, Determining quality of fresh products by ultrasonic excitation, *Food Technology*, 48(12), 68-71.
- Öner, M., 1992, Mikroorganizmaların büyümeleri, Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basım Evi, Yayın No: 6, Bornova İzmir.
- Pagan, R., 1997, Resistencia frente al calor y los ultrasonidos bajo presión de *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Pagan, R., Manas, P., Alvarez, I. and Condon, S., 1999a, Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures, *Food Microbiology*, 16, 139-148.
- Pagan, R., Manas, P., Raso, J. and Condon, S., 1999b, Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 297-300.
- Pagan, R., Manas, P., Palop, A. and Sala, F.J., 1999c, Resistance of heat-shocked cells to mano-sonication and mano-thermo-sonication, *Letters in Applied Microbiology*, 28, 71-75.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

- Peterson, R.V. and Pitt, W.G., 2000, The effect of frequency and power density on the ultrasonically- enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 17, 219-227.
- Piyasena, P., Mohareb, E. and McKellar, R.C., 2003, Inactivation of microbes using ultrasound: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207-216.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. and Roos, T., 1997, Modelling the growth rate of *E. coli* as a function of pH and lactic acid concentration, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 6, 2355-2360.
- Raichel, D.R., 2000, *The Science and Applications of Acoustics*, Springer: New York.
- Raso, J., Palo, A., Pagan, R. and Condon, S., 1998a, Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment, *Journal of Applied Microbiology*, 85, 849-854.
- Raso, J., Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J., 1998b, Influence of treatment and pressure on the lethality of ultrasound, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 465-471.
- Rediske, A.M., Hymas, W.C., Wilkinson, R. and Pitt, W.G., 1998, Ultrasonic enhancement of antibiotic action on several species of bacteria, *Journal of General and Applied Microbiology* 44, 283-288.
- Reed, G. and Nagodawithana, T.W., 1991, *Yeast technology*, 2<sup>nd</sup> edition, An Avi Book, Published by Van Nostrand Reinhold, New York, 454p.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., and Raso, J., 1995, Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes, In G. W. Gould (Ed.), *New methods of food preservation*, London Blackie Academic and Professional 176–204.
- Sanz, B., Palacios, P., Lopez, P. and Ordonez, J.A., 1985, Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores, In Dring, G.J., Ellar, D.J., and Gould, G.W., *Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores*, Academic Press, London, 251-259.
- Scientific Committee On Food, 1999, Opinion on mannitol manufactured by fermentation, Annex III to the minutes of the 119th Plenary meeting.
- Smelt, J.P.P.M., 1998, Recent advances in the microbiology of high pressure processing, *Trends Food Science Technology*, 9, 152-158.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Suslick, K. S., 1988, Ultrasound, its chemical, physical and biological effects, Chapter 4, Homogeneous Sonochemistry, VCH Publishers, 125p.
- Suslick, K. S., 1990, Interparticle collisions driven by ultrasound, *Sonochemistry Science* (247) 1439–1445.
- Şahin, O., Dönmez-Altuntaşu, H., Hizmetli, S., Hamurcu, Z. ve İmamoğlu, N., 2004, Investigation of genotoxic effect of ultrasound in cases receiving therapeutic ultrasound by using micronucleus method, *Ultrasound Med. Biology*, 30, 545-548.
- Tabatabaie, F. and Mortazavi, A., 2008, Studying the effects of ultrasound shock on cell wall permeability and survival of some LAB in milk, *World Applied Sciences Journal*, 3(1), 119-121.
- Temiz, A., 1997, Genel mikrobiyoloji ders notları, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (Basılmamıştır).
- Tokuoka, K. 1993, Sugar- and salt-tolerant yeasts, *Journal of Applied Bacteriology* 74, 101–110.
- Tsukamoto, I., Yim, B., Stavarache, C.E., Furuta, M., Hashiba, K. and Maeda, Y., 2004, Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 61-65.
- U.S. Food and Drug Administration, 2000, Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies: pulsed electric fields. [Accessed 21 June 2000], <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-pef.html>.
- Villamiel, M. and De Jong, P., 2000a, Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating, *Food Eng.*, 45, 171-179.
- Villamiel, M. and De Jong P, 2000b, Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk, *Ag. Food Chem.*, 48, 472-478.
- Wase, D.A.J. and Patel, Y.R., 1985, Effect of cell – volume on disintegration by ultrasonics, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology B-Biotechnology*, 35, 2, 165-173.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

Whillock, G. O. H. And Harvey, B. F., 1997, Ultrasonically enhanced corrosion of 304L stainless steel I: The effect of temperature and hydrostatic pressure, Ultrasonics Sono- chemistry, 4, 23-31.

Williams, A., 1994, New technologies in food processing: Part II. Nutrition and Food Science 1, 20– 23.

Wood, O.B. and Bruhn, C.M., 2000, Position of the American dietetic association: food irradiation, Journal of the American Dietetic Association 100, 246–253.

Wouters, P.C. and Smelt, J.P.P., 1997, Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: potential for food preservation, Food Biotechnology, 11, 193-229.

online [http:// www. From Farm to Fork Food Safety Specialist Training Program.htm](http://www.FromFarmtoForkFoodSafetySpecialistTrainingProgram.htm) (03.09.2007).

online [http://\\_kiifc.kikkoman.co.jp/english/exhibit/index.html](http://_kiifc.kikkoman.co.jp/english/exhibit/index.html) (14.10.2008).

online [www.nanonanonano.net/projects/sonochem/](http://www.nanonanonano.net/projects/sonochem/) (14.10.2008).

online [http://dpi.eq.ufrj.br/Anais\\_A/CENPROMER2005/nukleo/pdfs/0728\\_728.pdf](http://dpi.eq.ufrj.br/Anais_A/CENPROMER2005/nukleo/pdfs/0728_728.pdf) (03.11.2008).