

Portakal Suyunda *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*
İnaktivasyonunda Ultrasound ve Bazı Uçucu Yağların Kombine Kullanımı

Saniye Ütkün

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2011

Combined Use of Ultrasound and Essential Oils to Inactivate *Escherichia coli*
O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Orange Juice

Saniye Ütkün

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2011

Portakal Suyunda *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*
İnaktivasyonunda Ultrasound ve Bazı Uçucu Yağların Kombine Kullanımı

Saniye Ütkün

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Ocak 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Saniye Ütkün'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Portakal Suyunda *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* İnaktivasyonunda Ultrasound ve Bazı Uçucu Yağların Kombine Kullanımı” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

İkinci Danışman : –

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN

Üye : Yrd. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Son on yılda yüksek besinsel ve duyuşsal özellik sunan güvenli ve dayanıklı gıda ürünlerine olan tüketici talebini karşılayabilmek amacıyla minimal işleme önemli bir modern gıda koruma metodu olarak kabul görmüştür. Meyve suların minimal işleme için araştırılan ısısal olmayan tekniklerler arasında özellikle düşük ısıda uygulanan “sonikasyon” araştırmacıların ve sanayinin artarak ilgisini çeker hale gelmiştir. Ancak ısısal olmayan yöntemler bozulma etmenlerinin ve patojenlerin azaltılmasında ilk engel olarak etkili iken, işlem sonrasında canlı kalan hücrelerin depolama süresince büyümesinin engellenmesi ve/veya kontrol edilmesinde antimikrobiyaller daha etkilidir. Artan tüketici bilinci ve sentetik katkı maddelerine olan endişelerden dolayı doğal katkı maddeleri ile korunmuş gıdalar popüler olmuştur. Bu veriler ışığında bu çalışmada, ultrasound (20 kHz, 99.2 µm yoğunluğunda; 5 dk), farklı ortam sıcaklıkları (4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C) ve uçucu yağların (EO: 200, 400 ve 800 µl/L; Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde) birlikte kullanımlarının portakal suyundaki *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* gelişimlerine etkileri araştırılmıştır. İnaktivasyon denemeleri, 45 °C’ de ultrasoundun tek başına ve EOlarla beraber kullanımı ile *E. coli* O157:H7 hücre sayısında; sırasıyla 1,32 log birim (>5 dk), 4,48 (30 sn’de; Eugenol), 4,25 (30 sn’de; Linalool) ve 4,2 (4 dk’da; Cinnamaldehyde) log birimlik bir azalma meydana geldiğini göstermiştir. Ultrasoundun tek başına (45 °C) ve EOlarla (800 µl/L) birlikte kullanımıyla, *E. coli* O157:H7 için D değeri sırasıyla 2,78 ve 1,66 dk (kullanılan üç EOın ortalaması) olarak belirlenmiştir. Ultrasoundun tek başına (45 °C) ve Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde ile birlikte kullanımı *L. monocytogenes* için de benzer mikrobiyal inaktivasyon sonuçları göstererek, sırasıyla 0,92 log birim (5 dk) ve 4,63 (2 dk), 4,38 (3 dk), 2,94 (5 dk) log birimlik azalmalar sağlamıştır. Sonikasyon 50 °C’de yapıldığında *L. monocytogenes* inaktivasyonu artmış, ultrasoundun tek başına ve EOlarla (800 µl/L) beraber kullanımında D değerleri sırasıyla 3,44 dk ve 1,10 dk olarak belirlenmiştir. Ayrıca ultrasound ve EO ile işlem görmüş portakal sularının 4 ve 25 °C’ de 2 ay depolaması sonrasında hiçbir mikrobiyal gelişim gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Ultrasound, uçucu yağlar, portakal suyu, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*.

SUMMARY

During the last decade minimal processing has been well established as an essential strategy for modern food preservation in order to meet growing consumer demands for safe and durable food products offering high nutritional and sensory value. Among the non-thermal techniques investigated for minimal processing of fruit juices, “sonication” has attracted increasing interest by researchers and industry, particularly when applied with mild heat. But the non-thermal approach acts as an initial hurdle in reducing the spoiling and pathogen microflora, while the antimicrobials are effective hurdles within the storage time, as they inhibit and/or control the growth of surviving cells. Because of greater consumer awareness and concern about synthetic chemical additives, foods preserved with natural additives become popular. In the light of these data, in this study, the influence of combined effects of ultrasound (20 kHz, 99.2 μm intensity; 5 min), different heat treatment (4, 25, 35, 40, 45 and 50 °C) and essential oils (EOs; eugenol, linalool and cinnamaldehyde: at 200, 400 and 800 $\mu\text{l/L}$) on the inactivation and potential subsequent growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in orange juice was investigated. Inactivation experiments showed that sonication alone and combined with EOs (800 $\mu\text{l/L}$) increased *E. coli* O157:H7 cell destruction by 1,32 log cycles (in >5 min) and 4,38 (in 30 sec; eugenol), 4,25 (in 30 sec; linalool) and 4,2 log cycles (in 4 min; cinnamaldehyde) at 45°C in orange juice, respectively. When sonication applied alone (at 45°C) and combined with EOs (800 $\mu\text{l/L}$), D value of *E. coli* O157:H7 decreased from 2,78 min. to 1,66 min. (mean of three EOs) respectively. Similar microbial inactivation was obtained for *L. monocytogenes* by ultrasonic treatment alone (at 45°C) or combined with each eugenol, linalool and cinnamaldehyde (800 $\mu\text{l/L}$); 0,92 log cycles (in >5 min) and 4,63 (in 2 min), 4,38 (in 3 min) and 2,94 (in >5 min) log cycles, respectively. When sonication applied at 50 °C for *L. monocytogenes*, inactivation level was increased and, D values were determined as 3,44 min and 1,10 min for ultrasonic treatment alone and combined with EOs (800 $\mu\text{l/L}$), respectively. Additionally, there was not any microbial growth in orange juice samples treated with ultrasound combined with EOs (800 $\mu\text{l/L}$), during 2 months of the storage at 4 and 25 °C.

Keywords: ultrasound, essential oils, orange juice, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince yardımları ile beni yönlendiren, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardım ve katkılarından dolayı Başak KARAGÜL'e, tez bitirme öğrencileri Özlem ULUSOY ve Çiğdem KAYGUSUZUOĞLU ile diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme ve çok yakın arkadaşlarıma teşekkürü bir borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	5
2.1 Meyve Sularında Bozulma Etmeni Mikroorganizmalar.....	5
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> ' in gıdalarda önemi.....	6
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7' nin gıdalarda önemi.....	8
2.2 Gıda Koruması ve Meyve suyu Muhafaza Yöntemleri.....	9
2.2.1 Alternatif gıda muhafaza yöntemi olarak ultrasound (sonikasyon).....	15
2.2.1.1 Ultrasound ile mikrobiyal inaktivasyon.....	18
2.2.1.2 Ultrasound ile inaktivasyonu etkileyen faktörler.....	19
2.3 Doğal Antimikrobiyaller ve Uçucu Yağlar.....	20
2.3.1 Gıda koruyucu olarak uçucu yağların kullanımları.....	21
2.3.2 Uçucu yağların etki mekanizması.....	22
2.3.3 Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri.....	23
2.4 Engeller Kavramı (Hurdle Concept).....	30
3. MATERYAL ve METODLAR	34
3.1 Materyal.....	34
3.1.1 Portakal suyu eldesi ve pastörizasyon.....	34
3.1.2 Besiyerleri.....	34
3.1.3 Çözeltiler.....	39

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.4 Mc Farland No: 0,5 Bulanıklık Standardı.....	39
3.1.5 Uçucu yağlar	40
3.1.6 Diğer kimyasallar	40
3.2 Metodlar.....	41
3.2.1 Çalışmada kullanılan Ultrasonic Processor' ün özellikleri.....	41
3.2.2 Pastörize portakal suyunun fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri.....	43
3.2.3 Sonikasyon ile bakteriyal inaktivasyon denemelerinde kullanılan bakteriler.....	44
3.2.4 Çalışmada kullanılan sayım yöntemi.....	44
3.2.5 Uçucu yağların ve sitrik asitin stok çözeltilerinin hazırlanması	44
3.2.6 Uçucu yağlar ve sitrik asitin <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> üzerine antibakteriyal etkilerinin belirlenmesi.....	45
3.2.7 Sonikasyonla bakteriyal inaktivasyon üzerine uçucu yağlar ve sitrik asitin etkisini belirlemek için hazırlanan deney planı.....	46
3.2.8 İstatistiksel metod (Varyans Analizi).....	49
3.2.9 Sonikasyon ürünlerinin farklı sıcaklıklarda depolanması.....	50
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	52
4.1 Portakal Suyunun Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri.....	52
4.2 Uçucu Yağların MIC ve MBC Değerleri.....	52
4.3 Sıcaklığın <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> İnaktivasyonu Üzerine Etkisi.....	53
4.3.1 Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen portakal suyunda <i>E. coli</i> O157:H7' nin gelişimi.....	54
4.3.2 Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen portakal suyunda <i>L. monocytogenes</i> ' in gelişimi.....	55

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4 Uçucu yağların <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu üzerine gelişimi.....	56
4.4.1. Portakal suyundaki <i>E. coli</i> O157:H7 inaktivasyonu üzerine uçucu yağların etkisi.....	56
4.4.2. Portakal suyundaki <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu üzerine uçucu yağların etkisi.....	61
4.5 Sonikasyonun <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> İnaktivasyonu Üzerine Etkisi.....	66
4.5.1 Sonikasyonun farklı sıcaklıklarda portakal suyunda <i>E. coli</i> O157:H7' nin gelişimine etkisi.....	66
4.5.2 Sonikasyonun farklı sıcaklıklarda portakal suyunda <i>L. monocytogenes</i> ' in gelişimine etkisi	67
4.6 <i>E.coli</i> O157:H7 ve <i>L.monocytogenes</i> ' in Farklı Sıcaklıklarda Sonikasyonla İnaktivasyonu Üzerine Uçucu Yağların Etkisi	68
4.6.1 Sonikasyonun uçucu yağlar ile birlikte kullanımının portakal suyuna eklenmiş <i>E. coli</i> O157:H7' nin inaktivasyonu üzerine etkisi	68
4.6.2 Sonikasyonun uçucu yağlar ile birlikte kullanımının portakal suyuna eklenmiş <i>L. monocytogenes</i> ' in inaktivasyonu üzerine etkisi.....	72
4.7 Portakal Suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> Gelişimi Üzerine Sitrik Asitin Etkisi	76
4.7.1 Sitrik asit konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığının etkisi.....	76
4.7.1.1 Portakal suyunda <i>E. coli</i> O157:H7 gelişimi üzerine sitrik asitin etkisi.....	76
4.7.1.2 Portakal suyunda <i>L. monocytogenes</i> gelişimi üzerine sitrik asitin etkisi.....	77
4.7.2 Sitrik asit ve sonikasyonun birlikte etkisi.....	80
4.7.2.1 <i>E. coli</i> O157:H7' ye etkisi.....	81
4.7.2.2 <i>L. monocytogenes</i> ' e etkisi.....	81
4.8 <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> İnaktivasyon Süreleri	81

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.9. Sinerjistik Etki Değerlendirmesi.....	85
4.10. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi.....	87
4.11. Sonikasyon İşleminde Sonra Farklı Sıcaklıklarda Depolanan Portakal Sularında Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyal Değişimi.....	93
5. SONUÇ.....	100
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sitrik asitin kimyasal çizimi.....	12
2.2. Eugenol'ün kimyasal yapısı.....	27
2.3. Linalool' ün kimyasal yapısı.....	28
2.4. Cinnamaldehyde' in kimyasal yapısı.....	29
3.1. Sonikasyon işlemi için kullanılan solid prob.....	41
3.2. Sonikasyon işleminin yapıldığı cihaz.....	41
4.1. Sıcaklığın <i>E. coli</i> O157:H7 inaktivasyonu üzerine etkisi.....	54
4.2. Sıcaklığın <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu üzerine etkisi.....	55
4.3. Eugenol' ün farklı sıcaklıklarda <i>E. coli</i> O157:H7' nin gelişimine etkisi.....	58
4.4. Linalool' ün farklı sıcaklıklarda <i>E. coli</i> O157:H7' nin gelişimine etkisi.....	59
4.5. Cinnamaldehyde' in farklı sıcaklıklarda <i>E. coli</i> O157:H7' nin gelişimine etkisi.....	60
4.6. Eugenol' ün farklı sıcaklıklarda <i>L. monocytogene</i> ' in gelişimine etkisi.....	63
4.7. Linalool' ün farklı sıcaklıklarda <i>L. monocytogene</i> ' in gelişimine etkisi.....	64
4.8. Cinnamaldehyde' in farklı sıcaklıklarda <i>L. monocytogene</i> ' in gelişimine etkisi.....	65
4.9. Sonikasyonun sıcaklıkla birlikte <i>E. coli</i> O157:H7' nin inaktivasyonuna etkisi.....	66
4.10. Sonikasyonun sıcaklık ile birlikte <i>L. monocytogenes</i> ' in inaktivasyonuna etkisi.....	67
4.11. Sonikasyonun Eugenol ile birlikte uygulanmasının <i>E. coli</i> O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.....	69
4.12. Sonikasyonun Linalool ile birlikte uygulanmasının <i>E. coli</i> O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.....	70
4.13. Sonikasyonun Cinnamaldehyde ile birlikte uygulanmasının <i>E. coli</i> O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.....	70
4.14. Sonikasyonla birlikte 800 µl/L dozunda uçucu yağların kullanımlarının <i>E. coli</i> O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. Sonikasyonun Eugenol ile birlikte uygulanmasının <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonuna etkisi.....	72
4.16. Sonikasyonun Linalool ile birlikte uygulanmasının <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonuna etkisi.....	73
4.17. Sonikasyonun Cinnamaldehyde ile birlikte uygulanmasının <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonuna etkisi.....	74
4.18. Sonikasyonla birlikte 800 µl/L dozunda uçucu yağların ve 50 °C’ deki Eugenol ve Linalool kullanımlarının <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonuna etkisi.....	75
4.19. Sitrik asit’ in farklı sıcaklıklarda <i>E. coli</i> O157:H7’ nin gelişimine etkisi....	78
4.20. Sitrik asit’ in farklı sıcaklıklarda <i>L. monocytogenes</i> ’ in gelişimine etkisi...	79
4.21. Sitrik asitin sonikasyonla birlikte <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine etkisi.....	80
4.22. Sitrik asitin sonikasyonla birlikte <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisi.....	81
4.23. <i>E. coli</i> O157:H7 üzerine sonikasyon ve uçucu yağların sinerjistik etkisi...	86
4.24. <i>L. monocytogenes</i> üzerine sonikasyon ve uçucu yağların sinerjistik etkisi...	87
4.25. 4 ve 25 °C’ de depolanmaya başlanmadan önceki portakal suları.....	98
4.26. 4 ve 25 °C’ de depolanan portakal sularının 16. günde görünüşleri.....	99
4.27. 4 ve 25 °C’ de depolanan portakal sularının 48. günde görünüşleri.....	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Mikroorganizmaların ultrasound ile inaktivasyon ortamları.....	17
2.2. Bazı uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal etkileri.....	24
2.3. <i>E. coli</i> ve <i>L. monocytogenes</i> ile yapılan çalışmalarda bazı uçucu yağların MIC aralığı.....	26
2.4. Linalool' ün bazı mikroorganizmalardaki MIC değerleri.....	29
3.1. Sonikasyon (Ultrasound) işleminde kullanılan probun özellikleri.....	40
4.1. Portakal suyunun özellikleri.....	52
4.2. Uçucu yağlar ve sitrik asitin MIC ve MBC değerleri.....	53
4.3. <i>E. coli</i> O157:H7' nin inaktivasyon süreleri ve canlı hücre sayısındaki logaritmik azalmalar.....	82
4.4. <i>L. monocytogenes</i> ' in inaktivasyon süreleri ve canlı hücre sayısındaki logaritmik azalmalar.....	83
4.5. Bakteriyal inaktivasyon için kullanılan faktörler ve deneme sayıları.....	87
4.6. Varyans kaynakları arasındaki testler.....	88
4.7. Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyon sırasında uçucu yağ kullanımının bakteriyal inaktivasyon üzerine etkisi.....	89
4.8. Sonikasyon uygulamasında <i>E. coli</i> ve <i>L. monocytogenes</i> için belirlenen logD değerleri.....	89
4.9. Sıcaklık düzeyinin LogD değeri üzerine etkisi.....	90
4.10. Uçucu yağ kullanılan ve kullanılmayan inaktivasyon çalışmalarından elde edilen D değerlerinin karşılaştırılması.....	90
4.11. Sonikasyonda kullanılan uçucu yağ çeşitlerinin inaktivasyon üzerindeki etkisi.....	91
4.12. Sonikasyon, sıcaklık ve uçucu yağların birlikte kullanımının <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> ' in D değerleri üzerine etkisi.....	91
4.13. Farklı işlem görmüş portakal sularının farklı depo sıcaklıklarında saklanması süresince yapılan <i>E. coli</i> O157:H7 sayımları ve renk değişimleri.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. Farklı işlem görmüş portakal sularının farklı depo sıcaklıklarında saklanması süresince yapılan <i>L. monocytogenes</i> sayımları ve renk değişimleri.....	97

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Meyve suları aroması, ferahlatıcı etkisi ve sindirime katkısı nedeniyle eskiden beri tüketilmektedir. Ayrıca bileşiminde bulunan şekerler, organik asitler, aminoasitler, mineral maddeler, fenolik maddeler ve suda çözünen vitaminler vb. bileşim maddeleri nedeniyle önemli bir besin kaynağıdır.

Beslenmede önemli rol oynayan meyveler normal şartlarda uzun süre muhafaza edilemezler. Çünkü meyveler hasat edildikten sonra da yaşamlarını devam ettirmekte, hatta bu olaylar hasattan sonra daha da hızlanmaktadır. Solunum nedeniyle, dalından koparılan meyvenin bünyesindeki şekerler CO₂, H₂O ve ısıya dönüşmekte, yaşam süreleri çok hızlı bir şekilde kısalmaktadır. Ayrıca meyve olgunlaşmasının ilerlemesi ile birlikte özellikle hasattan sonra, kabuk ve kabuk üzerindeki balmumu tabakası gibi koruyucu sistemlerine rağmen mikroorganizmaların etkisi ile bozulurlar. Uygun olmayan çevre koşulları bozulmayı daha da kolaylaştırır (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Bu nedenle ihtiyaç fazlası ya da kısa sürede tüketilemeyecek meyvelerin çeşitli şekillerde işlenerek raf ömrü uzatılmaya çalışılır. Diğer yandan sofralık değeri olmayan meyvelerin değerlendirilmesi de gerekir. Meyvelerin işlenmesinde de en önemli yeri meyve suları ve konsantreleri tutmaktadır.

Meyve suyu; taze, olgun, sağlam ve meyve suyu üretimine elverişli meyvelerin tekniğine uygun olarak işlenmesiyle elde edilen meyve suyu veya pürenin (pulpun), su, şeker ve izin verilen asit ilaveleri yapılarak veya yapılmadan ambalajlanması ve ısıtım işlemi uygulanarak dayanıklı hale getirilmesiyle üretilen bir içecek olarak tanımlanmaktadır.

Gıda güvenliği uygulamalarının en önemli temel amacı tüketimine kadar gıda kaynaklı patojenlerin ve mikrobiyal bozunma etmenlerinin kontrol altında tutulması veya mümkünse tamamen giderilmesidir. Sözü edilen gıda kaynaklı mikroorganizmaların tüketici sağlığı ve ürün kalitesi açısından risk oluşturmasını engellemek için çeşitli gıda muhafazası yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak ürünü çeşitli

bozulmalara dirençli hale getirmede kullanılan muhafaza yöntemlerinin, gıdanın karakteristik özelliklerini olumsuz yönde etkilememesi dikkate alınması gereken en önemli konudur.

Gıda endüstrisinde meyve sularının raf ömrünü uzatmada kullanılan başlıca yöntemler ucuz ve etkili olması nedeniyle ısıtma işlemleridir (pastörizasyon). Ancak bu işlemler meyve sularında başlıca vitamin ve uçucu nitelikteki aroma maddelerinde kayıplar meydana getirmektedir. Bunun dışında kimyasal koruyucular da (benzoik asit, sorbik asit, kükürt dioksit ve sitrik asit gibi) meyve suyuna antimikrobiyal, antioksidant ve asitlik düzenleyici olarak ilave edilmektedir (Wiley, 1994; Bates et al., 2001). Ancak, raf ömrünü uzatmak için kullanılan kimyasal koruyucular, tüketici gruplarının özellikleri ve tüketim sıklığına bağlı olarak insan sağlığı açısından zararlı olabilmektedir (Bernard, et al., 1997; Isman, et al., 2000). Günümüzde tüketiciler olabildiğince az işlem görmüş ve sentetik katkı maddelerinin kullanılmadığı doğal ürünleri tüketmek konusunda giderek artan bir farkındalık içindedir. Bu nedenle, kimyasal sentetik koruyucuların yerini alabilecek doğal kaynaklı ve geniş spektrumlu antimikrobiyal maddelerin kullanımına yönelik ilgi giderek artmaktadır.

Çeşitli baharatlar, aromatik bitkiler ve şifalı otlardan izole edilebilen uçucu yağların, gıda kaynaklı patojenler de dahil olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle uçucu yağların gıda korumada, sentetik kimyasallara alternatif bir ajan olarak kullanılması konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır (Burt, 2004; Ayala-Zavala, et al., 2008a). Halen çeşitli ekstraksiyon ve/veya distilasyon teknikleriyle meyve kabukları, etli kısımları veya bunların kombinasyonlarının elde edilen ürünler, bir çok meyve suyuna tat ve aroma kazandırmada kullanılmaktadır. Bu uygulamaya verilebilecek en iyi ve klasik örnek de portakaldır (Bates et al., 2001).

Gelişmiş ülkelerde tüketicinin minimum işlem görmüş ürün beklentilerine cevap vermek amacıyla high electric field pulses (HEFP), supercritical carbon dioxide (ScCO₂), high hydrostatic pressure (HP) ve ultrasound gibi ısıtma olmayan alternatif yeni teknikler de kullanılmaktadır. Bunlardan ultrases, henüz bir gıda muhafazası yöntemi olarak endüstride yerini alamamıştır. Bu konudaki çalışmalar genellikle tampon

çözeltiler gibi model ortamlarda yapılmıştır. Endüstriyel anlamda bir uygulamaya geçilebilmesi için, gerçek gıda ortamlarında yapılmış detaylı mikrobiyal inaktivasyon çalışmalarına gerek duyulmaktadır.

Mikroorganizma ve enzim içeren bir sıvıya gönderilen ultrasonik dalgaların meydana getirdiği kavitasyon, genellikle, mikroorganizmalar üzerinde öldürücü ve enzimler üzerinde de inaktive edici etki yaratır (Suslik, 1988). Ultrases dalgalarının öldürücü etkisi, sıvı içinde kavitasyonun neden olduğu yüksek akustik basınçtan kaynaklanmaktadır. Ultrasesin mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisi, başta sıcaklık olmak üzere (Lillard, 1994), hidrostatik basınç ve diğer inaktive edici etkenlerin aynı ortamda birlikte kullanımıyla artmaktadır. Ayrıca, mikrobiyal inaktivasyonda farklı işlemlerin bir arada kullanılması, onların ısı işlemlere olan direncini düşürmektedir. Aynı durum enzim inaktivasyonu için de geçerlidir (Sala et al., 1995).

Ancak yeni önerilen gıda muhafaza işlemlerinin endüstriyel uygulamalar için kabulü aşamasında, ürünün karakteristik özelliklerinde meydana getireceği kayıplar ve üretim süreci maliyeti dikkate alınacak en önemli noktalardır. Bu nedenle, üretilecek alternatif çözümlerin, klasik yöntemlere göre daha ekonomik ve kolay uygulanabilir olması, aynı zamanda da çevreyle dost üretim süreçleri olması üretici, tüketici ve çevre açısından önemli avantajlar getirecektir.

Ülkemizde elma, portakal, vişne, şeftali ve kayısı, meyve sularında işlenen başlıca meyvelerdir. Portakal suyu tüketiciler tarafından tercih edilen ilk üç meyve suyundan birisidir. Türkiye’ de meyve suyuna işlenen meyve miktarlarının başında (binton/2008) elma (333,8), şeftali (118,8), kayısı (74,9), portakal (63,9) ve vişne (54,6) gelmektedir ve ülkemizde satış miktarı bakımından (kg/2001) ilk sırayı vişne suyu (40168220) alırken bunu sırasıyla kayısı (27508007), portakal (11545115) ve elma (1529382) suları izlemiştir (Anonymous, 2000-2001). Portakal suyundaki enzimlerin inaktive edilmesi ve mikroorganizmaların öldürülmesi amacı ile, ürünün özelliklerine göre 80 °C' de 1 dk ya da 85-90 °C' de 30-60 saniye tutularak pastörize edilmektedir.

Çalışmamızda yüksek ve düşük sıcaklıklarda yapılan klasik pastörizasyon işlemine alternatif olarak ultrasound kullanımının, model ortam olarak seçilen portakal suyundaki patojenlerin inaktivasyonu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Türk Gıda

Kodeksi' nin Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği' ne göre, doğrudan sıkılmış, pastörize edilmemiş, soğukta muhafaza edilmesi gereken, tüketime hazır meyve ve sebze suları için *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella ssp.* bakteri analiz ve sayımları mecburi tutulmuştur (TGK, 2010). Bu nedenle çalışmamızda *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* test bakterileri olarak seçilmiştir. Ayrıca, sentetik kimyasal katkı maddelerine alternatif olabilecek eugenol, linalool ve cinnamaldehyde gibi bitki uçucu yağlarının ve halen meyve sularının asitliğinin ayarlamasında ve antioksidant olarak kullanılan sitrik asitin, farklı sıcaklıklarda uygulanan ultrasesle bakteriyel inaktivasyon üzerindeki sinerjistik etkisi de araştırılmıştır. Bunlara ek olarak, ultrases ve/veya uçucu yağ ile işlem görmüş portakal sularının farklı sıcaklıklarda depolanması sırasında canlı kalmış olabilecek *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* gelişimi ve üründeki renk değişimleri kontrol edilmiştir.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

2. 1. Meyve sularında Bozulma Etmeni Mikroorganizmalar

Meyve ve sebze gibi bitkisel ürünler farklı yapısal özelliklere sahiptirler. Bundan dolayı da bu besinlerin sahip oldukları farklı pH, besinsel değerler ve su miktarları gibi özellikleri farklı mikroorganizmalar için uygun ortam meydana getirir (Kalia and Gupta, 2006). Meyvelere yetiştirildikleri bağ, bahçe, sera gibi ortamlardan ya da hasat sonrası işlem ve dağıtımları sırasında istenmeyen mikroorganizmalar bulaşabilir (Beuchat, 2002). Taze sebzeler zararlı mikroorganizmalara karşı doğal bir koruyucu örtüye sahiptirler ve bu örtü onların taze kalmasını sağlayarak, zararlı mikroorganizmalara karşı korumaktadır (Brackett, 1994; Nguyen-The and Carlin, 1994). Bu besinleri tüketmeden önce su ile yıkamak dış kısımlarındaki mikroorganizmaları ve çoğu kimyasal maddeyi uzaklaştırır (Balla and Farkas, 2006).

Mikrobiyal gelişim için en önemli faktörlerden birisi de sıcaklıktır. Sıcaklık mikroorganizmaların gelişimlerini iki farklı yönde etkileyebilmektedir. Sıcaklığın artışı hücrelerdeki kimyasal ve enzimatik reaksiyonların da artmasını ve hızlanmasını sağlar. Fakat sıcaklığın belli bir seviyenin üstüne çıkması proteinler, nükleik asitler ve diğer hücresel yapılar üzerinde geri dönüşümsüz bir hasara sebebiyet verebilmektedir (Madigan, et al., 1997; Öner, 1992).

Gıda fabrikalarında en sık rastlanan ve gıda kaynaklı hastalıklara yol açan mikroorganizmaların başında *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gelmektedir. Sebze ve meyvelerde yaygın olan mikroorganizmalar da, *Pseudomonas* spp., *Erwinia herbicola*, *Enterobacter agglomerans*, laktik asit bakterileri, küf ve mayalardır (Busta, et al., 2003).

Meyve suları yüksek asitlikleri nedeniyle bakteri gelişimi açısından güvenilir gıdalar olarak değerlendirilmektedir. Bu gibi asidik gıdalara uygulanan pastörizasyon işlemi ile laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri, enterobakterler, mayalar ve ısıya

dirençli olmayan küfler gibi bozulmaya neden olan sporsuz mikroorganizmalar inaktif hale getirilebilmektedir. Ancak yine de pH' ı 4,5' in altında bulunan ortamlarda gelişebilen bazı bakteriler bu gibi gıdalarda sorun yaratabilmektedir. Elma suyu, beyaz üzüm şırası, domates suyu gibi çeşitli içeceklerde çeşitli termoasidofilik ve sporlu bakterilerin bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir. Isısal işleme dayanıklı ve yüksek asitli ortamları seven toprak orijinli *Alicyclobacillus* türleri de özellikle meyve suları gibi asidik gıdalarda bozulmalara neden olabilmektedir (Murakami, et al., 1998; Previdi et al., 1997; Splittstoesser et al., 1998; Yamazaki et al., 1996).

2. 1. 1. *L. monocytogenes*' in Gıdalarda Önemi

Listeria cinsi 6 tür içermektedir ve bunlar; *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*' dir. Bunlar içinde sadece *Listeria monocytogenes* insanlara patojendir (Vazquez-Boland, et. al., 2001; Buchrieser, et. al., 2003; Swaminathan, 2001; Roche, et. al., 2009).

Listeria monocytogenes çevreye geniş ölçüde yayılabilen buzdolabı sıcaklığında gelişebilen, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını koruyabilen insan sağlığı açısından önemli bir patojendir (Anonim, 2009b).

Optimum gelişme sıcaklığı genellikle 35–37 °C olup, suşlar 1–45 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında da gelişme gösterebilirler (Juntilla, et. al., 1988; Norrung, B., 2000). Halotolerantırlar ve böylece yüksek konsantrasyonlardaki NaCl (%10–12) varlığında bile çoğalabilirler ve gelişebildiği minimum su aktivitesinin (*A_s*) 0,92 (mutfak tuzunda) olarak belirlenmiştir (Farber, 1991; Norrung, 2000). *L. monocytogenes*, geniş pH aralığında (4,1–9,6) çoğalabilmekte olmasına rağmen optimum gelişim değerleri 6,0–8,0 arasındadır (Müller, 1988).

L. monocytogenes, pH' ı 3,5 ile 6,25 arasında değişen portakal, meyve salataları, elma, karpuz, papaya, kavun ve armutlarda, 4–30 °C sıcaklığındaki ortamlarda, 24 ile 336 saat boyunca gelişim göstererek, bakteri sayısında 2,5 ile 9 logaritmik birimlik artış

meydana gelebilmektedir (Pao, et al., 1998; Mejia and Diaz, 1998; Lanciotti, et al., 2003; Penteado and Leitao, 2004; Corbo, et al., 2005; Ingham, et al., 2006).

L. monocytogenes' in 1980' li yıllarda gıda kaynaklı salgın hastalıklara neden olduğu tespit edilince bu organizmaya olan ilgi artmıştır (McLauchlin, et al., 2004).

Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu tarafından ele alınan *L. monocytogenes* kriterleri esas olarak tüketime hazır gıdaları kapsamaktadır ve ilgili koşulları aşağıdaki gibidir:

- Bebekler ve özel tıbbi amaçlara yönelik tüketime hazır gıdaların 25 g' ında *L. monocytogenes* bulunmamalıdır.
- Piyasadaki diğer tüketime hazır gıdaların raf ömrü süresince 100 kob/g düzeyinden daha fazla *L. monocytogenes* bulunmamalıdır.
- Üretim alanında bırakıldığında bakteri gelişmesine uygun ürünlerin 25 g' ı *L. monocytogenes* içermemelidir.

L. monocytogenes geniş bir alana yayılmakta ve su, silaj, lağım suyu, mezbaha atıkları, sağlıklı ve mastitisli ineklerin sütleri, insan ve hayvan dışkısında olduğu gibi pek çok yerde bulunabilmektedir (Farber and Peterkin, 1991). *Listeria*'nın çevreye yayılması enfekte hayvandan, toprak ve yeşil yemlerin kontaminasyonuna, buradan da et ve süt hayvanlarına tekrar geçmesi şeklinde bir döngü gösterdiği bildirilmektedir. Böylece kontamine sebze, meyve, süt ve etten insanlara geçiş gerçekleşmektedir (Roche, et al., 2009).

Listeria türlerinin pH' nın 4,1' e düştüğü durumlarda da gelişebilmesi ve canlılığını sürdürebilmesi virulansı açısından önemli rol oynamaktadır. Çünkü bu bakterinin insan midesinden geçerken olumsuz koşullara dayanabildiği saptanmıştır (Cotter, et al., 2000; McLauchlin, et al., 2004).

L. monocytogenes' in sebep olduğu listeriosis salgının artmasıyla dünyada meydana gelen ölüm oranları % 20-30 olarak rapor edilmiştir (National Advisory Committee on Microbiological Criteria of Foods, 1991).

Listeriosis, özellikle hamileler, bebekler ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan yetişkinler için etkin olan hastalığa neden olmaktadır. Bu hastalığın en önemli nedeni yetersiz pastörizasyon/ısıtılma işlemi ve mikroorganizmanın 3°C gibi düşük bir sıcaklıkta dahi gelişebilmesidir.

Hastalık belirtileri; sağlıklı insanda kusma, ishal, mide bulantısı, bağışıklık sistemi zayıf insanlarda (yaşlılar, bebekler, hamileler, AIDS ve kanser hastaları) nezle benzeri belirtilere daha sonrasında ise septisemi, menenjit, ensefalit'e dönüşebilir ve hamilelerde çocuk düşürme ve ölü doğuma neden olabilmektedir. Hastalık, yiyecek tüketiminden 12 saat ile bir hafta arasında herhangi bir zaman aralığında görülebilmektedir (Anonim, 2009a).

2. 1. 2. *E. coli* O157:H7' nin Gıdalarda Önemi

Son yıllarda, konakçı hücrelerine bakteriyel yapışma modellerini, bağlanmanın etkilerini, toksin üretimi ve yayılmasını kapsayan virülens faktörlerini içeren virotipik sınıflandırmaya göre, gastrointestinal hastalıklara yol açan *E. coli*' nin 5 virotipi bildirilmektedir. Bunlar, ETEC (Enterotoksijenik *E. coli*), EPEC (Enteropatojenik *E. coli*), EIEC (Enteroinvasiv *E. coli*), EHEC (Enterohemorajik *E. coli*) ve yeni tanımlanan EAaggEC (Enteroaggregavite *E. coli*)'dir. İnsanlarda Hemorajik kolitis (HC), Hemolitik üremik sendrom (HUS) ve Trombotik trombositopenik purpura (TTP) oluşturabilen en yaygın örneği O157:H7 serotipidir (Acheson, 2000; Griffin and Tauxe, 1991; Murray, et al.,1995).

Bakterinin 7-10 °C' lerden 50 °C 'lere kadar geniş bir aralıkta gelişebildiği, optimum üreme ısısının 37 °C olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, pH' ı 4,4 ve altındaki asidik gıdalarda, 0,95 ve altındaki su aktivitesi değerlerinde gelişebilmekte, orta derecedeki tuzda (% 6,5 NaCl) canlılığını sürdürebilmektedir (Guraya, et al., 1998).

E. coli O157:H7 pH' ı 3,5-7 arasında değişen kavun, karpuz, elma, portakal ve armut gibi meyvelerde, 4-25 °C arası sıcaklığındaki ortamlarda, 24' den 816 saate kadar gelişim göstererek, bakteri sayısında 2 ile 6 logaritmik birimlik bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (Del-Rosario and Beuchat, 1995; Fisher and Golden, 1998a; Pao, et

al., 1998; Janisiewicz, et al., 1999; Corbo, et al., 2005; Zhao, et al., 1993; Miller and Kaspar, 1994; Uljas and Ingham, 1999; Dingman, et al., 2000; Ingham, et al., 2006).

A.B.D.' de her yıl yaklaşık 20.000 adet enfeksiyon vakası ve 250 adet HUS ve çeşitli komplikasyonlara bağlı ölümler görüldüğü bildirilmektedir. Organizmanın enfektif dozu tam olarak bilinmemekle birlikte, mevcut salgınlardan elde edilen verilere göre, bu dozun 10-100 organizma gibi çok düşük düzeylerde olduğu bildirilmektedir. *E.coli* O157:H7 enfeksiyon yayılmaları aynı zamanda kavun ve karpuzlarda da görülebilir. *E.coli* O157:H7' nin asidik koşullardaki varlığı organik asit ve sıcaklığa bağlıdır. 100 °C' de sitrik ve malik asit ile asetik, laktik veya tartarik asit varlığında daha hızlı inaktive olurlar. *E. coli* O157:H7' nin neden olduğu akut hastalığın adı hemorrhagic kolittir. Bazı durumlarda kalıcı böbrek hasarlarına veya ölüme neden olabilmektedir. Hastalık ciddi kramplar (karın ağrıları) ve ishale tanımlanmaktadır. Hastalığın temel nedeni yeterli ısı işlem uygulanmaması veya sebzelerin yeterince yıkanmamasıdır. Hastalık yiyeceğin tüketilmesinden 1-10 gün arasında bir zaman aralığında ortaya çıkmaktadır. *E. coli* O157:H7 vakaları kaba yonca filizlerinde, pastörize edilmemiş meyve sularında, kuru-tütsülenmiş salamlarda, kıvırcık salatada, koyun etinde ve lorlarda gözlenmiştir (Guraya, et al., 1998; McCarthy, et al., 1998; Peacock, et al., 2001).

2005' de evlerindeki meyve salatalarından 18, 2001' de okullardaki armutlardan 14, 2000' de restoran ve açık alanlardan satın alınan karpuzlardan 736 ve üzümlerden 14, 1997' de kişisel alanlarında yetiştirilen kavunlardan 9, 1993' de restoranlardaki kavunlardan 27 ve 1996–1999 yılları arasında elma sularından 172 ile 1980–1992 yılları arasında da portakal ve elma sularından toplamda 61 kişi *E. coli* O157:H7 enfeksiyonuna maruz kalarak, hayatını kaybetmiştir (Harris, et al., 2003; CDC, 2007; Powell and Luedtke, 2000).

2. 2. Gıda Koruması ve Meyve Suyu Muhafaza Yöntemleri

Gıda koruma ve işlemede temel yöntem, gıdanın ilk günlük tazeliğini bozmadan ya da bu özellikleri olabildiğince iyi koruyarak saklanabilirliğini yani raf ömrünü uzatmaktır. Bu da gıdanın bileşim ve karakter özelliklerinde istenmeyen yönde

oluşabilecek bozulmaları engellemekle gerçekleşir. Gıdaların bozulmasında her ne kadar fiziksel ve kimyasal nedenlerden dolayı olan bozulmalar etken olsa da mikrobiyal faktörler de oldukça önemlidir. Yani gıdalardaki istenmeyen mikrobiyal gelişimleri engellemek koruma işlemlerinde temel faktörü oluşturur (Özhan, 2000).

İdeal gıda koruma yöntemlerinde bulunması gereken özellikler aşağıda belirtilmiştir (Raso and Barbosa-Canovas, 2003) :

- Bozulma etmeni ve patojen olan mikroorganizmaları inaktive edebilmeli,
- Besinsel değer kaybını ve duyuşal özelliklerinin kaybını en aza indirmiş olmalı,
- İşlem sonrası çevreye zararlı madde bırakmamalı,
- Ucuz ve kolay uygulanabilir olmalı,
- Tüketici isteklerini karşılayabilir bir düzenleyici ajan olmalı.

Gıdaların muhafazasında yapılması gereken iki temel uygulamadan birincisi mikrobiyolojik aktivitenin durdurulmasıdır. Bu uygulama mikroorganizmaların tamamen uzaklaştırılması, gelişmelerinin engellenmesi veya öldürülmeleri ile mümkün olur. Mikrobiyal gelişimi engelleyici koruyucu yöntem olarak donma noktasının altındaki sıcaklıklardaki ortamların kullanılması geleneksel olan yöntemdir. Bu işlem mikrobiyal gelişimin engellenmesinde oldukça başarılıdır (Nowlan, et al., 1974; Beaufort, et al., 2009). Bu düşük sıcaklık veya dondurucu olan yöntemler 1880 yıllarından beri kullanılmaktadır (Lawrie and Ledward, 2006; Ockerman and Basu, 2004). Saklama koşulu olarak $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ saklama için ideal sıcaklıktır (Hansen, et. al., 2004).

Gıda muhafazasında ikinci uygulama ise, dokulardaki kimyasal değişimlerin (enzimatik reaksiyonlar, su aktivitesi, oksidasyon olayları, vb.) kontrol altına alınmasıdır. Bu kimyasal değişimler hem gıdaya bulaşan mikroorganizmalar hem de gıdalarda bulunan doğal enzimler ve kimyasal reaksiyonlardan ileri gelmektedir. Bu aşamada gıda teknolojisi açısından en önemli nokta gıda kalitesinde ve besleyici özelliklerin olabildiğince az değişime neden olarak gıda güvenliğinin en üst düzeye ulaştırılmasıdır (Jay, 1992).

Ancak çabuk bozulan gıdaların korunmasında düşük sıcaklıklarda saklama yada havası alınmış paketleme teknikleri ile koruma yöntemleri mikroorganizmaların üremelerinin engellenmesinde beklenen kadar başarılı olamamıştır ve alternatif gıda koruma yöntemlerinin kullanımlarının araştırılması başlanmıştır (Ward, et al., 1998; Calderon-Miranda, et al., 1999a, b; Eliot-Godereaux, et al., 2001; Fernanda San Martin, et al., 2001; Mainville, et al., 2001; Bendicho, et al., 2002; Butz and Tauscher, 2002; Cserhalmi, et al., 2002; Lado and Yousef, 2002; Spilimbergo, et al., 2002; Wuytack, et al., 2002).

Aynı zamanda yeşil tüketiciler diye adlandırılan sosyal grupta, daha az sentetik ve daha az çevreye etkili olan ürünlere talep artmıştır (Tuley, 1996; Smid and Gorris, 1999). Bu nedenle etkili gıda muhafaza yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine yıllardan beri çalışılmakta olup, tarihsel gelişim içerisinde gıdaları muhafaza etmekte şu yöntemler göze çarpmaktadır (Jay, 1992) :

- Isı uygulaması ile muhafaza (konserve, pastörizasyon)
- Fermente ederek muhafaza (salamura, tuzlama, turşu)
- Soğukta saklayarak muhafaza
- Dondurarak muhafaza
- Kurutarak muhafaza

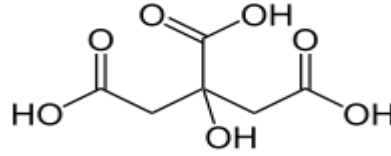
Günümüzde gıda güvenliğinde istenmeyen mikroorganizmaları yok etmek ve engellemek amacı ile kullanılmakta olan birinci sıradaki yöntem pastörizasyondur.

Pastörizasyon genellikle 60–100 °C gibi yüksek ısılarda belirli sürelerde yapılmaktadır. Termal pastörizasyon ve sterilizasyon gıda güvenliği ve korumasında oldukça yaygın olarak kullanılmakta ancak bu işlem sonucunda protein bozulması, enzimatik olmayan kararma, vitamin ve su kaybı gibi istenmeyen fiziksel ve kimyasal değişimler ile besinsel değerlerinde olumsuz etkiler oluşabilmektedir (Ashokkumar, et al., 2008; Lado and Yousef, 2002).

Çözünür katı madde miktarı mikroorganizmaların ısısal direncine etki eden önemli bir parametredir. Meyve suyundaki şeker miktarı da sporların ısısal direncine etki etmekte ve şeker miktarının artışı ile ısısal direnç de artmaktadır. Konsantre meyve

sularında kullanılan SO₂ ve sorbik asidin yüksek oranlarda kullanılmaları bazı patojen sporlarını ısıya duyarlı hale getirmektedir. Bu yüzden konsantre meyve sularındaki sporların normal meyve suyu sporlarına oranla öldürülmeleri zorlaştırılmaktadır (Splittstoesser, et al., 1998). Müller ve arkadaşları (2001) elma, üzüm ve portakal suyu ile yaptıkları araştırmalarda bazı patojen bakterilerin gelişiminde O₂ içeriğinin de önemli olduğu ve O₂ bağlayıcısı olarak kullanılan askorbik asitin meyve suyu bozulmasını sınırladığı belirlenmiştir (Müller, et al., 2001).

Meyve suları genellikle pastörize edilerek veya koruyucular (sorbik asit, fumarik asit, sitrik asit gibi) kullanılarak tüketime sunulmaktadır. Çoğu meyve organik asitler bakımından zengindir. Turunçgiller ve çilek gibi etli, zarlı, kabuksuz meyvelerde bulunan başlıca organik asit sitrik asittir (Lund, et al., 2000). Asitlik düzenleyiciler, proses, lezzet ve güvenlik için asitliği ya da alkaliliği değiştirmek ve kontrol etmek için kullanılır. pH'ın yetersiz kontrolü, sağlık riski yaratabilecek bakterilerin gelişimine neden olabilir. Sitrik, asetik ve laktik asit gibi pH düzenleyici olarak kullanılan organik asitler, mikrobiyal gelişimi yavaşlatır ya da durdururlar (Davidson, 2001). Böylece pH'ları 5'ten düşük olan portakal ve limon gibi asitli meyveler kahverengiye dönüşmezler. Gıda endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan pH kontrol ajanı sitrik asittir. Askorbik asit (C vitamini), antioksidanların çalışmasını güçlendirir ve meyvelerin renginin kahverengiye dönmesini engeller; aynı zamanda bira ve reçel üretiminde pH düşürücü olarak da kullanılmaktadır. Sitrik asit, şekerin kristalleşmesini engellemek için şekerleri ve şekerlemeleri stabilize etmede de kullanılır. Sitrik asit, karboksilik asitlerden, renksiz, kristal yapılı organik bir bileşiktir. Formülü C₆H₈O₇ şeklindedir. Hemen hemen tüm bitkilerde ve birçok hayvanın vücut sıvısında bulunur ve pH değeri 3,5'dur. Sitrik asit çoğu meyvede ve özellikle portakal ve limon gibi narenciye meyvelerinde doğal olarak bulunan diğer adı "limon asidi" olan bir asittir. Toksikolojik araştırmalar sitrik asidin zararlı olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, yalnız Türkiye'de değil, ABD ve AB ülkelerinde de asitlendirici katkı olarak kullanılmasına izin verilmektedir.



Sitrık Asit

Şekil 2. 1. Sitrık asitin kimyasal formülü.

Portakal, elma gibi düşük pH' lı meyve sularına %0,5–2 oranlarında sitrik asit eklenerek, 22 °C' de 60 dakika bekletilmesi sonucunda *E. coli* O157:H7 sayısında yaklaşık 1,2 logaritmik bir azalma belirlenmiştir (Mosqueda-Melgar, et al., 2008b).

Gıda üretimi ve hijyendeki modern ilerlemelere rağmen gıda güvenliğinden doğan önemli sağlık sorunları meydana gelmektedir. Tahminen her yıl dünya nüfusunun % 30 kadar bir kısmı gıda kaynaklı hastalıklara yakalanmaktadır ve 2000 yılında en 2 milyon insan, 2009 yılında da 1,1 milyon yetişkin ile 1,5 milyon 5 yaş altı çocuk ishalden hayatını kaybetmiştir (WHO, 2002; Burt, 2004; Shephard, 2008). Bu nedenle gıda patojenlerini azaltan ya da yok eden daha etkili yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Leistner, 1978).

Son yıllarda yüksek ısı kullanılmayan yöntemler gıda güvenliği için önemli hale gelmiştir. Tüketicilerin daha az duyuşal ve besinsel kayıp isteklerinin artması ısısız tekniklere alternatif olan gıda koruma tekniklerine olan ilgiyi arttırmıştır (Gould, 2001). Isısız olmayan yeni gelişmiş yöntemler ise gıdanın daha taze kalıp, lezzet ve dokusunu bozmamaktadır (Lado and Yousef, 2002; Ashokkumar, et al., 2008).

Sıcaklığın kullanılmadığı koruma yöntemleri şunlardır:

- High hydrostatic pressure/Yüksek hidrostatik basınç (HHP): Katı ve sıvı gıdaların ambalajlı veya ambalajsız olarak 1.000–8.000 atm arasında uygulanan yüksek basınçlara maruz bırakılmasını kapsayan bir işlemdir (Anonim, 2007).

Et, balık, kabuk deniz ürünleri, istiridye, meyve suyu, reçel, soslar, pirinç ürünleri, süt ve süt ürünlerinde bu yöntem kullanılabilir ve *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Vibrio ssp.*, *Salmonella ssp.*, *E. coli* O157:H7 ve farklı gıda patojenleri üzerine etki gösterebilmektedir. Ancak bu uygulama bazı

durumlarda protein jelleşmesini arttırabilmektedir (Butz and Tauscher, 2002; Kosekiand Yamamoto, 2006; Gao, et al., 2007; Calik, et al., 2002; Smidy, et al., 2005; Ishii, et al., 2005; Malone, et al., 2006; Bowman, et al., 2006).

- High homogenisation pressure/Yüksek basınçlı homozenizasyon (HPH): Sıvı, çok kısa bir mesafede çok yüksek bir hıza (1000 km/saat'in üzerinde) ulaşır. Çok yüksek kayma gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri, partikülleri mikron altı büyüklüğe parçalar. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Mehnert and Mader, 2001).

Bu koruma yöntemi süt ve süt ürünleri, soya sütünde, mayonez ve meyve sularında kullanılabilen ve mayalar, patojenler, sporlu mikroorganizmalar üzerine inaktive edici etki göstermektedir. Lor sertliği ve pıhtılaşma süresinin kısalması üzerine olumlu etkilerinin yanında süt ve ayçiçeği yağında viskozite ile protein değişimleri meydana getirebilmektedir (Diels and Michiels, 2006).

Çiğ kıymada bulunan *E. coli* O157:H7' ye, 15 °C' de 700 MPa basınçın 1 saat boyunca uygulanması başta 5,9 olan canlı hücre sayısında 5 logaritmik birim azalma sağlamıştır (Gola, et al., 2000). Sitrat tamponunda, düşük pH (3,0-4,0) ile kombine olarak uygulanan basınçta yaklaşık 10^7 kob/mL konsantrasyonundaki *L. monocytogenes* 30 dakika içinde etkisiz hale getirilmiştir (Stewart, et al., 1997).

- Pulsed electric fields/Vurgulu elektrik alanı (PEF): İki elektrot arasına konulan gıdaya 20 - 80 kV/cm arası yüksek voltaj uygulanmasını kapsar. Gıdalarda mikroorganizma ve enzimleri inaktivasyon amaçlı da kullanılabilir. İnaktivasyon ancak eşik bir elektrik alan yoğunluk değeri aşıldıktan sonra gerçekleşebilir.

PEF teknolojisi domates, elma ve portakal gibi meyve sularında, sıvı yumurta, süt, yoğurt, kayısı nektarları ve çorbaların raf ömrünü uzatmada başarıyla kullanılmaktadır (Alvarez and Ji, 2003; Sepulveda, et al., 2005; Nyugen and Mittal, 2007; Schilling, et al., 2007). Bu yöntem sıvı-katı ya da sıvı-gaz fazını birlikte içeren gıdalara uygulanması durumunda gıdanın fiziksel

özelliklerinde bozulma söz konusu olabilir (Jeyamkondan, et al., 1999; Qin, et al., 1994). *Lactobacillus brevis*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium expansum*, *Salmonella ssp.*, *E. coli* O157:H7 üzerine inaktive etki gösterebilmektedir (Schilling, et al., 2007; Toepfl, et al., 2007; Elzez-Martinez, et al., 2005; Evrendilek, vd., 2008; Nyugen and Mittal, 2007).

- High power ultrasound/Yüksek ses dalgası: 20 kHz ve daha yüksek ses dalgalarının uygulanmasıyla gerçekleştirilen mikroorganizma gelişimini engelleyici yöntemdir. Temelinde kavitasyon yaparak mikroorganizmayı engellemek hedeflenir (Piyasea, et al., 2003).
- İrradiation/Işınlama: Gıdalardaki mikroorganizmaları, sporları, virüsleri veya böcekleri yok etmek için iyonize radyasyon ile ışınlama yöntemidir. Et, deniz ürünleri, meyve ve sebzelerde kullanılabilir. Gıda Işınlama işlemi; Kobalt-60 gama ışınları, elektronik olarak hızlandırılmış elektron demetleri ve x-ışınları ile gerçekleştirilmektedir (Alkan, 2006). Gıdaların ışınlanma ile korunması bir soğuk proses olduğundan, gıdanın kalitesinin korunmasında diğer yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır (Anonymus, 1988). Ancak hem pahalı bir yöntem oluşu hem de kontamine olmuş gıdadaki bakterileri yok etse de, toksinleri yok edemeyişi ve radyasyon ile bakteride direnç oluşturabilmesi nedeniyle dezavantajlarıdır (Ohlsson and Bengtsson, 2002; Morehouse Kim, 1998). Özellikle gıda patojeni olan *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu için kullanılmaktadır.

2. 2. 1. Alternatif gıda muhafaza yöntemi olarak ultrasound (sonikasyon)

Sonikasyonun en basit şekilde tanımlanması 20 kHz ve daha fazla frekansta olan ses dalgalarıdır (Butz and Tauscher, 2002).

Ultrasound, elektrik enerjisinin insan kulağının duyamayacağı yüksek frekanstaki (20 kHz–10 MHz) ultrasonik ses dalgasına dönüşebilmesiyle gerçekleşir. Bu uygulama ses yoğunluğu ve frekansının çıkışına bağlıdır (McClement, 1995;

Leighton, 1998; Willamiel and Jong, 2000). 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).

Ultrasoundun değişik frekanslarının kullanıldığı farklı kullanım alanları mevcuttur. Son zamanlarda gıdalar üzerine yapılan birtakım testlerde mikroorganizmalar üzerinde öldürücü olmayan düşük frekanstaki kullanımları oldukça yaygınlaşmıştır. Kullanılan bu düşük frekans 100 kHz ile 1 MHz arasında olan frekanslardır ve bu işlemlerde cm^2 'ye 1W 'ın altında bir güç uygulanır. Bu düşük yoğunluktaki ultrasound gıdalarda dayanıklılık, olgunlaşma, şeker kapasitesi, asidikliği, vb. gibi birtakım fizikokimyasal testleri yapmakta kullanılmaktadır (Demirdöven ve Baysal, 2009). Bunların yanı sıra canlı hücrelerin aktivitesinin stimülasyonu, enzime etkileri, gıda yüzeyinin temizlenmesi, ultrasound yardımı ile ekstraksiyon, kristalizasyon, emülsifikasyon, filtrasyon, kurutma, dondurma gibi işlemler ile etin yumuşatılması gibi işlemlerde de kullanılmaktadır (Behrend and Schubert, 2001; Mason and Luche, 1996). Yüksek enerjili ultrasound uygulamalarında ise $1\text{ W}/\text{cm}^2$ 'den daha yüksek yoğunluğundaki ve 18 ile 100 kHz arası frekanslarda güç uygulanır. Bu uygulama sıvı gıdaların gazlarının alınmasında, oksidasyon ve redüksiyon testlerinin yapılmasında, enzim ve proteinlerin ekstraksiyonlarında, enzim inaktivasyonlarında, nükleasyon indüklenmesinde ve kristalizasyon işlemleri için kullanılmaktadır (Paul et al., 1997).

Ultrasound dalgalar anne karnındaki fetüsün gelişiminin görüntülenmesine benzer bir şekilde sebzelerin, meyveleri ve yumurta gibi dış kabuklarının zarar görmemesi gereken bazı besinlerin iç kalitelerini ve gizli çürüklerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Mizrach, et al., 1994). Ayrıca, petrokimyasal, polimer, kimyasal, ilaç ve kozmetik sektöründe ticari amaçlı olarak kullanılmakta olmasına rağmen son zamanlarda meyve suyu, mayonez ve ketçap gibi gıdalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Canselier, Delmas, Wilhelm and Abismail, 2002).

Genellikle ultrasoundlar 20 kHz ile 10 MHz arasında frekanslarda uygulanmaktadır. Ancak gıdalardaki mikrobiyal gelişimi engellemek amacı ile kullanılmakta olan ultrasound, kavitasyon yaparak mikroorganizmayı engelleyen “Power Ultrasound” dur ve bu cihazlar ile işlemler sırasında 20 kHz ile 100 kHz arası şiddet uygulanmaktadır (Piyasea, et al., 2003).

Ultrasound uygulamalarındaki ses alanında oluşan enerji miktarı ses kuvveti (W), ses şiddeti (W/m^2) ve ses enerji yoğunluğu (W/m^3) olarak belirtilebilir (Knorr, et al., 2004).

Gıda koruma amaçlı ultrasound, sıvı gıdaların korumasında kullanılabilen ve temelinde yüksek ses dalgasının kullanıldığı bir yöntemdir (Villamiel et al., 1999).

Çizelge 2. 1.’ de çeşitli mikroorganizmaların inaktivasyonları için ultrasoundun uygulanabildiği bazı sıvı ortamlar verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Mikroorganizmaların ultrasound ile inaktivasyon ortamları.

Organizma	Ortam	Kaynak
<i>Legionella pneumophila</i>	Seyreltilmiş su	Dadjour et al., 2006
<i>Escherchia coli</i>	Süt, meyve suyu	Zenker et al., 2003
<i>Escherchia coli</i>	Tuzlu ortam	Duckhouse et al., 2004
<i>Escherchia coli</i>	Su	Furuta et al., 2004
<i>Faecal coliforms ve streptococci</i>	Atık sular	Blume and Nies, 2004
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Süt, meyve suyu	Zenker et al., 2003
<i>Salmonella sp.</i>	Sitrat-fosfat tamponu, Nutrient Broth	Alvarez et al., 2006
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Triptic Soy Broth	Villamiel and de Jong, 2000
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Triptic Soy Broth	Villamiel and de Jong, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Su, Sabaroud Dextrose Broth	Borthwick et al., 2005
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Tuzlu ortam	Yap et al., 2007b
Tanımlanmamış organizmalar	Portakal suyu	Valero et al., 2007
<i>Aspergillus flavus</i>	Sabaroud Dextrose Broth	Lopez-Malo, et al., 2005
<i>Penicillium digitatum</i>	Sabaroud Dextrose Broth	Lopez-Malo, et al., 2005
<i>Cryptosporidium parvaum</i>	Su	Tsukamoto et al., 2004

2. 2. 1. 1. Ultrasound ile mikrobiyal inaktivasyon

Ultrasoundun bakterisidal etkisi intasellüler kavitasyon ile ilgilidir. Kavitasyon ile kabarcık oluşumuna dayanan bu olay genellikle mikrobiyal hücreyi öldürmektedir (Piyasena, et al., 2003). Kavitasyon sırasında içleri gaz dolu yüksek enerjili küçük baloncuklar meydana gelir (Leighton, 2007). Ultrasound sırasında bu mikroskobik baloncukların patlamalarıyla mekanik bir şok oluşur. Bu şok dalgaları kinetik enerjiye dönüşerek bir ses dalgası ve titreşim oluştururlar. Oluşan ses dalgaları 570 km' lik hızla hareket ederler. Patlamalarda baloncukların çevrelerindeki moleküllerin birbirleriyle çarpışmaları sonucunda yüksek ısı (5500 °C) ve basınç (50 Mpa) noktaları oluşur (Leighton, 1998). Oluşan bu mekanik şok ile hücredeki yapısal ve fonksiyonel yapılar parçalanarak hücre parçalanması gerçekleşir (Skauen, 1976). Sıvı bir ortama uygulanan ultrasound ile sıvının alanda hareketiyle kavitasyon baloncukları patlar ve OH⁻ ve H⁺ reaktif radikalleri üretilir. Bu radikallerin oksijen ile reaksiyona girmesiyle H₂O₂ (hidrojen peroksit) meydana gelir (Lea, et al., 2005; Şahin, vd., 2004). Yoğun kabarcık oluşumu, sıcaklık ve basınç değişimlerini engelleyerek serbest radikal oluşumuyla DNA yıkımı, hücre zarı parçalanması ve hücre duvarı bozulmasını gerçekleştirir (Manvell, 1997). Yüksek ultrasound protein bozulmalarına ve serbest radikallerin oluşumlarına sebep olabilmesiyle meyveli yada yüksek yağlı yiyeceklerde olumsuz etki yapabilmektedir (Williams, 1994; Sala, et al., 1995).

Ultrasound ile inaktivasyon, vejetatif hücreler üzerine oldukça etkili olmasına rağmen ultrasoundun tek başına sporlar üzerine bir etkisi yoktur. Kullanılan diğer yardımcı yöntemler sporların inaktivasyonunu arttırabilmektedir (Anonymus, 2000).

Valero ve ark.' larının (2007) yaptığı çalışmada, 1,4 litre portakal suyuna 500 kHz' lik frekansta ve 250 W gücünde 15 dakika boyunca sonikasyon uygulanmıştır. Uygulama sonucunda toplam mezofilik aerobik bakteri sayısında 1,08 logaritmik birim azalma gözlenmişken aynı uygulamada maya ve küf sayısında önemli bir azalma meydana gelmediği belirtilmiştir.

Son yıllarda ultrasoundun gıdalardaki etkileri *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* ile yapılan çalışmalarda 5 ve 6 log cfu/mL altında azalmalarla önemli sonuçlar elde edilmiştir (D'Amico, et al., 2006).

2. 2. 1. 2. Ultrasound ile inaktivasyonu etkileyen faktörler

Gıda içindeki bakteri hücreleri ya da sporları ultrasonik inaktivasyona süspansiyon halde olduklarından çok daha fazla direnç göstermeleri ve gıdaların çoğunun da heterojen yapıda ve çok farklı bileşimlerde olmaları, ultrasoundun gıda güvenliğinde mikrobiyal gelişimi engellemek amacı ile kullanımlarında verimi düşürebilmektedir. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için diğer gıda koruma yöntemleri (sıcaklık, basınç, vb.) ile kullanmak endüstriyel açıdan ultrasoundun kullanımları için büyük potansiyel oluşturmaktadır (Anonymus, 2000).

Ultrasound kullanımını ve verimini etkileyen birtakım faktörler bulunmaktadır. Bunlar:

- Ultrasound dalgalarının büyüklüğü yani amplitüd,
- Mikroorganizma ile etki ettiği süre,
- Mikroorganizmanın türü,
- Gıdanın yapısı,
- Ultrasoundun uygulandığı sıcaklık.

Ultrasound ile beraber antibiyotik, sıcaklık, hipoklorid, TiO₂ fotokatalaz veya UV ışınları gibi çeşitli dezenfektanların kullanımının etkileri araştırılmaktadır (Peterson and Pitt, 2000; Villamial and Jong, 2000; Lopez-Malo et al., 2005; Alvarez et al., 2006; Duckhouse et al., 2004; Dadjour et al., 2006; Blume and Neis, 2004). Düşük şiddetli ultrasounun gentamisin ile beraber kullanımında *Escherichia coli* üzerinde etkisi (Peterson and Pitt, 2000) ve 20 kHz şiddetindeki ultrasoundun etkisi de 45 – 60 °C sıcaklıkla beraber *Aspergillus flavus* ve *Penicillium digitatum* sporları üzerine etkisi artmaktadır (Lopez-Malo et al., 2005). Ultrasound ve UV' nin birlikte kullanımını *E. coli* ve toplam koliform inaktivasyonunda sinerjistik bir etki göstermektedir (Naddeo, et al., 2009).

Kavitasyon oluşabilmesi için ultrasonik frekans değerinin 2,5 MHz' in altında olması gerekmektedir (Allinger, 1975).

Ultrasonik dalgaların amplitüdünün yükselmesi, birim zamanda patlayan kavitasyon baloncuklarının sayısının artışına, bu da mikrobiyal inaktivasyonun artmasına sebep olmaktadır (Suslick, 1988, 1990).

Patlama yoğunluğu, yüksek basınçlarda daha kuvvetli olmasına rağmen, patlayan baloncuk sayısı daha azdır. Bu yüzden belirli bir basınç değerinin üzerinde ultrasoundun öldürücü etkisi azalmaktadır (Whillock and Harvey, 1997).

Ultrasounda karşı vejetatif hücrelerin dirençlerinin farklı olmalarına rağmen, hidrostatik basınç ve amplitüd düzeyinin inaktivasyon etkisinin mikroorganizmadan bağımsız olduğu belirtilmiştir (Pagan, et al., 1999b).

Pek çok vejetatif hücrenin inaktivasyonunda basınç altında ve ısı ile uygulanan ultrasoundun additif etkili olduğu belirlenmiştir (Pagan et al., 1999b; Raso, et al., 1998b). Bu şekilde kombine uygulamalar *Streptococcus faecium* ve *Bacillus subtilis* sporları üzerine sinerjistik etki sağlanmıştır (Raso, et al., 1998a).

2. 3. Doğal Antimikrobiyaller ve Uçucu Yağlar

Şifalı bitkiler ve özellikle bileşenleri çok eski zamanlardan beri çeşitli rahatsızlıkların tedavi edilmesinde güvenli birer kaynak olmuştur (Doble and Hemaiswarya, 2009).

Tüketicilerin geleneksel gıda koruma yöntemlerindeki mikroorganizmaların dirençliliklerine olan endişelerinin ve doğal gıdalara olan taleplerinin artması, gıda korumasında doğal antimikrobiyallerin kullanımlarını arttırmaktadır (Gould, 1995). Yeşil tüketiciler olarak da bilinen tüketicilerin çevreye dost, pahalı olmayan ve kolay bulunabilen, insan sağlığı için toksik etkisi olmayan doğal kaynaklı antimikrobiyal bileşenlere olan talepleri 1990' larda başlamıştır (Burt, 2004).

Sağlık açısından zararsız olarak kabul edilen doğal koruyucular, uçucu yağlar, lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz sistem (fermentasyon), yağ asitleri ve bileşenleri, kitosan ve biyosaklamadır. Bitkisel antimikrobiyal bileşenler genellikle biberiye, adaçayı, kekik ve fesleğen gibi bitkilerin yapraklarından, karanfilin çiçek ve

tomurcuklarından, sarımsak ve soğanın çiçek soğanından, kimyon, rezene ve maydanozun tohumlarından, çadırışağı otunun kök ve gövdesinden, biber ve kakülenin meyveleri ile bitkilerin diğer kısımlarında bulunan uçucu yağlardan elde edilmektedir (Nychas et al., 2003).

Uçucu yağlar birçok bitkiden elde edilebilen aromatik yağlardır. Bunlar doğal antimikrobiyallerin en yaygın olanlarıdır ve antiviral, antibakteriyel, antimikotik, antitoksijenik, antiparazitik ve böcek öldürücü özellik göstermektedirler ve Avrupa Birliği tarafından gıda, parfüm ve ilaç sektöründe bunların kullanımlarına izin verilmektedir (Bauerve Garbe, 1985; Van Welie, 1997; Van de Braak and Leijen, 1999; Burt, 2004).

Uçucu yağların elde edilmesinde hidrodistilasyon (buharlı damıtma) en yaygın kullanılan yöntemdir. Düşük sıcaklıkta yapılan yüksek basınçlı CO₂ ekstraksiyonu duyuşsal olarak oldukça doğal bir etkiye sahip olmasına rağmen kullanımı oldukça pahalıdır (Moyler, 1998).

2. 3. 1. Gıda koruyucu olarak uçucu yağların kullanımları

Bitkilerden elde edilen çoğu uçucu yağ ve uçucu yağ bileşenleri, doğal antimikrobiyaller olarak umut verici olumlu etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda bozulma etmeni ve patojen olan birçok bakteriye karşı bu aktif fenolik grupların antibakteriyel etki gösterdikleri bildirilmiştir (Kıvanç, vd., 1991). Uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenlerinin kullanımı yaygın olmakla beraber gıdalarda lezzeti etkilediği bilinmektedir (Lis-Balchin and Deans.,1997; Alzoreky and Nakahara, 2002).

Antibakteriyel etkili uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri ticari olarak dış kanal tedavisinde, antiseptik olarak ve domuz yavrularının süttten kesilmelerindeki ek besinlerde kullanılmaktadır (Manabe, et al., 1987; Bauer and Garbe, 1985; Cox, et al., 2000; Van Krimben and Binnendijk, 2001; Ilsley, et al., 2002).

Taze sebze ve meyvelerde koruyucu olarak uçucu yağlar kullanılabilir (Ayala-Zavala, et al., 2008a). Farklı uçucu yağ ve bileşenlerin gıda koruyucu olarak

kullanılabilirliği yasal olarak kayıtlıdır (Ayala-Zavala, et al., 2008a; Fisher and Philips, 2008). Tüketici sağlığı açısından risk taşımayan yasal kullanımlı bileşenler arasında ilk sırada carvacrol, carvane, cinnamaldehyde, citral, p-cymene, eugenol, limonene, menthol ve thymol yer almaktadır (Nychas, 1995; Zeller and Rychlik, 2007).

2.3.2. Uçucu yağların etki mekanizması

Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri içerdikleri fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Davidson, 2001; Nychas, 1995; Lopez-Malo, et al., 2005; Sofos, et al., 1998; Wilkins, et al., 1989). Ancak etki mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Juven, et al., 1994).

Gıda patojeni ve saprofitlere karşı uçucu yağların etkilerini araştıran çoğu çalışma, genel olarak uçucu yağların Gram (+) bakterilere karşı Gram (-) bakterilerden daha etkili olduklarını göstermektedir. Gram (-) bakterilerin uçucu yağlara daha dirençli olmaları hücre çeperlerinin farklı olması ile açıklanabilir (Branen et al., 1980; Zaika, 1988; Mangena and Muyima, 1999; Marino et al., 2001; Altieri et al., 2008b). Çünkü Gram (-) bakterilerin lipopolisakkarit hücre duvarı etrafında dış membran bulunmakta bu da uçucu yağların ve yağ asitlerinin hücre duvarına ulaşımını engellemektedir (Moleyar and Narasimhan, 1992; Wan et al., 1998; Davidson and Naidu, 2000; Lambert et al., 2001; Walsh et al., 2003).

Uçucu yağların mikroorganizmalar üzerine etkilerinin bileşenlerin kimyasal yapıları, nicelikleri ve birbirleri ile olan etkileşimleri ile alakalı olduğu düşünülmektedir (Dorman and Deans, 2000; Marino et al., 2001; Delaquis et al., 2002). Farklı uçucu yağların belirli oranlarda kombine edilerek kullanımlarının, tek tek kullanımları ile gösterdikleri mikrobiyal etkilerden daha az olması durumunda antogonizm gözlenir. Uçucu yağların kombine kullanımlarındaki etkileri bireysel etkilerin toplamından daha büyük olduğunda ise sinerji gözlenir (Davidson and Parish, 1989). Bazı araştırmalar, bütün uçucu yağların, ana bileşenlerinden daha fazla sinerjistik etkiye ya da etkileme potansiyeline sahip olabilen antibakteriyel etkili küçük bileşenler içerdikleri sonucuna varmıştır (Gill et al., 2002; Mourey and Canillac, 2002).

2. 3. 3. Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri

Uçucu yağlar altmıştan fazla bileşen içerirler. Bunların %15' lik kısmı kombine olarak antibakteriyel etkilerde önemli rol oynarlar (Burt, 2004).

Uçucu yağlar hem Gram (+) bakterilere hem de Gram (-) bakterilere antimikrobiyal etki gösterebilirler (Gutierrez, et al., 2008; Chorianopoulos, et al., 2004). Kekik, tarçın, karanfil ve limondan elde edilen yağlar birçok mikrobiyal gruba etkilidir (Kim, et al., 2004; Skandamis, et al., 2002).

Nanedeki uçucu yağ ve farklı bileşenlerin kullanıldığı bir çalışmada, etin mikrobiyal engelleyici olan nane yağını yüksek oranda desteklediği bildirilmiştir. Çünkü, mikroorganizmaların hidrofilik ortamlarda bölünebilmemesine rağmen, nane yağı hidrofobik yapıdadır ve yağlı besinlerde daha iyi çözünür. Bu yüzden etteki yağ ve protein oranının yüksek olması bu reaksiyonda antimikrobiyal ile hedef arasında önemli rol oynamıştır. Buna ek olarak gıdaların pH seviyeleri de yağların aktiviteleri için çok önemli faktördür (Tassou, et al., 1995; Burt, 2004).

Taze elma suyunda (pH' 4,3), %0,7 oranında cinnamon yağının 5 °C' de *E. coli* O157:H7 sayısını 3 dakikada 4 logaritmik birim azaltmış ve 30 dakika sonunda da bakterileri tamamen inaktive etmiştir (Raybaudi-Massillia, et al., 2008c).

Limon yağının %0,2 oranında karışık meyve suyuna (elma, kayısı, üzüm, şeftali ve kivi) 17 dakika direk uygulanması *E. coli* ve *S. cerevisiae* bakterilerini tamamen inaktive etmiştir (Lanciotti et al., 2004).

Elma suyuna %0,5 oranında eklenen citral, 14 dakikada *E. coli* O157:H7 sayısında 4 logaritmik birim azalma sağlamış ve 30 dakikada bakterileri tamamen inaktive etmiştir (Raybaudi-Massillia, et al., 2008c).

Çeşitli uçucu yağ ve uçucu yağ bileşenleri ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları Çizelge 2. 2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 2. Bazı uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal etkileri.

Uçucu yağ	Temel bileşenleri	Antimikrobiyal etki ettikleri bakteriler	Aroma özellikleri	Kaynak
Sarımsak kökü (<i>A. sativum</i>)	Methyl disulfide, allyl sulfide, allyl disulfide, allyl trisulfide, trimethylene trisulfide, allyl tetrasulfide	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. enterica serovars</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. Faecalis</i> ,	Keskin, baharat	(Ross, et al., 2001; Ayala-Zavala, et al., 2008c)
Tarçın (<i>C. zeylanicum</i>)	Cinnamaldehyde, eugenol, copaene, β -caryophyllene	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Salmonella Sp.</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>	Tatlı, odun, baharat	(Chang, et al., 2001; Guynot, et al., 2003; Ayala-Zavala, et al., 2008c)
Kekik (<i>T. vulgaris</i>)	Thymol, p-cymene, γ -terpinene, linalool	<i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella sp.</i>	Baharat, limon, odun	(Hammer, et al., 1999; Guynot, et al., 2003; Lee, et al., 2005)
Mercanköşk (<i>O. vulgare</i>)	Sabinyl monoterpene, terpinen-4-ol, γ -terpinene, carvacrol, thymol	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. niger</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella sp.</i>	Baharat, bitki	(Charai, et al., 1996; Hammer, et al., 1999; Elgayyar, et al., 2001; Burt, 2004)
Karanfil (<i>E. aromaticum</i>)	Eugenol, eugenyl acetate, caryophyllene	<i>B. brevis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Tatlı, baharat, odun	(Akgül ve Kıvanç, 1988; Hammer, et al., 1999; Guynot, et al., 2003; Burt, 2004)

Çizelge 2. 2. Bazı uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal etkileri (devamı).

Fesleğen (<i>O. bacillicum</i>)	Linalool, methylchavicol, eugenol, methyl eugenol, methyl cinnamate, 1,8-cineole, caryophyllene	<i>B. brevis</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. Corylophilum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. plantarum</i>	Taze, tatlı, bitki, baharat	(Hammer, et al., 1999; Elgayyar, et al., 2001; Guynot, et al., 2003; Opalchenova and Obreshkova, 2003)
Kişniş (<i>C. sativum</i>)	2(E)-decanal, 2(E)dodecenal, linalool	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. aureus</i>	Tatlı, çiçek, baharat, limon	(Elgayyar, et al., 2001)
Limon (<i>Citrus</i> sp.)	Limonene, linalool, citral	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. chrysogenum</i>	Tatlı, limon	(Viluda-Martos, et al., 2007,2008)
Defne (<i>L. nobilis</i>)	1,8-cineole, α -terpinyl acetate, linalool, methyl eugenol	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. faecalis</i>	Taze, bitkisel, baharat	(Demo and de las Mercedes Oliva, 2009)
Zencefil (<i>Z. officinale</i>)	β -sesquiphellandrene, zingiberene	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Baharat, keskin	(Hammer, et al., 1999; Guynot, et al., 2003)
Biberiye (<i>R. officinalis</i>)	Borneol, verbenone, camphor, a-pinene, 1,8-cineole	<i>A. flavus</i> , <i>Salmonella</i> sp, <i>P.corylophilum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. Plantarum</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. niger</i>	Taze, bitki, reçine	(Hammer, et al., 1999; Elgayyar, et al., 2001; Guynot, et al., 2003; Burt, 2004)
Nane (<i>M. piperita</i>)	Menthol, menthone, menthyl acetate, menthofurane	<i>B. brevis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>V. choleraei</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. flavus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. corylophilum</i>	Taze, bitki	(Hammer, et al., 1999; Guynot, et al., 2003)

Limon uçucu yağının değerinin 100-150 ppm olduğu ve malolaktik fermentasyonda (*Lactobacillus plantarum* ve *Oenococcus oeni*) mikroflora kontrolünü ve *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus sp.*, *Pichia subhelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida lusitanae* gibi bozulma etmeni mikroorganizmaları engelleyici olduğu kanıtlanmıştır. Uçucu yağların birçok gıdada kullanılabilir olmasına rağmen %1–3 oranında kullanılmaları uygundur. Bu değerlerin üstündeki kullanımlar gıdalarda istenmeyen duyuusal etmenlere sebep olabilirler (Conte, et al., 2007a/b).

Çizelge 2. 3. *E. coli* ve *L. monocytogenes* ile yapılan çalışmalarda bazı uçucu yağların MIC aralığı.

Uçucu yağın elde edildiği bitki	Bakteri türü	Yaklaşık MIC aralığı	Kaynak
Biberiye	<i>E.coli</i>	4,5 - >10	(Farag et al., 1989; Smith et al., 1998; Hammer et al., 1999; Pintore et al., 2002)
Mercanköşk	<i>L.monocytogenes</i>	0,2	(Smith et al., 1998)
	<i>E.coli</i>	0,5 - 1,2	(1995; Hammer et al., 1999; Burt and Reinders, 2003)
Lemongras	<i>E.coli</i>	0,6	(Hammer et al., 1999)
Adaçayı	<i>E.coli</i>	3,5 – 5	(Farag et al., 1989; Smith et al., 1998; Hammer et al., 1999)
	<i>L.monocytogenes</i>	0,2	(Smith et al., 1998)
Karanfil	<i>L.monocytogenes</i>	0,3	(Smith et al., 1998)
	<i>E.coli</i>	0,4 - 2,5	(Farag et al., 1989; Smith, et al., 1998; Hammer,et al., 1999)
Kekik	<i>L.monocytogenes</i>	0,156 – 0,145	(Firouzi et al., 1998; Smith et al., 1998; Cosentino,et al., 1999)
	<i>E.coli</i>	0,45 – 1,25	(Firouzi et al., 1998; Smith et al., 1998; Cosentino et al., 1999; Hammer et al., 1999)
Hint safranı	<i>E.coli</i>	> 0,2	(Negi et al., 1999)
Tea bush	<i>E.coli</i>	2,5 - >80	(Bassole et al., 2003)

Tarçın, limon ve karanfil yağının %0,07 oranları veya bunların aktif bileşenlerinin %0,05 oranında fuji elması suyunda kullanımları *E. coli* O157:H7 popülasyonunun gelişimini engelleyerek canlı hücre varlığını 4 logaritmik birim

azalttığı belirtilmiştir. Kekik yağı ise elma suyunda *L. monocytogenes* inaktivasyonunda etkilidir ve 4 logaritmik birim oranında canlı hücre sayısında azalma sağlamaktadır (Rayboudi-Massilia, et al., 2008c)

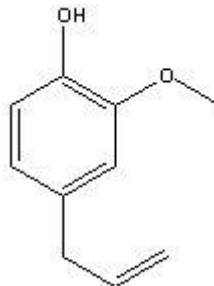
Eugenia aromatica bitkisinden elde edilen karanfil yağının ana bileşeni olan eugenolün ağrı kesici, kısmi uyuşturucu, iltihap önleyici ve antibakteriyal etkisi vardır. Dişçilikte dolgu maddelerinde kullanım alanları vardır ve dolgu maddesinde, geçici kapaticılarda ve onarıcı maddelerde kullanılabilir. Uçucu yağlar içinde yer alan eugenol ilaç ve gıda maddelerine eklenebilmekte ve sağlık açısından hiçbir olumsuz etkisi bulunmamaktadır. Gıda kaynaklı patojen olan *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* üzerine antibakteriyal etkisi vardır (Blaszyk and Holley, 1998). Ayrıca *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei* ve *Helicobacter pylori* üzerinede antibakteriyal etkilidir (Friedman, et al., 2002; Walsh, et al., 2003).

Eugenol, carvacrol ve cinnamaldehyde karışımlarının birçok bakteri türüne karşı etkili olduğuda bilinmektedir (Didry, et al., 1993).

Yaygın gıda koruyucu olarak kullanılmakta olan bazı uçucu yağlar şunlardır:

I. Eugenol

Eugenol; karanfil ve bazı diğer baharatlarda bulunan bir aroma bileşenidir. Karanfil, %15'e kadar eugenol içerir. Eugenol, karanfile karakteristik kokusunu veren antioksidatif bir bileşenidir. Yapılan bir çalışmada karanfilin gıda oksidanları olan BHT (bütilendirilmiş hidroksi toluen) ve BHA (bütilendirilmiş hidroksi anisol) kadar güçlü antioksidatif etki gösterdiği ortaya konmuştur (Lean and Suhaila, 1999).



Eugenol

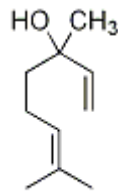
Şekil 2. 2. Eugenol'ün kimyasal yapısı.

Eugenol suda çözünmez, fakat alkolde veya yağda kolayca çözünebilir. Eugenolun bir diğer etkisi de ağrı kesici görevi görmesidir. Bu yüzden ki karanfil uzun zaman diş ağrılarında ağrı kesici olarak kullanılmıştır. Ağrıyan dişin üzerine konulan bir karanfil ağrıyı büyük ölçüde keser. Eugenol çok toksik bir madde olmamakla birlikte, akut toksik dozu birkaç gram/ kg vücut ağırlığıdır. Bu da yaklaşık olarak tek dozda 100 gram karanfile denk gelir. Eugenol' ün gıdalarda kullanımı ile patojenlerin gelişimlerinde önemli azalmalar gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, Eugenol' ün *E. coli*' de 1 µl/ml, *S. typhimurium*' da ve *L. monocytogenes*' de ise 0,5 µl/ml MIC aralığı olduğu gözlenip, bu değerlerde patojen gelişimini durdurduğu gözlenmiştir (Kim, et al., 1995a). Ayrıca et ve tavuk ürünlerinde 5–10 µl/ml oranında kullanımının *L. monocytogenes* gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Hao, et al., 1998a).

Yıkama suyuna Eugenol' ün %0,5 oranında eklenmesi, pH' ı 4,3 olan elmalarda ve pH' ı 6,06 olan kavunlarda 5 °C' lik ortamlarda, 30 ve 21 dakika sonunda *E. coli* O157:H7 ve mevcut bakteri sayısında 4 ve 3,5 logaritmik birim azalma sağlamıştır (Raybaudi-Massilia, et a., 2008b/c). Aynı zamanda yıkama suyunda %0,02–0,05 oranlarında kullanımları pH' ı 3,7 olan elmada 37 °C' de 1 saatte *E. coli* O157:H7 sayısında %50 azalma sağladığı belirlenmiştir (Friedman, et al., 2004).

II. Linalool

Kişiş tohumlarında %0,2–1,5 arasında değişen oranlarda uçucu yağ bulunmaktadır. Uçucu yağı %60–70 oranında Linalool içermektedir. Tohumlarda ayrıca %11–22 sabit yağ bulunduğundan, uçucu yağı alındıktan sonra sabit yağın elde edilmesinde kullanılır (Arslan ve Gürbüz, 1994).



Linalool

Şekil 2. 3. Linalool' ün kimyasal yapısı.

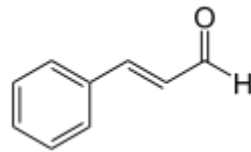
Linalool' ün farklı konsantrasyonlarda inhibe edici etki gösterdiği bazı bakteriler ve MIC aralıkları Çizelge 2. 4.' de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 4. Linalool' ün bazı mikroorganizmalardaki MIC değerleri.

Mikroorganizma	MIC konsantrasyonu (mg/ml)	Kaynak
<i>Staphylococcus aerous</i>	0,2 – 2,5	Sonboli, et al., 2005
<i>Shigella sonnei</i>	0,1 - % 10	Bagamboula, et al., 2004
<i>Escherichia coli</i>	6,25	Kubo, et al., 2004
<i>Arcobacter butzleri</i>	%0,06	Fisher, et al., 2007

III. Cinnamaldehyde

Tarçına (cinnamon) acı tadını veren yağ asitlerinin içinde 3 adet faydalı kimyasal bileşen bulunmaktadır. Bunlar cinnamaldehyde, cinnamyl asetate ve cinnamyl alcohol'dür. Yiyeceklere ilave edildiklerinde mikropların üremesini önlediğinden uzun süre taze kalmasını sağlayabilmektedir. Havuç suyuna birkaç damla tarçın uçucu yağı eklenmesiyle buzdolabında 60 gün bozulmadan saklandığı belirlenmiştir. Tarçın uçucu yağı eklenmeyen kontrol grubunda patojenlerin geliştiği gözlenmiştir (Valero and Salmeron, 2003).



Cinnamaldehyde

Şekil 2. 4. Cinnamaldehyde' in kimyasal yapısı.

Cinnamaldehyde' in balık ürünlerinde %0,15–3 oranlarında kullanımı ile *Pseudomonas putida* sayısında azalma meydana geldiği ve sebzelerde 200–600 µl/L kullanımının ise altı *Salmonella* türünde 50 °C' de antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Quattara, et al., 2001; Weissinger, et al., 2001). Ayrıca

Cinnamaldehyde' in 0,15 µl/ml dozlarında düşük pH' lı meyvelerde, yüksek pH' lı meyvelere oranla daha koruyucu olduğu belirlenmiştir (Roller and Seedhar, 2002).

%0,5 oranında Cinnamaldehyde kullanımı ile pH' ı 4,3 olan elma suyunda 5 °C' de 3 dakika sonunda *E. coli* O157:H7 sayısında 4 logaritmik birim azalma gözlenmiştir (Raybaudi-Massilia, et al., 2008c).

Cinnamaldehyde' in *E. coli* O157:H7 ve *S. typhimurium* ile yapılan çalışmalarda inhibe edici özelliğinin olduğu bilinmekte ve kullanılan ortamlarda tatlı bir tarçınlı bal kokusu hissedilmektedir (Aggarwal, et al., 2002; Zhou, et al., 2007).

2. 4. Engeller Kavramı (Hurdle Concept)

Gıdalarda mikrobiyolojik stabilite ve güvenirlüğün sağlanmasında birden fazla antimikrobiyal faktörün bir arada kullanılması sinerjistik etki oluşturur. Bu etkiye "hurdle etkisi" adı verilmektedir. Hurdle etkisi, kombine yöntemler, kombine muhafaza yöntemleri ve engel teknolojisi ya da hurdle teknolojisi olarak da adlandırılabilir. Kombine yöntemlerle gıdaların muhafazasında, yalnız başına yeterli olmayan birçok faktör bir arada uygulanarak bu faktörlerin interaksiyonu sonucu kümülatif bir etki sağlanmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 2003). Bu teknolojiye, gıdanın özelliklerine bağlı olarak, seçilecek birden fazla yöntemin bir arada kullanılması sonucunda sinerjistik etkileşim gösteren kombinasyonlar seçilir ve bu sistem için optimizasyon çalışmaları yapılır.

Gıda korumada kullanılan yeni yöntemlerin diğer muhafaza ile birlikte kullanımından elde edilen çalışmalara ait örnekler aşağıda verilmiştir:

Domates suyunda (pH 4,5) %1 oranında sukroz laurat kullanımı ve 45 °C' de 10 dakika 392 MPa basınç uygulamasının kombine etkisi *B. coagulans* 7050' nin sayısında 5 logaritmik birim azalma sağlarken, aynı oranda azalma sığır etinde aynı sıcaklık ve basınçta %0,01 oranında sukroz laurat kullanımı ile *B. cereus* 14579' da saptanmıştır. Elma suyunda ise %0,025 konsantrasyonunda sukroz laurat kullanımı ısıl işlem uygulansın ya da uygulanmasın *Alcyclobacillus* N1098 üzerine inhibe edici bir etki

göstermemiş ancak, 45 °C’ de 10 dakika 392 MPa basınç uygulaması 2 logaritmik birim azalma ve %0,04 sukroz laurat kullanımı ise 2,5 logaritmik birim azalmaya neden olmuştur. Sukroz lauratın %0,045 konsantrasyonunun basınç kullanımı ve 45 °C’ lik ısısal işleme bakteri sayısında 5,5 logaritmik birim azalma sağladığı belirlenmiştir (Shearer, et al., 2000).

Patterson ve Kilpatrick (1998) süt ve kanatlı hayvan etlerindeki *E. coli* O157:H7 NCTC 12079 ve *S. aureus* NCTC 10652’e karşı yüksek hidrostatik basınç işlemi uygulamışlar, yüksek hidrostatik basınç tek başına uygulandığında, her iki üründe de patojenlerin etkili inaktivasyonunu sağlamamış, UHT sütte 50 °C’ de 15 dakika boyunca 400 MPa’ lık bir uygulama *E.coli* sayısını yaklaşık 5 logaritmik ünite düzeyinde indirirken, aynı süre ve sıcaklıkta 500 MPa’ lık bir uygulama *S. aureus* sayısında yaklaşık 6 logaritmik ünite düzeyinde bir indirgeme gerçekleştirmiştir.

Elma suyuna, supercritical carbon dioxide (SCCO₂) sistemi kullanılarak, CO₂’ in sıcaklık ve basınç ile birlikte uygulanmasının *E. coli* K12 popülasyonuna inhibe edici etkisi belirlenmiştir. Maksimum etkinin %8’ lik CO₂’ in 45 °C’ de 7,6 MPa basınç uygulanarak gerçekleştiği ve toplamda canlı hücre sayısında 7,31 logaritmik birim azalma sağladığı görülmüştür (Yuk, et al., 2009).

Raso ve arkadaşları (1998a/b) yaptıkları bir çalışmada sıcaklık, amplitüd ve basıncın *Yersinia enterocolitica* üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda D değeri, amplitüdün 150 µm’ ye yükseltilmesiyle (30 °C ve 200 kPa’ da) 4 dakikadan 0,37 dakikaya ve basıncın 0’ dan 600 kPa’ a yükseltilmesiyle de (30 °C’ de ve 150 µm) 1,52’ den 0,2 dakikaya düşmüştür. 58 °C’ den yüksek sıcaklıklarda yapılan denemelerde ise sıcaklık ve ultrasound uygulamaları sonucunda D değerleri birbirine eşit bulunmuştur.

Ultrasound (20 kHz, 117 µm amplitüd) değişik sıcaklıklarla (62-68 °C) birlikte uygulandığında, farklı sıcaklık uygulamasının, daha önce sıcaklık şoku uygulanmış (45 °C’ de 180 dk) *L. monocytogenes*’ in inaktivasyonunda etkili sinerjistik bir etki görülmüştür (Pagan, et al., 1999a). D değeri, sonikasyonun 200 kPa’ lık bir basınç ile birlikte uygulanmasında 1,5 dakikaya, 400 kPa’ lık basınç ile uygulanmasında ise 1

dakikaya inmiştir. 50 °C' ye kadar olan sıcaklıklarda belirgin bir etki artışı gözlenmezken, 50 °C' nin üzerinde dikkate değer bir artış elde edilmiştir. Yapılan denemede, 64 °C' de 117 amplitüdünde 20 kHz' lik ultrasoundun 200 kPa' lık bir basınç ile uygulandığında *L. monocytogenes* için D değeri 0,34 dakika olmuştur (Pagan, et al., 1999b).

Lizozim ve bazı ajanların nisin ile birlikte kombine edilmeleriyle elde edilen antimikrobiyal karışım, salamura İtalyan mozzarella peyniri, bologna ve jambon gibi bazı gıdalarda bozulmaya neden olan patojen bakteriler üzerine inhibe edici etki gösterirler (Gill and Holley, 2000; Snigaglia, et al., 2008).

Kırmızı üzüm suyunda 50 °C' de 65 kV/cm elektrik akımı uygulanmasına 0,4g/100ml oranında lizozim ve nisin eklenmesi mikroorganizma sayısını doğal antimikrobiyaller ile 2 saatlik temas süresi sonunda 5,9 logaritmik birimlik azalma meydana getirmiştir aynı zamanda 51 °C' de 80 Kv/cm elektirk akımına sadece nisin eklenmesiyle bu azalma 6,2 logaritmik birim olmuştur (Wu, et al., 2005).

Elma suyunda 35 kV/cm elektrik enerjisi ile %1 veya %1,5 oranlarında malik asit ilave edilmesiyle 1 saat sonunda *E. coli O157:H7*, *Salonella enteritidis* ve *L. monocytogenes* sayısında 5 logaritmik birimden fazla azalma gözlenmiştir (Raybaudi-Massillia, et al., 2006).

0-200 mg/L oranında nisin ile %0-0,3 oranında tarçın yağının kombine edilmesi elma suyundaki *Salmonella typhimurium* ve *E. coli O157:H7* üzerine inhibe edici etkili olmuştur (Yuste and Fung, 2004).

Kavun ve karpuz sularına 35 kV/cm elektirk enerjisi uygulamasına %0,2-1,5 oranında sitrik asit veya %0,2 oranında tarçın yağının eklenmesi *E. coli O157:H7*, *Salonella enteritidis* ve *L. monocytogenes* sayısında 5 logaritmik birim azalma sağlamıştır ve bu uygulama sonunda meyve suları 5 °C' de 91 gün boyunca bozulmadan saklanabilmiştir (Mosqueda-Melgar, et al., 2008).

Vakumlu paketlenmiş tavuk ve etlerde 0-800 MPa basıncın tek başına uygulanması ile toplam mikroorganizma sayısında 3 logaritmik birim azalma

sağlanırken, basınç uygulanmasına nisin ilave edilmesi mikroorganizma sayısındaki azalmayı 5 logaritmik birime arttırdığı görölmüştür (Castillo, et al., 2004).

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3. 1. 1. Portakal suyu eldesi ve pastörizasyonu

Eskişehir piyasasından elde edilen sıkmalık portakallar çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve portakal sıkacağı ile sıkılarak elde edilen portakal suyu steril erlenlere doldurulmuştur. Portakal sularını posalarından ayırmak için önce süzgeçler daha sonra da dört katlı steril tülbent bezleri kullanılmıştır. Bu şekilde süzülen portakal suları 500' er ml steril erlenlere doldurulmuş ve 65 °C' de 30 dakika boyunca su banyosunda pastörize edilmiş ve sonra erlenler buzlu suda hızlı bir şekilde soğutularak -80 °C' deki derin dondurucuda saklanmıştır. İhtiyaç doğrultusunda belli miktarlarda kullanılmak üzere bir gün öncesinden derin dondurucudan buzdolabına alınarak +4 °C' de erimeleri sağlanmıştır.

3. 1. 2. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin sterilizasyonu farklı bir uygulamanın olmadığı durumlarda 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklavda yapılmıştır.

Besiyeri 1: Nutrient Broth (Merck)

Pepton	5 g
Meat extract	3 g

1000 ml distile su içine 8 g hazır besiyeri eklenerek, çözülmüceye kadar kaynatılmış ve kapaklı deney tüplerine 5' er ml aktararak steril edilmiştir.

Besiyeri 2 : Nutrient Agar (Merck)

Pepton	5 g
Meat extract	3 g
Agar	12 g

1000 ml distile su içine 20 g hazır besiyeri eklenerek, çözülmüceye kadar kaynatılmıştır Steril edildikten sonra 45–46 °C' ye kadar soğutulurak 90 mm çapındaki steril petrilere 15' er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 3: Violet Red Bile Agar

Yeast extract	3 g
Enzymatic Digest of Gelatin	7 g
Bile Salts Mixture	1,5 g
Lactose	10 g
Sodium Chloride	5 g
Neutral Red	0,03 g
Crystal Violet	0,002 g
Agar	15 g

1000 ml steril edilmiş distile su içerisine hazır besiyerinden 41,5 g eklenerek 2 dk içerik çözülmüceye kadar kaynatılmıştır. Otoklavda steril edilmez. 45–46 °C' ye

kadar soğuması beklenmiş ve 90 mm çapındaki steril petrilere 15' er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 4: Oxford Listeria Selective Agar (Merck)

Pepton	23 g
Starch	1 g
Sodium chloride	5 g
Agar	13 g
Aesculin	1 g
Ammonium iron(III) citrate	0,5 g
Lithium chloride	15 g

500 ml distile su içerisinde hazır besiyerinden 29,25 g olacak şekilde eklenmiş ve içerik çözülünceye kadar kaynatılmıştır. Steril edildikten sonra 50 °C' ye kadar soğutulmuş bazal medium içerisinde 2,5 ml steril distile su ve 2,5 ml ethanolde çözülen Selective – Supplement (Cat No. 1.07006) eklenerek karıştırılmış ve 45 – 46°C' ye kadar soğuduğunda 90 mm çapındaki steril petrilere 15' er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 5: TSYEA (Tryptone Soya Yeast Extract Agar)

Tryptone	17 g
Sodium chloride	5 g
Dipotassium phosphate	2,5 g
Bacteriological agar	15 g

Yeast extract	6 g
Soy peptone	3 g
Glucose monohydrate	2,5 g

Tüm içerik 1000 ml distile su içine konup, içerik çözülünceye kadar kaynatılmıştır. Steril edildikten sonra 45–46 °C' ye kadar soğutularak 90 mm çapındaki steril petrilere 15' er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 6: Chromocult TBX Agar (Tryptone Bile X – glucuronideAgar / Merck)

Peptone	20 g
Bile salts No. 3	1,5 g
X–B–D–glucronide	0,075 g
Agar	10 g

1000 ml distile su içine hazır besiyerinden 31,6 g olacak şekilde eklenerek içerik çözülünceye kadar kaynatılmıştır. Steril edildikten sonra 45–46 °C' ye kadar soğutulmuş 90 mm çapındaki steril petrilere 15' er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 7: Plate Count Agar (Merck)

Peptone	5 g
Yeast extract	2,5 g
D(+) glukoz	1 g
Agar	14 g

1000 ml distile su içerisine 22,5 g olacak şekilde hazır besiyerinden eklenerek çözülünceye kadar kaynatılmıştır. Steril edildikten sonra 45 – 46 °C’ ye kadar soğutularak 90 mm çapındaki steril petrilere 15’ er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 8: Malt Extract Agar (Merck)

Malt extract	30 g
Peptone	3 g
Agar	15 g

1000 ml distile su içerisine 48 g olacak şekilde eklenerek içerik çözülünceye kadar kaynatılmıştır. 121°C’ de 10 dk otoklavlanarak steril edilmiş ve son olarak 45 – 46°C’ ye kadar soğutularak 90 mm çapındaki steril petrilere 15’ er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Besiyeri 9 : Müeller Hinton Broth Tek Kuvvetli (Merck)

Meat infusion	2 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g

1000 ml distile su içerisine 21 g olacak şekilde hazır besiyerinden eklenerek, çözülünceye kadar kaynatılmış ve kapaklı deney tüplerine 5’ er ml dağıtılarak steril edilmiştir.

Besiyeri 10 : Müeller Hinton Broth Çift Kuvvetli (Merck)

Yukarıda içeriği verilen Müeller Hinton Broth besiyerinden 42 g tartılarak 1000 ml distile su içerisine eklenmiş ve çözülünceye kadar kaynatılmıştır. Besiyeri

kapaklı deney tüplerine 5' er ml dağıtılarak steril edilmiştir.

3. 1. 3. Çözeltiler

Çözelti 1: Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

NaCl	8,5 g
Distile Su	1000 ml

8,5 g NaCl 1 litre suda çözülmüş ve steril edilmiştir.

Çözelti 2 : TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) Çözeltisi

Distile su içerisine % 1 olacak şekilde eklenmiş ve çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra 0,45 µm por çaplı milipore filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Çözelti ışık almayacak şekilde muhafaza edilmiştir.

3. 1. 4. Mc Farland No: 0,5 Bulanıklık Standardı

BaCl ₂ (% 1,175)	0,5 ml
H ₂ SO ₄ (0,36 N)	99,5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırılarak 10 ml' lik steril kapaklı tüpe doldurulmuş ve kapağı sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta buzdolabında saklanmıştır.

3. 1. 5. Uçucu yağlar

Uçucu Yağ 1: Eugenol (Aldrich)

$C_6H_{12}O_2$, 98+ % Natural

Uçucu Yağ 2: Linalool (Aldrich)

$C_{10}H_{18}O$, 80+ % Natural

Uçucu Yağ 3: Cinnamaldehyde (Aldrich)

$C_6H_5CH=CHCHO$, 93+% Natural

3. 1. 6. Diğer kimyasallar

Kimyasal 1: Sitrik Asit (Carlo Erba Reaganti)

$C_6H_8O_7$

Kimyasal 2: Dimethyl Sulfoxide (DMSO / Merck)

$(CH_3)_2SO_4$

3. 2. Metodlar

3. 2. 1. Çalışmada kullanılan Ultrasonic Processor' ün özellikleri

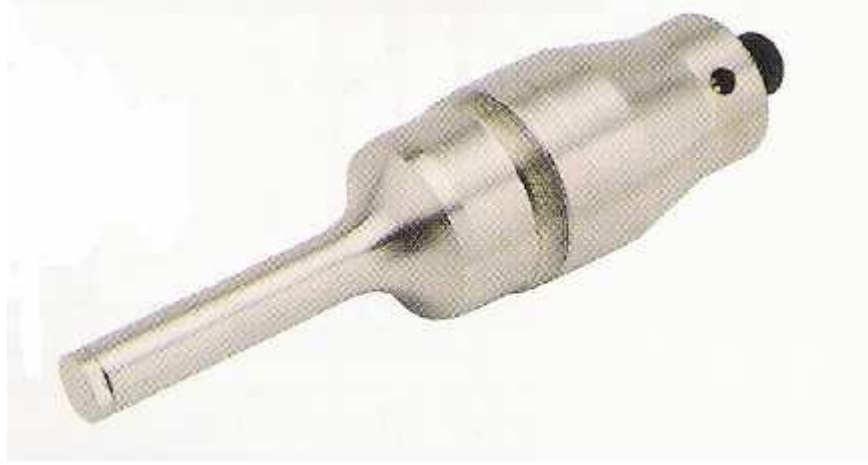
Yapılan deneylerde sonikasyon uygulaması için, 20 kHz frekansta 750 Watt' lık Ultrasonic Processor (Sonics and Materials Inc. Vibra Cell VCX 750, U.S.A) kullanılmıştır. Cihazın sıcaklık ölçmede kullanılan paslanmaz çelikten yapılmış bir probu bulunmaktadır. Ultrasonic Processor' ün converter' in (CV 33, piezoelectric lead zirconate titanate crystals-PZT) çapı 21/2" (65,5 mm), uzunluğu 71/4" tir (183 mm).

Çalışmalarda cihazın, titanyum alaşımından yapılmış (TI-6AL-4V), 13 mm çapa sahip otoklavlanabilir solid probu kullanılmıştır. Probon özelliklerine ait detaylar Çizelge 3. 1' de verilmiştir. 20 kHz frekanstaki ses şiddeti % 0-100 amplitüd arasında ayarlanabilmektedir. Çalışmadaki sonikasyon uygulamalarının tamamı % 80 (99,2 $\mu\text{m}=0,73 \text{ W/ml}$) amplitüdde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 1. Sonikasyon (Ultrasound) işleminde kullanılan probun özellikleri.

solid prob	
Order no:	630-0219
Prob çapı:	13 mm (1/2")
Prob uzunluğu:	136 mm
Güç:	yüksek
Amplitüd:	124 (μm)
	0049 (inches)
Hacim:	10 - 250 ml

Sonikasyon işlemi sırasında sonikasyon haznesi içindeki portakal suyunun istenilen sıcaklık seviyesinde sabit kalmasını sağlamak için sonikasyon haznesi sirkülasyonlu su banyosuna (Polyscience - 9102) bağlanmıştır.



Şekil 3. 1. Sonikasyon işlemi için kullanılan solid prob.



Şekil 3. 2. Sonikasyon işleminin yapıldığı cihaz.

%80 amplitüd sonikasyonlu yapılan sonikasyon işlemleri için su banyosunun sıcaklığını, istenilen sıcaklıktan 10 derece düşük bir seviyede tutmak yeterli olmuştur.

3. 2. 2. Pastörize portakal suyunun fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri

Fiziksel ve kimyasal analizler :

Çalışmada kullanılan portakal suyunun pH' nın belirlenmesi pH – metre ve su aktivitesinin belirlenmesi de su aktivitesi ölçüm cihazı ile belirlenmiştir. Portakal suyunun kuru ağırlık miktarı ise 10 g portakal suyunun 60 °C' de 24 saat kurutulup içerdiği suyun buharlaştırılması ile belirlenmiştir.

Mikrobiyolojik analizler :

- Pastörize edilen portakal suyunda, *E. coli* O157:H7 sayımı için, 100 µl portakal suyu *E. coli* türleri için seçici özellikte olan TBX ve Violet Red Bile Agar' a yüzeye yayma yöntemi ile ekildi, 37 °C' de 18–24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve koloni sayımı yapıldı.
- Pastörize edilen portakal suyunda *L. monocytogenes* sayımı için, *Listeria* türleri için seçici olan Oxford Listeria Selective Agar' a 100 µl portakal suyu yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapıldı, 37 °C' de 18–24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve koloni sayımı yapıldı.
- Portakal suyunda aerobik mezofilik bakteri sayısının belirlenmesi için, 100 µl pastörize edilmiş portakal suyu örneği Plate Count Agar' a yüzeye yayma yöntemi ile ekildi, 37 °C' de 18–24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve koloni sayımı yapıldı.
- Portakal suyunda herhangi bir maya ve küf sayımı için ise, Malt Extract Agar' a 100 µl pastörize edilmiş portakal suyu örneği yüzeye yayma yöntemi ile ekildi, 30 °C' de 18–24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve koloni sayımı yapıldı.

3. 2. 3. Sonikasyon ile bakteriyal inaktivasyon denemelerinde kullanılan bakteriler

Sonikasyonla bakteriyal inaktivasyon üzerine uçucu yağların etkisini belirlemek için seçilen test bakterileri *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) ve *L. monocytogenes* (LMG 13305)' dir.

Bakteriler, çalışma için aktif hale getirilmek için bir gün öncesinden stok olarak hazırlanmış buzdolabındaki yatık agarlardaki kültürler Nutrient brotlara ekilerek 35 °C' de 18–24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Aktifleştirilen kültürlerin yoğunluğu FTS ile seyreltmeleri yapılarak Mc Farland 0,5 nolu tüpe göre (yaklaşık 10^8 hücre/ml) ayarlanmıştır.

3. 2. 4. Çalışmada kullanılan sayım yöntemi

Çalışma sırasında alınan örneklerin mililitredeki bakteri sayılarını belirlemede damla plaka ve yüzeye yayma yöntemi kullanılmıştır. Deney ortamlarından alınan örneklerin seyreltmeleri ise, 1/10 oranında FTS ile hazırlanmıştır ve bu seyreltme tüpleri vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Seyreltme tüplerinden 20' şer µl alınarak uygun besiyeri yüzeylerine damlatılarak ekim yapılmıştır. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* için 35 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan koloniler sayılarak aşağıdaki formülden mililitredeki bakteri sayısı belirlenmiştir.

Mililitredeki bakteri sayısı = A x seyreltme faktörü / pipetlenen hacim

3. 2. 5. Uçucu yağların ve sitrik asitin stok çözeltilerinin hazırlanması

Uçucu yağlar suda çözünmezler bu nedenle 20, 40 ve 80 µl uçucu yağ 500 µl % 25' lik DMSO' da, 0,003 g sitrik asit ise 500 µl distile su içinde çözülerek 0,45 µm por çaplı şırınga tipi milipore filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan uçucu yağ ve sitrik asit stok çözeltileri antimikrobiyal aktivite ve diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

3. 2. 6. Uçucu yağlar ve sitrik asitin *E. coli* O157H:7 ve *L. monocytogenes* üzerine antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Bu aşamada, kullanılan uçucu yağlar ve sitrik asitin test bakterileri üzerine antimikrobiyal etkili olup olmadıkları belirlenmiştir. Bunun için mikrodilüsyon tekniği kullanılmıştır. Test bakterileri MHB' a ekilerek 18–24 saat 35 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin yoğunluğu Mc Farland No: 0,5 nolu tüpüne göre ayarlanmış ve çift kuvvetli MHB tüplerine belirli miktarlarda aktarılmıştır.

Bölüm 3. 2. 5.' te anlatılan şekilde hazırlanan uçucu çözeltilerinden iki katlı seri dilüsyonları hazırlanarak, 25 µl/ml' den 0,02 µl/ml' ye kadar seri konsantrasyonları elde edilmiştir. Sitrik asit stok çözeltisi de aynı şekilde hazırlanmış 25 mg/ml' den 0,02 mg/ml' ye kadar konsantrasyon serileri hazırlanmıştır.

Antimikrobiyal aktivite denemelerinde deney için 96 adet "U" tipi kuyucuklara sahip 96 kuyucuklu plaklar (mikrowell plateler) kullanılmıştır. Uçucu yağ ve sitrik asit konsantrasyon serileri microwell platelerdeki her bir kuyucuğa 100' er µl olacak şekilde aktarılmıştır.

Uçucu yağ ve sitrik asitin konsantrasyon serileri kuyulara aktarıldıktan sonra çift kuvvetli MHB kültürlerinden her bir kuyucuğa 100 µl pipetlenmiştir. Bu işlemden sonra 96 kuyucuklu plakların kapakları kapatılarak 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda üreme olan ve olmayan kuyular, kuyularda bulanıklık varlığı/yokluğu gözlenerek belirlenmiştir. Üreme olmayan tüm kuyulardan 10 µl alınarak damlatma yöntemi ile Nutrient Agar plaklarına ekim yapılmış ve 37 °C' de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca microwell platlerdeki kuyulara TTC püskürtülmüş ve 2–3 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda pembe renge dönüşen kuyularda canlı bakteriler olduğu onaylanmıştır.

Ayrıca, test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenen çözeltilerin (Eugenol, Linalool, Cinnamaldehyde ve Sitrik asit) sterilitesi ve test bakterilerinin antimikrobiyal madde içeren ortamlardaki (MHB' de) büyüme durumları birer kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite çalışması için yapılan tüm hazırlık ve ekim çalışmaları biyogüvenlik kabiniinde (ESCO, Class II) gerçekleştirilmiştir.

MIC (minimal inhibitör konsantrasyon) değeri test bakterilerinin gelişimini engelleyen en düşük konsantrasyon ($\mu\text{l/ml}$), MBC (minimal bakterisidal konsantrasyon) ise test bakterilerini öldüren en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

3. 2. 7. Sonikasyonla bakteriyel inaktivasyon üzerine uçucu yağların etkisini belirlemek için hazırlanan deney planı

Çalışmada denenecek olan tüm parametreler sırasıyla belirlenmiş ve alınan sonuçlar değerlendirilerek farklı etmenlerin test bakterilerimizin inaktivasyonları üzerine etkileri araştırılmıştır.

Tüm sonikasyon işlemleri, %80 amplitüdde (7,3 W/ml) ve 100 ml' lik sonikasyon cam haznesinde yapılmıştır. Sonikasyon haznelerinde toplam hacim 100 ml olacak şekilde portakal suyu, test bakterisi ve diğer test maddeleri eklenmiştir. Test bakterileri sonikasyon haznesine yaklaşık 10^4 hücre/ml başlangıç hücre yoğunluğunu sağlayacak 1 ml şeklinde eklenmiştir.

Çalışmalarda 4, 25, 35, 40 ve 45 °C' lik ortamlar kullanılmıştır. Sadece *L. monocytogenes* ile yapılan çalışmalarda 50 °C' lik sıcaklık da çalışmaya dahil edilmiştir.

Başlangıçtaki ve sonikasyonlu/sonikasyonsuz uygulamalar süresince, ortamlardan belirli aralıklarda örnekler alınarak test bakterilerinin bu süreçteki sayısal değişimleri belirlenmiştir. Sayım sonuçlarının (2 paralelli) logaritmaları alınarak bunlardan inaktivasyon grafikleri hazırlanmıştır. Ayrıca haznedeki portakal suyuna eklenen *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* stok kültürlerinin mililitresindeki bakteri sayısı her çalışma ile eş zamanlı olarak belirlenmiştir. Tüm çalışmalar iki paralelli olarak yapılmıştır.

Deney planının detayları aşağıda verilmiştir.

Plan 1. Sıcaklığın *E.coli* O157:H7 ve *L.monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada portakal suyunda *E. coli* O157:7 ve *L. monocytogenes*' in gelişimi/canlı kalışı üzerine farklı sıcaklıkların tek başına etkisi araştırılmıştır. *E. coli* O157:H7 ya da *L. monocytogenes* kültürleri portakal suyuna eklenmiş ve farklı sıcaklıklarda 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Test bakterisi eklenmiş ortamlardan belirli aralıklarla örnekler alınarak canlı kalan bakteri sayısı belirlenmiştir. Belirli zaman aralıklarında ortamlardan 20' şer µl örnek alınarak portakal suyundaki canlı bakteri sayısı belirlenmiştir.

Plan 2. Uçucu yağların *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu aşamada potakal suyuna eklenen *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine, uçucu yağların etkisi farklı sıcaklıklarda araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda 200, 400 ve 800 µl/L uçucu yağ konsantrasyonları kullanılmıştır. Ortamlar 48 saat boyunca 6 farklı sıcaklıkta (4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C) bekletilerek belirli aralıklarda örnekler alınmıştır. Bu koşullarda canlı kalan hücre sayısı damlatma veya yüzeye yayma sayım yöntemi ile belirlenmiştir.

Plan 3. Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyonun *E. coli* O157:H7 ve *L.monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada farklı sıcaklıklarda (4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C) yapılan sonikasyonun (7,3 W/ml) *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Tüm sonikasyonlar toplam 5 dk süre ile yapılmış ve 1., 3. ve 5. dakikalarda örnekler alınarak, örnekleme anındaki bakteri sayıları (hücre/ml) belirlenmiştir.

Sonikasyonlu çalışmalarda 13 mm' lik solid prob ve 100 ml' lik cam hazne kullanılmıştır. Canlı hücre sayımları damla yöntemi veya yüzeye yayma yöntemi ile yapılmıştır.

Plan 4. Sonikasyon ve uçucu yağların farklı sıcaklıklarda birlikte kullanımının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyonun *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyon üzerine uçucu yağların etkisinin araştırıldığı çalışmadır. Bunun için sonikasyon haznesindeki portakal suyuna konsantrasyonları 200, 400 ve 800 µl/L olacak şekilde uçucu yağlar eklenerek farklı sıcaklıklarda (4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C) sonikasyon uygulanmıştır. 5 dk' lık işlem sırasında 1., 3. ve 5. dakikalarda ortamdan belirli miktarlarda örnek alınmış ve canlı kalan hücre sayısı belirlenmiştir.

Plan 5. Sitrik asitin *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Potakal suyuna eklenen *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine, sitrik asitin etkisi farklı sıcaklıklarda araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda 200, 400 ve 800 µl/L sitrik asit konsantrasyonları kullanılmıştır. Ortamlar 48 saat boyunca 6 farklı sıcaklıkta (4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C) bekletilerek belirli aralıklarda örnekler alınmıştır. Bu koşullarda canlı kalan hücre sayısı damlatma veya yüzeye yayma sayım yöntemi ile belirlenmiştir.

Plan 6. Sonikasyon ve sitrik asitin farklı sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı sıcaklıklarda uygulanan sonikasyon işleminin *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyon üzerine sitrik asitin etkisinin araştırıldığı çalışmadır. Bunun için sonikasyon haznesindeki portakal suyuna konsantrasyonları 200, 400 ve 800 µl/L olacak şekilde sitrik asit eklenerek farklı sıcaklıklarda (4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C)

5 dk boyunca sonikasyon uygulanmıştır ve 1., 3. ve 5. dakikalarda ortamdan örnek alınarak, canlı kalan hücre sayısı belirlenmiştir.

3. 2. 8. İstatistiksel metod (Varyans Analizi)

Bu çalışmada bakterilerin inaktivasyonunun değerlendirilmesinde veya modellenmesinde yaygın olarak kullanılan bir model olan birinci derece reaksiyon kinetigi modeli kullanılmıştır. Buna göre inaktivasyonu gerçekleştiren şartlar altında var olan hücre sayısının her birim zamanda belli bir oranı inaktif hale gelir.

Model;

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

Ancak mikrobiyolojik çevrimlerde Log10 dönüşümü yerleşmiş bir adet olduğu için , model;

$\log N = \log N_0 - kt$ 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 alınan ana kadar geçen süre (dk)

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

K = inaktivasyon eğrisinin eğimi (dk^{-1})

k = log çevrimi yapılmış inaktivasyon eğrisinin eğimi (dk^{-1})

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

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. 2. 9. Sonikasyon ürünlerinin farklı sıcaklıklarda depolanması

800 µl/L Eugenol ve Linalool eklenerek yada eklenmeyerek yapılan tüm 5 dk'lık sonikasyon işlemlerinden sonra haznedan alınan portakal suları ikişer steril kapaklı tüpe aktarılmış ve biri 4 °C, diğeri 25 °C (oda sıcaklığında)' de ışık almayacak şekilde 32 gün süre ile depolanmıştır. Depolama süresince belirli aralıklarda (1., 2., 4., 8., 16., 24., 32., 40. ve 48. günlerde) örnek alınarak, farklı şekillerde işlem görmüş portakal sularındaki canlı bakteri sayıları belirlenmiştir. Her örnekleme zamanında örnek tüplerinin fotoğrafları çekilerek, depolama süresince meydana gelebilecek renk değişimleri belirlenmiştir. Bunun için sonikasyon uygulamalarında en yüksek *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyonunun elde edildiği ortam koşulu (maksimum inaktivasyonun gözlemlendiği sıcaklık ve uçucu yağ konsantrasyonu) seçilmiştir.

Depolama süresi boyunca, farklı işleme maruz bırakılmış portakal sularındaki canlı *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* sayısının belirlenmesinde kullanılan ortamlar aşağıda listelenmiştir.

- İşlem görmemiş portakal suyu (P.S.: Tüm çalışmalarda kullanılan pastörize portakal suyu)
- *E. coli* O157:H7' nin eklendiği portakal suyu (P.S.+ *E. coli* O157:H7)
- *L. monocytogenes* ' in eklendiği portakal suyu (P.S.+ *L. monocytogenes*)
- *E. coli* O157:H7' nin eklenip 45 °C' de 5 dk sonikasyon yapıldığı portakal suyu (P.S.+U.S.+ *E. coli* O157:H7)
- *L. monocytogenes* ' in eklenip 45 °C' de 5 dk sonikasyon yapıldığı portakal suyu (P.S.+U.S.+ *L. monocytogenes*)
- *E. coli* O157:H7' nin ve 800 µl/L Eugenol eklenip 45 °C' de 5 dk sonikasyon yapıldığı portakal suyu (P.S.+U.S.+Eugenol+ *E. coli* O157:H7)
- *E. coli* O157:H7' nin ve 800 µl/L Linalool eklenip 45 °C' de 5 dk sonikasyon yapıldığı portakal suyu (P.S.+U.S.+Linalool+ *E. coli* O157:H7)

- *L. monocytogenes*' in ve 800 µl/L Eugenol eklenip 45 °C' de 5 dk sonikasyon yapıldığı portakal suyu (P.S.+U.S.+Eugenol+*L. monocytogenes*)
- *L. monocytogenes*' in ve 800 µl/L Linalool eklenip 45 °C' de 5 dk sonikasyon yapıldığı portakal suyu (P.S.+U.S.+Linalool+*L. monocytogenes*)

Örneklemler biyogüvenlik kabini içinde yapılmış ve alınan örnekler (20 µl) uygun besiyerine ekilerek 35 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Böylelikle, çeşitli işlemler sonucunda portakal suyunda canlı kalmış olabilecek *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* hücrelerinin depolama sırasındaki akıbetleri (davranışları) belirlenmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR ve TARTIŞMA

4. 1. Portakal Suyunun Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Eskişehir piyasasından satın alınan sıkmalık portakalların preslenerek suyu çıkarılmış ve filtre edildikten sonra Çizelge 4. 1.' de verilen özellikleri belirlenmiştir.

Çizelge 4. 1. Portakal suyunun özellikleri.

Renk	Sarı
pH	3,6
Kuru ağırlık (%)	21,1 g
Su aktivitesi (aw)	0,987

Bölüm 3. 2. 2.' de verilen yöntemle genel (PCA, MEA) ve seçici (VRBA, TBX, Oxford Listeria Selective Agar) besiyerlerine yapılan ekim sonucunda, pastörize ettiğimiz portakal suyunda herhangi bir mikroorganizma üremesi gözlenmemiştir.

4. 2. Uçucu Yağların MIC ve MBC Değerleri

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz uçucu yağların ve sitrik asitin tek başına *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerine hangi konsantrasyonlarda etkili olduklarını belirleyebilmek amacı ile MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Mikrodilüsyon test yöntemi kullanılarak belirlenen MIC ve MBC değerleri Çizelge 4. 2.' de verilmiştir.

Çizelge 4. 2.' de görüldüğü gibi sitrik asit denendiği en yüksek konsantrasyonda dahi test bakterilerinin gelişimini inhibe etmemiştir. Çalışmanın devamını planlarken bu testten elde edilen MIC ve MBC değerleri dikkate alınarak, her uçucu yağ çeşidi için ortak bir uçucu yağ konsantrasyonu seçilmiştir.

Çizelge 4. 2. Uçucu yağlar ve sitrik asitin MIC ve MBC değerleri.

Uçucu yağ	Bakteri	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
Eugenol	<i>E. coli</i> O157:H7	0,78	0,78
	<i>L.monocytogenes</i>	0,78	1,56
Linalool	<i>E. coli</i> O157:H7	0,78	0,78
	<i>L.monocytogenes</i>	3,12	3,12
Cinnamaldehyde	<i>E. coli</i> O157:H7	0,09	0,39
	<i>L.monocytogenes</i>	0,09	0,09
Sitrik asit (mg/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7	> 25 mg/ml	> 25 mg/ml
	<i>L.monocytogenes</i>	> 25 mg/ml	> 25 mg/ml

Denemelerde kontrol amaçlı bırakılan kuyular incelendiğinde, test bakterilerinin kullanmış olduğumuz besiyeri ortamında gelişim gösterebildikleri, uçucu yağlar ve sitrik asitin steril olduğu görülmüştür. Ayrıca DMSO eklenen besiyerlerinde bakteri üremesini incelediğimizde, sadece *E. coli* O157:H7' nin %12,5' luk DMSO konsantrasyonunda üreyemediği, diğer konsantrasyonlarda (%6,25 ve daha düşük) üreyebildiği görülmüştür. %12,5' lik DMSO konsantrasyonu dahil olmak üzere kullanılan tüm DMSO serilerinde *L. monocytogenes*' in gelişebildiği gözlenmiştir. Böylece uçucu yağ çözmeye kullanılacak olan DMSO' nun sonikasyon çalışmaları üzerine herhangi bir etkisinin olmaması sağlanmıştır. Bu nedenle, uçucu yağlardan konsantrasyon serileri hazırlanırken 96 kuyucuklu plakların kuyularında en yoğun DMSO oranı %12,5' un altında olacak şekilde ayarlanmıştır.

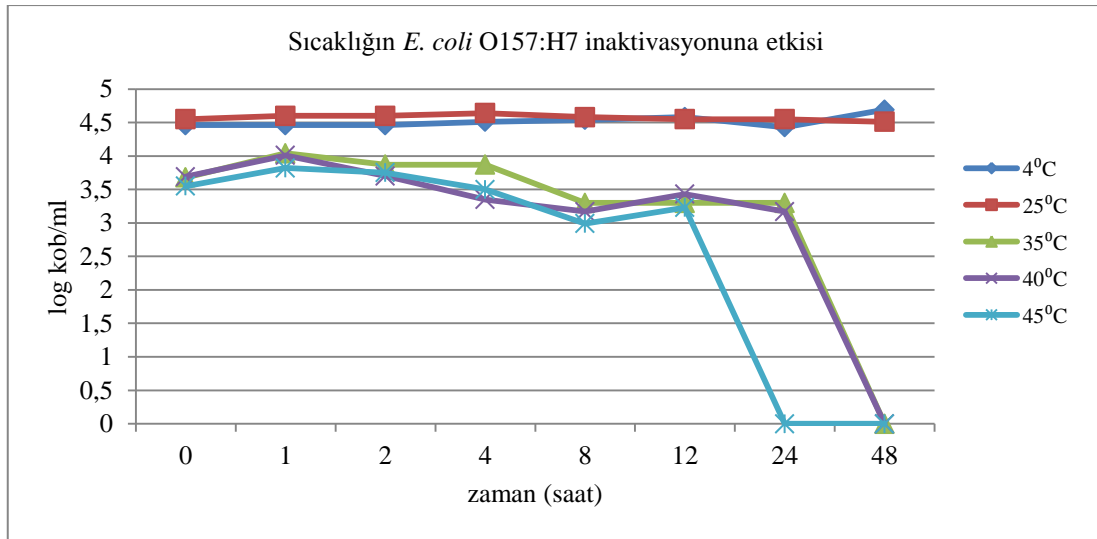
4. 3. Sıcaklığın *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* İnaktivasyonu Üzerine Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde, tek başına sıcaklığın *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* gelişimi veya inaktivasyonu üzerine etkisi belirlenmiştir. Bu şekilde çeşitli uçucu yağların varlığında yapılacak olan sonikasyon sırasında sıcaklığın sinerjistik bir etkisi olup olmadığı ortaya konmuştur. Bu amaçla yaklaşık 10^4 hücre/ml

olacak şekilde *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* eklenmiş portakal suları 4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C’ de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve belirli aralıklarla bu ortamlardan örnek alınarak, canlı bakteri sayıları, koloni sayımı yöntemi ile belirlenmiştir.

4. 3. 1. Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen portakal suyunda *E. coli* O157:H7’ nin gelişimi

Portakal suyuna *E. coli* O157:H7 eklenerek 4, 25, 35, 40 ve 45 °C’ deki 5 farklı ortam sıcaklığında inkübasyona bırakılması ile bakteri sayısındaki değişimler belirlenmiştir. Şekil 4. 1.’ de canlı bakteri sayıları logaritmik değer olarak gösterilmiştir.



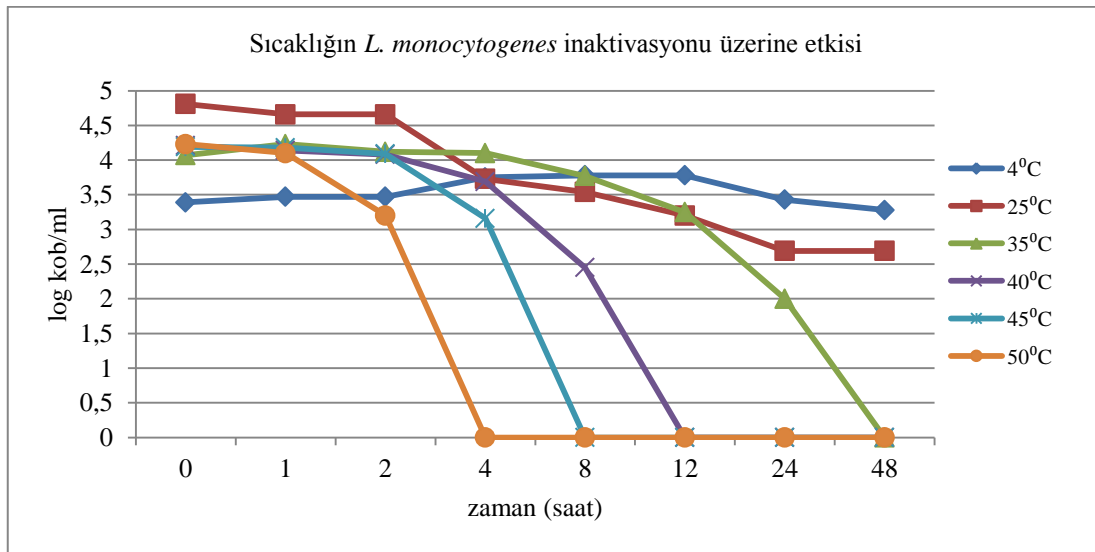
Şekil 4. 1. Sıcaklığın *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu üzerine etkisi.

Şekil 4. 1.’ de görüldüğü gibi 48 saatlik inkübasyon süresince, 4 ve 25 °C gibi düşük sıcaklıklarda bakteri sayısında önemli bir fark meydana gelmemiştir. Ancak 35 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda 48 saat içinde canlı kalan bakteri sayısında belirgin bir değişim gözlenmiştir. 35 ve 40 °C’ de, 24. saatten sonra canlı bakteri sayısında önemli

bir azalma görülmüş ve 24. saatte tespit edilebilir değerin altına düşmüştür. 45 °C’ de ise, bakteri sayısındaki düşüş 12. saatte başlamış ve 24. saatte tespit edilebilen değerin altına düşmüştür. *E. coli* sayısında 35, 40 ve 45 °C’ de sırasıyla 48 ve 24 saatte ortalama 3,5 logaritmik birimlik bir azalma belirlenmiştir.

4. 3. 2. Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen portakal suyunda *L. monocytogenes*’ in gelişimi

Portakal suyuna eklenen *L. monocytogenes*’ in gelişiminde Şekil 4. 2.’ de görüldüğü gibi 4 ve 25 °C’ de önemli bir fark görülmemiştir. *E. coli* O157:H7’ de olduğu gibi *L. monocytogenes*’ de de 35 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda bakteri sayısında azalmalar gözlenmiştir. Şekil 4. 2.’ de görüldüğü gibi sıcaklığın artmasıyla bakteri inaktivasyon süresi kısalmıştır. 35 °C’ deki portakal suyunda bakteri sayısında 48. saate kadar önemli bir azalma olmazken, 40 , 45 ve 50 °C’ de sırasıyla 12., 8. ve 4. saatlerde ortalama 4 logaritmik birimlik düşüş meydana gelerek, bakteri sayısı tespit edilebilir sayının altına düşmüştür.



Şekil 4. 2. Sıcaklığın *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi

4. 4. Uçucu Yağların *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* İnaktivasyonu Üzerine Etkisi

Bu çalışmada portakal suyuna ilave edilen çeşitli uçucu yağların farklı sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerindeki inhibitör etkisi belirlenmiştir. Ayrıca portakal sularına koruyucu olarak ilave edilen sitrik asitin de *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerindeki etkisi çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmalarda portakal suyuna eugenol, linalool ve cinnamaldehyde uçucu yağlarının 200, 400 ve 800 µl/L dozları ilave edildikten sonra *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* ekilmiş ve 4, 25, 35, 40, 45 ve 50 °C olmak üzere altı farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında bu ortamlardan örnek alınarak içindeki canlı bakteri sayıları belirlenmiştir.

4. 4. 1. Portakal suyundaki *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu üzerine uçucu yağların etkisi

Şeki 4. 3.–4. 5.’ de görüldüğü gibi portakal suyuna ilave edilen uçucu yağ miktarının artırılması ile *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu artmıştır.

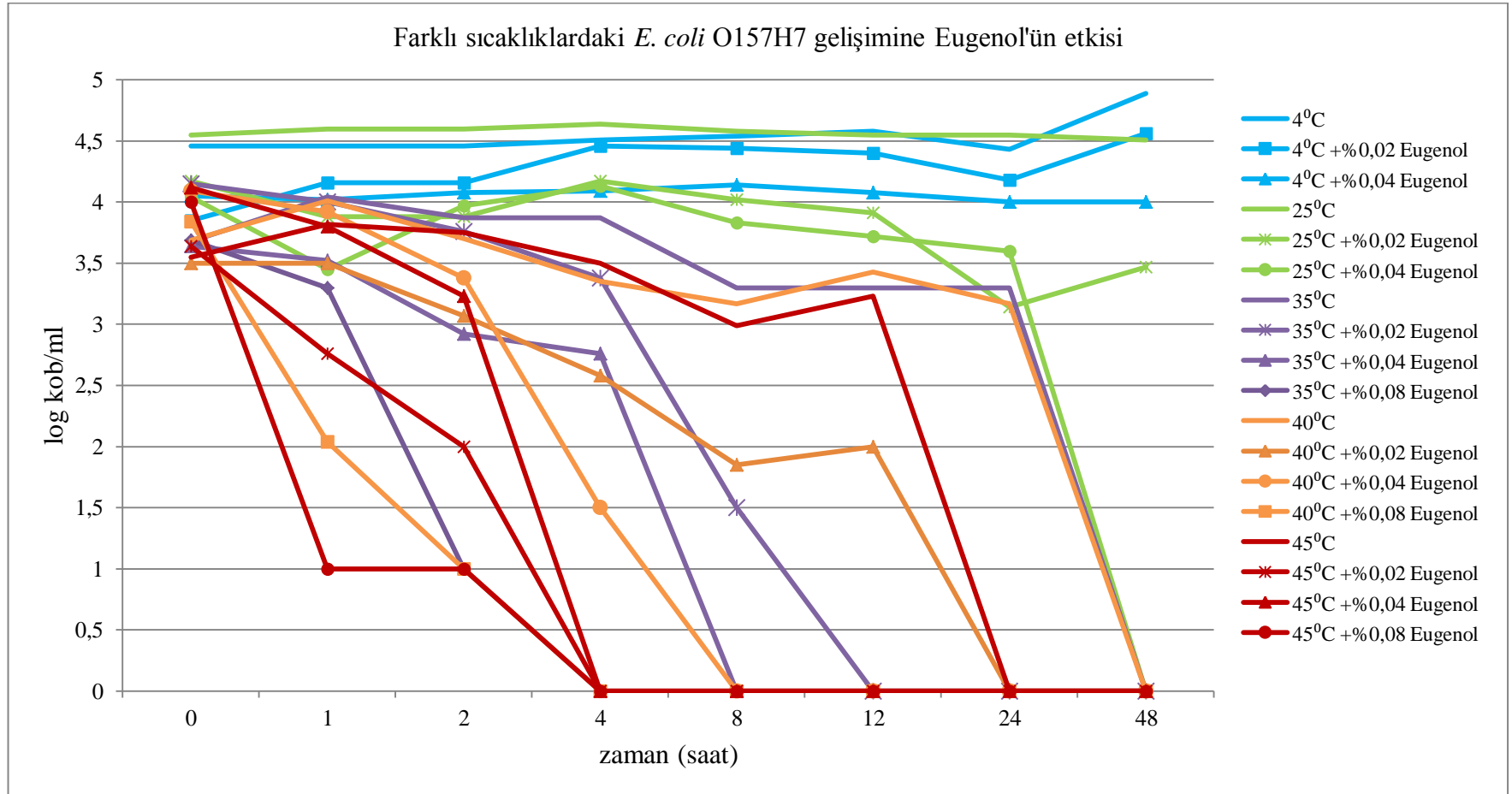
E. coli O157:H7 inaktivasyonu üzerine yapılan denemelerde elde edilen sonuçlar sıcaklık kontrollerinden elde edilen veriler ile birlikte değerlendirildiklerinde aşağıdaki sonuçlar çıkarılabilir.

- 4 °C’ de yapılan inkübasyonda hiçbir uçucu yağ konsantrasyonunda *E. coli* O157:H7 sayısı açısından dikkate alınabilecek bir fark görülmemiştir.
- 25 °C’ de 400 µl/L dozunda uçucu yağ kullanılan ortamlarda 48. saatten sonra bakteriyal inaktivasyon görülmüş, canlı bakteri sayısında 48 saat süre sonunda ortalama 4 logaritmik birim azalma belirlenmiştir. Ancak 48 saat sonunda meydana gelen bakteri sayısındaki düşüşlerde uçucu yağın inaktive edici etkisinden söz etmek doğru olmayacaktır. Bu azalmanın uçucu yağ etkisi ile değil, 48 saat sonunda ortamdaki besin kıtlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yalnızca 200 µl/L konsantrasyonunda Cinnamaldehyde’ in 24 saat sonunda canlı hücre sayısında 3

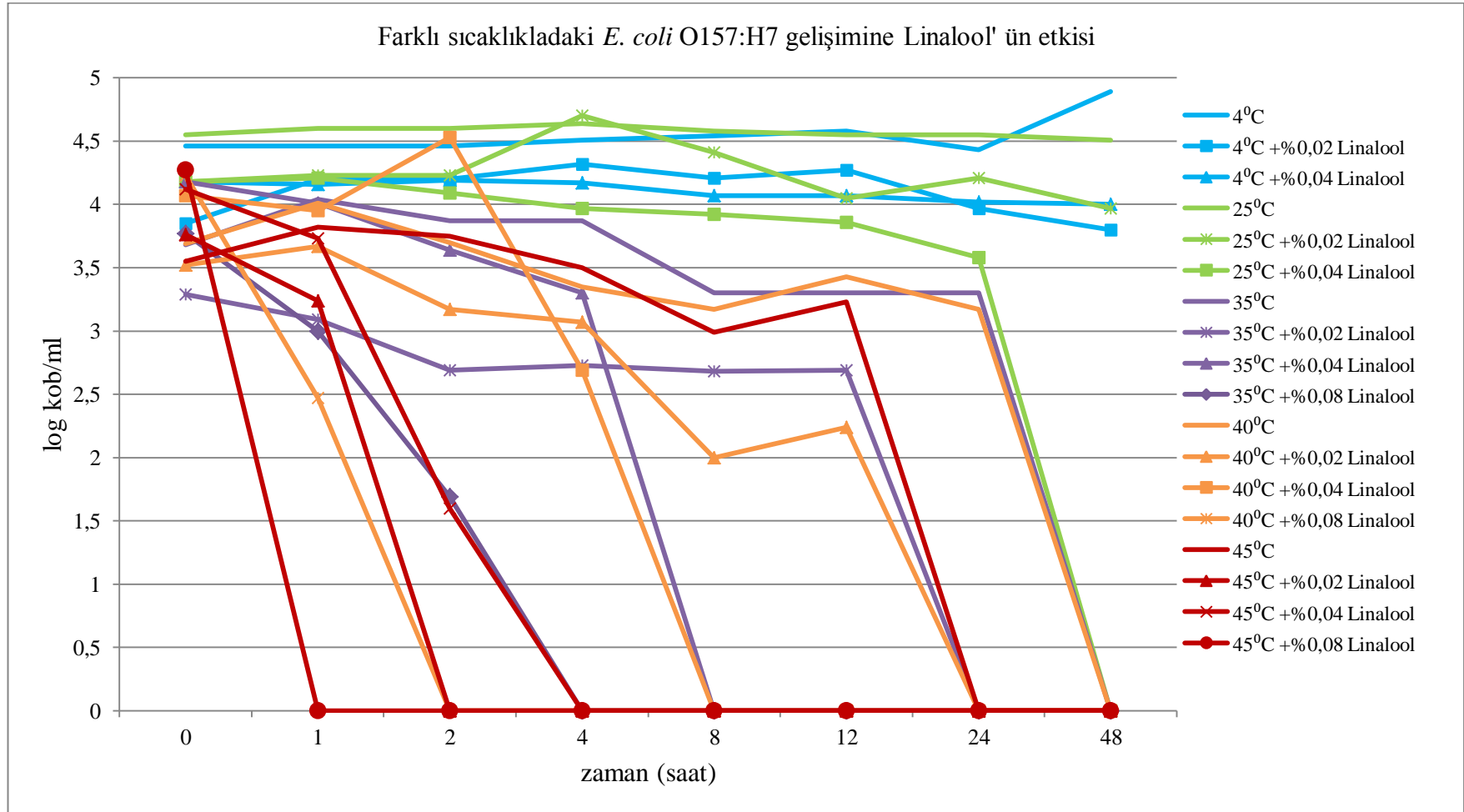
logaritmik birim azalma sağladığı, diğerlerinde ise dikkate değer bir fark meydana gelmediği belirlenmiştir.

- 35 °C’ de 200, 400 ve 800 µl/L konsantrasyonlarında uçucu yağ içeren portakal suları kullanılmıştır. Uçucu yağların bu dozlardaki bakteriyal inaktivasyonlarına bakıldığında, 800 µl/L konsantrasyondaki uçucu yağların daha etkili olduğu görülmüştür. Eugenol’ ün 800 µl/L’ lik konsantrasyonunda 2. saatte ve Linalool ile Cinnamaldehyde’ in 800 µl/L’ lik konsantrasyonunda ise 4. saatte canlı hücre sayısındaki azalma ortalama 3,8 logaritmik birim azalma olmuştur.
- 40 °C’ de Eugenol (Şekil 4. 3.) ve Linalool’ ün (Şekil 4. 4.) 200 ve 400 µl/L’ lik konsantrasyonları bakteriyal inaktivasyonda etkili olsa da, inaktivasyon süresinin uzun olduğu görülmüş ancak 800 µl/L konsantrasyonlarının kullanımları bu süreyi 2 saate kadar kısaltmıştır. Cinnamaldehyde’ in (Şekil 4. 5.) ise her üç dozunda da ancak 8. saatlerde canlı hücrenin kalmadığı saptanmıştır.
- Uçucu yağ eklenerek 45 °C’ de yapılan 48 saatlik inkübasyon sonunda meydana gelen *E. coli* O157:H7 sayısındaki düşüş, uçucu yağ eklenmeyen kontrole göre oldukça fazladır. Sıcaklığın tek başına 24 saat süre sonunda canlı hücre sayısında 3,5 logaritmik birim azalma sağlarken, sıcaklıkla birlikte uçucu yağların ilave edilmesi bu süreyi 2 saate indirmiştir. 800 µl/L dozunda Linalool’ ün ilave edilmesi canlı hücrelerin 1 saat içinde yok olmasını sağlamıştır. 45 °C’ de yapılan inkübasyon sonunda 800 µl/L dozundaki Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde *E. coli* O157:H7 sayısını sırasıyla 4, 1 ve 4 saatte, 4, 4,27 ve 4,14 logaritmik birim azalma meydana getirerek, tespit edilebilir sayının altına düşürmüştür.

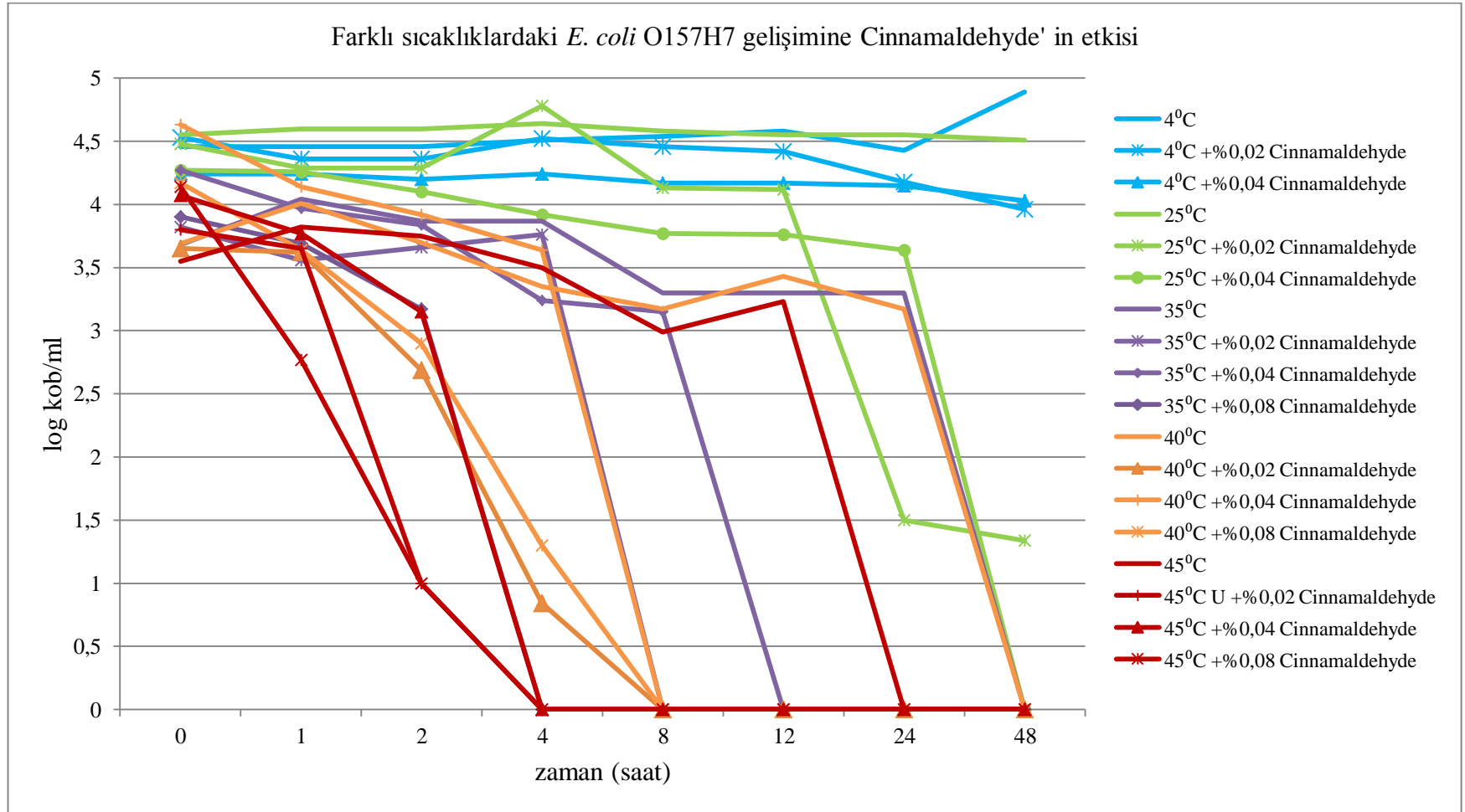
Bu bölümdeki çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde; sıcaklık ve portakal suyuna eklenen uçucu yağ konsantrasyonu yükseldikçe, *E. coli* O157:H7 sayısındaki azalmanın daha belirgin ve hızlı olduğu görülmektedir. Uçucu yağların *E. coli* O157:H7’ yi inhibe edici etkileri karşılaştırıldığında, 40 ve 45 °C’ de, 800 µl/L ’lik konsantrasyonda en etkili uçucu yağlar Eugenol ve Linalool olmuştur. Özellikle Linalool’ ün 800 µl/L’ lik konsantrasyonunun 45 °C’ de 1 saat içinde ve 40 °C’ de 2 saat içinde tam bir bakteriyal inhibisyon göstermesi ilgi çekicidir.



Şekil 4. 3. Eugenol' ün farklı sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7' nin gelişimine etkisi.



Şekil 4. 4. Linalool' ün farklı sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7' nin gelişimine etkisi.



Şekil 4. 5. Cinnamaldehyde' in farklı sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7' nin gelişimine etkisi.

4. 4. 2. Portakal suyundaki *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine uçucu yağların etkisi

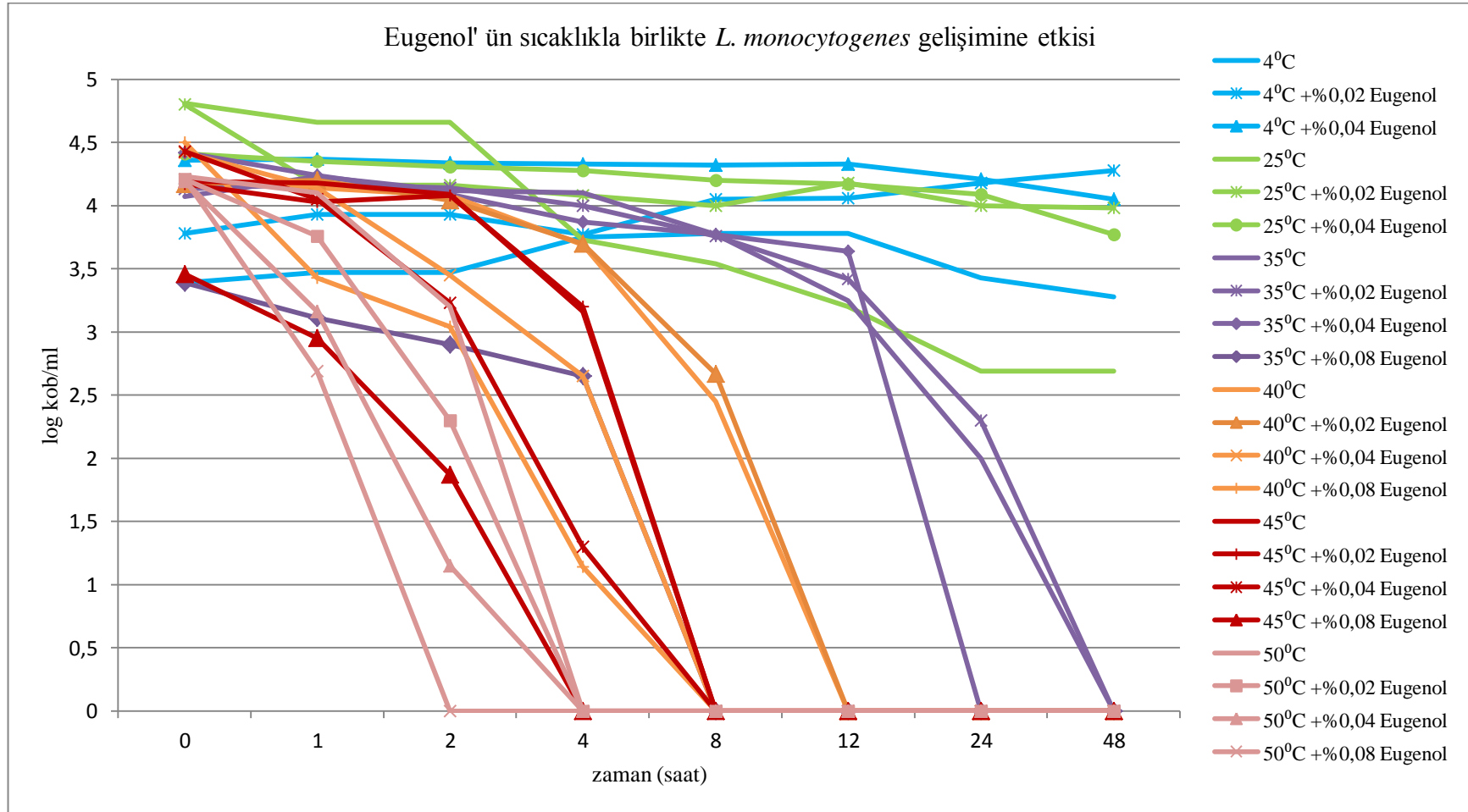
Şekil 4. 6. - 4. 8.' da 200, 400 ve 800 µl/L konsantrasyonlarında Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde eklenen portakal suyunda *L. monocytogenes* inaktivasyonu görülmektedir.

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, sadece sıcaklığın etkisinin belirlendiği kontrol çalışmasının sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde;

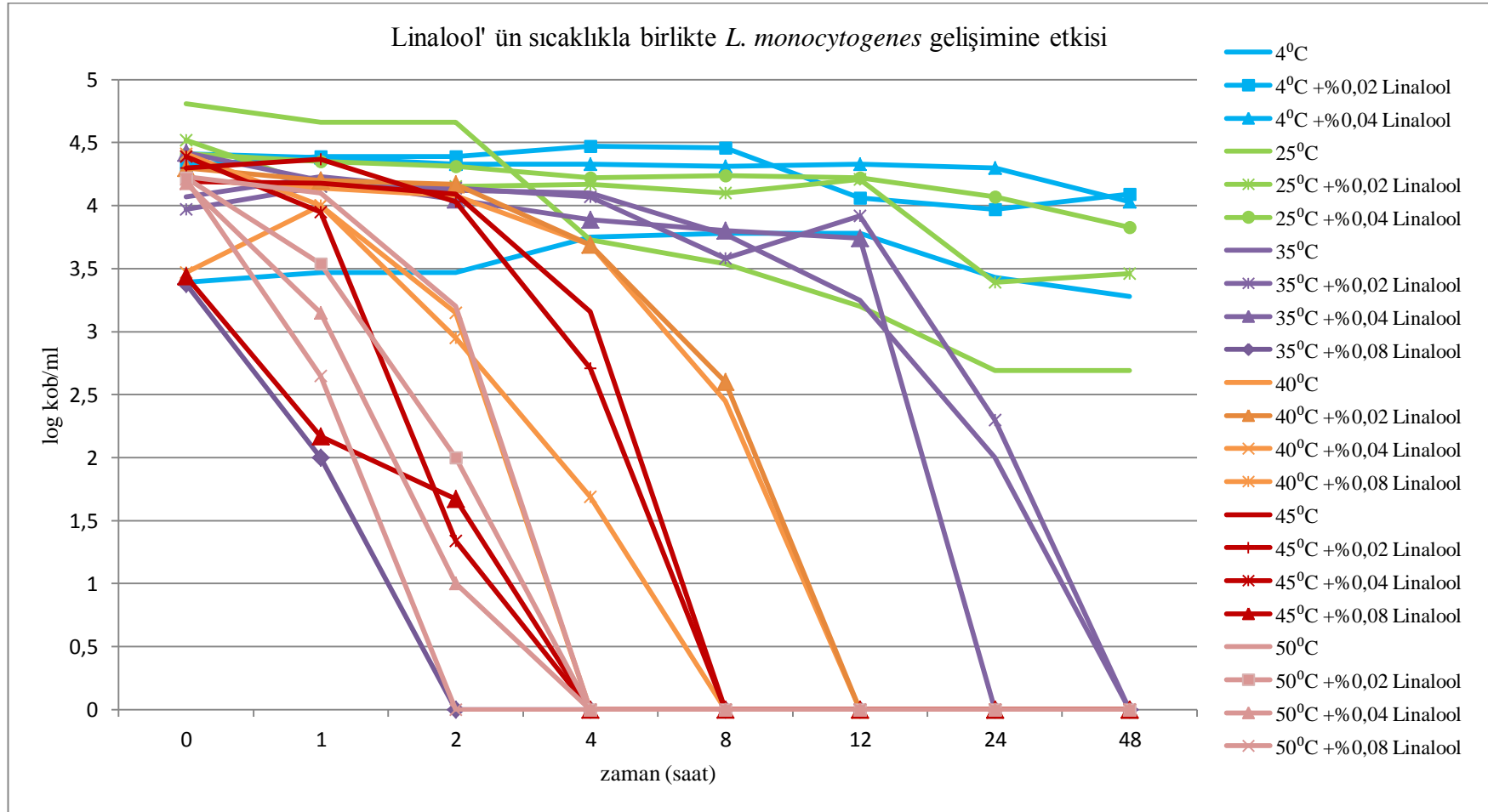
- 4 °C' de inkübe edilen ve içine 200 ve 400 µl/L konsantrasyonlarında Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde eklenmiş portakal sularındaki *L. monocytogenes* sayısında 48 saat boyunca önemli bir değişim gözlenmemiştir.
- Bu uçucu yağların aynı dozlarının 25 °C' de portakal suyuna ilave edilen *L. monocytogenes* gelişiminde veya inaktivasyonunda önemli bir fark yaratmadığı saptanmıştır. Canlı hücre sayılarında yaklaşık olarak sadece 1 logaritmik birimlik değişimler oluşmuştur.
- Kontrolle karşılaştırıldığında, uçucu yağların 200 µl/L dozunda kullanımının, 35 °C' deki portakal suyundaki *L. monocytogenes* üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak 400 µl/L konsantrasyonunda uçucu yağ kullanıldığı 24 saat içinde *L. monocytogenes* sayısı 4,4 logaritmik birim azalmıştır. Uçucu yağ miktarı 800 µl/L konsantrasyonuna arttırılarak portakal suyuna ilave edildiğinde ise, bakteri canlı hücre sayısını Eugenol' ün 8. saatte 3,39 logaritmik birim ve Linalool' ün 2. saatte 3,38 logaritmik birim düşürdüğü görülmüştür. Cinnamaldehyde' in ise kullanılan tüm konsantrasyonlarda inhibitör etkisi düşüktür ve önemli bir fark yaratmamıştır.
- 40 °C' de 200 µl/L konsantrasyonunda uçucu yağların portakal suyuna ilave edildiği çalışmalarda bakteri sayısındaki değişim, sıcaklığın tek başına etkisinin belirlendiği kontrol çalışması ile aynı oranda olmuş ve bakteri sayısında 12 saat sonunda ortalama 4,2 logaritmik birim düşüş belirlenmiştir. Cinnamaldehyde' in dozunun 400 ve 800 µl/L' ye çıkarılması ile bakteri sayısında 4 saatte ortalama 2 logaritmik birim, 8 saatte ise ortalama 4,3 logaritmik birim azalma sağlanmıştır. Eugenol ve Linalool ise Cinnamaldehyde' e göre daha etkili olmuş

ve canlı hücre sayısının azalmasını hızlandırarak, 8 saat sonunda ortalama 4,4 logaritmik birim meydana getirmiştir.

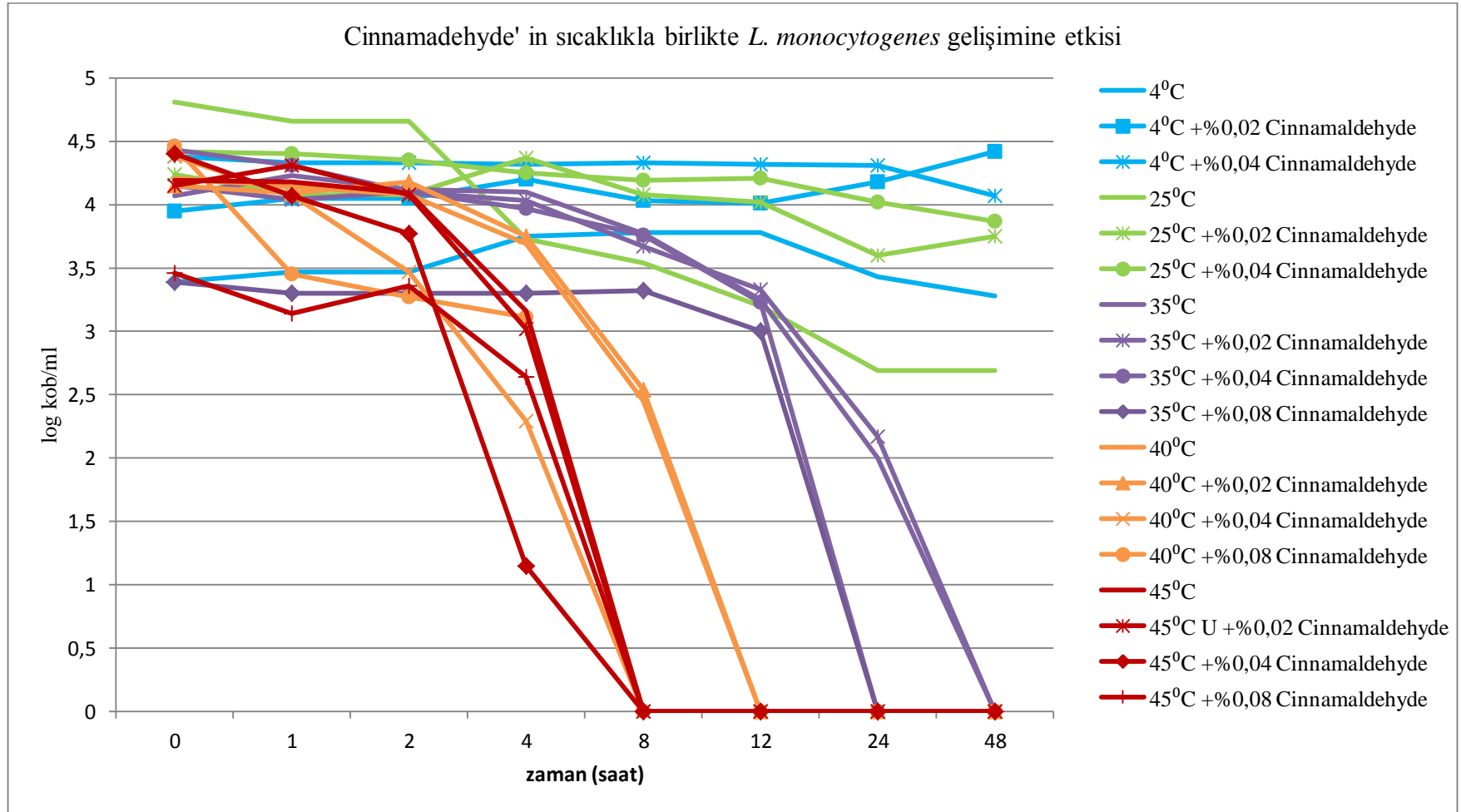
- 45 °C' de portakal suyuna ilave edilen uçucu yağların 200 µl/L dozlarının kullanılması *L. monocytogenes* gelişimde bir fark yaratmamış, kullanılan uçucu yağ miktarlarının artırılması ise bakteri inaktivasyonunu hızlandırmıştır. Sıcaklığın tek başına kullanıldığı kontrol çalışmasında *L. monocytogenes* sayısında, 8 saat sonunda 4,19 logaritmik birimlik, Eugenol ve Linalool' ün 200 µl/L' lik konsantrasyonlarının kullanımları ise bakteri sayısında sırasıyla 8 saat sonunda 4,17 logaritmik birim ve 4 saat sonunda 4,13 logaritmik birim düşüş meydana getirmiştir. Eugenol ve Linalool' ün dozunun 400 ve 800 µl/L' ye çıkarılması, bakteri sayısında 4 saat sonunda ortalama 4 logaritmik birim azalma sağlarken, aynı oranda kullanılan Cinnamaldehyde' in bu iki uçucu yağ kadar etkili olmadığı görülmüştür.
- 50 °C' deki 48 saat süre boyunca inkübasyon ortamlarında Eugenol ve Linalool' ün *L. monocytogenes* üzerine inaktive edici etkisi daha dikkat çekici olmuştur. Sıcaklığın tek başına etkisinin belirlendiği kontrol çalışmasında bakteri sayısında 4 saat sonunda 4,2 logaritmik birim bir düşüş meydana gelmişken, Eugenol ve Linalool' ün 200 ve 400 µl/L konsantrasyonlarında portakal suyuna eklenmesi *L. monocytogenes* sayısını 2 saat sonunda ortalama 4,2 logaritmik birim düşürmüştür ve uçucu yağ miktarını 800 µl/L konsantrasyonunda kullanmak bu bakteri sayısındaki azalmayı bir saatte gerçekleştirmiştir.



Şekil 4. 6. Eugenol' ün farklı sıcaklıklarda *L. monocytogene*' in gelişimine etkisi.



Şekil 4. 7. Linalool' ün farklı sıcaklıklarda *L. monocytogene*' in gelişimine etkisi.



Şekil 4. 8. Cinnamaldehyde' in farklı sıcaklıklarda *L. monocytogene*' in gelişimine etkisi.

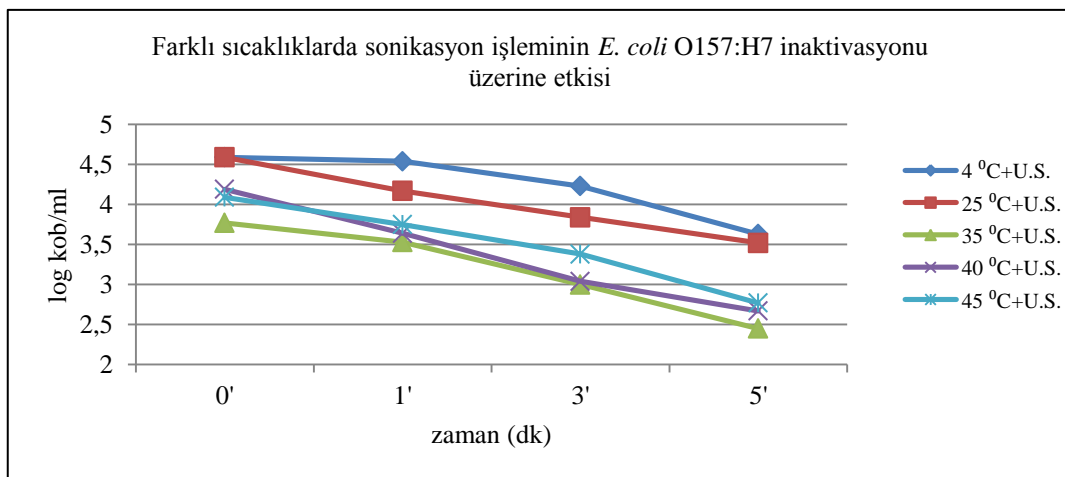
4. 5. Sonikasyonun *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* İnaktivasyonu Üzerine Etkisi

Bu çalışmada *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* farklı sıcaklıklarda sonikasyona maruz bırakılarak, bu iki etkenin birlikte kullanımının bakteriyal inaktivasyon üzerine etkisi incelenmiştir.

Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyonun iki test bakterisinin inaktivasyonu üzerine etkisi Şekil 4. 9. ve Şekil 4. 10.' de verilmiştir.

4. 5. 1. Sonikasyonun farklı sıcaklıklarda portakal suyunda *E. coli* O157:H7' nin gelişimine etkisi

Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyon uygulamasının *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu üzerine etkisi Şekil 4. 9.' de görülmektedir. 4 ve 25 °C' de uygulanan 5 dakikalık sonikasyon işlemi sonunda canlı hücre sayısındaki azalma sadece 1 logaritmik birim olmasına rağmen diğer üç sıcaklıkta bu değer yaklaşık 2 logaritmik birime yükselmiştir. Ancak her üç sıcaklık değerinde de sonikasyon uygulanması, portakal suyuna ilave edilen *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu için istenilen ölçüde etkili olamamıştır.

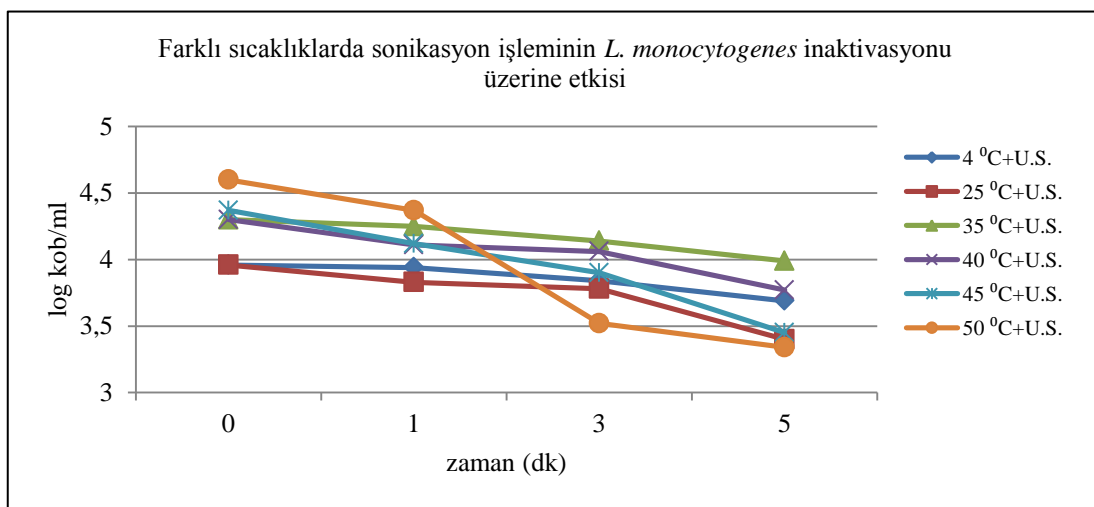


Şekil 4. 9. Sonikasyonun sıcaklıkla birlikte *E. coli* O157:H7' nin inaktivasyonuna etkisi.

Patil ve ark. (2009) yaptıkları benzer bir çalışmada portakal suyunda ultrasound uygulamasının *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NCTC 12900 inaktivasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada 13 mm' lik probun kullanıldığı 20 kHz şiddetindeki sonikasyonun her iki *E. coli* suşunda da olumlu sonuçlar verdi. Portakal suyuna 7,5 ve 37,5 amplitüdünde 15 dk sonikasyon uygulaması *E. coli* NCTC 12900 sayısında sırayla 2,5 ve 2,7 logaritmik azalma sağlamıştır. 0,4 µm amplitüdündeki çalışmalarda *E. coli* ATCC' de 1 logaritmik azalma, *E. coli* NCTC' de ise 1,1 logaritmik azalma görülmüştür (Patil, S., et al., 2009).

4. 5. 2. Sonikasyonun farklı sıcaklıklarda portakal suyunda *L. monocytogenes*' in gelişimine etkisi

Beş dakikalık sonikasyon uygulamasının portakal suyuna ilave edilmiş *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi Şekil 4. 10.' de görülmektedir. Sonikasyonun 50 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta uygulanması durumunda bile bakteri sayısında ancak 1,3 logaritmik birimlik bir azalma görülmüştür. 4, 25, 35 ve 40 °C' lerde uygulanan sonikasyonlarda ise canlı hücre sayısındaki azalma 1 logaritmik birimden daha düşük olmuştur.



Şekil 4. 10. Sonikasyonun sıcaklık ile birlikte *L. monocytogenes*' in inaktivasyonuna etkisi.

4. 6. *E.coli* O157:H7 ve *L.monocytogenes*' in Farklı Sıcaklıklarda Sonikasyonla İnaktivasyonu Üzerine Uçucu Yağların Etkisi

Sonikasyon, sıcaklık ve uçucu yağlar gibi faktörlerin tek başına veya ikili kombinasyonlar halinde kullanımlarının test bakterilerinin gelişimleri veya inaktivasyonları üzerine etkilerinin belirlenmesinden sonra, çalışmanın bu kısmında bu üç etkenin bir arada kullanımının bakteri inaktivasyonunda ne derece etkili olduğu belirlenmiştir.

Bölüm 4. 4.' de Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde' in farklı dozlarının, Bölüm 4. 5.' de ise, sonikasyonun *E.coli* O157:H7 ve *L.monocytogenes* inaktivasyonu üzerine sıcaklık ile etkisi belirlenmiştir. Bu bölümde ise, iki farklı inhibitör etken (US+EO) farklı sıcaklıklarda birlikte kullanılarak, bu birlikteliğin *E.coli* O157:H7 ve *L.monocytogenes* inaktivasyonu için bir sinerji yaratıp yaratmadığı belirlenmiştir.

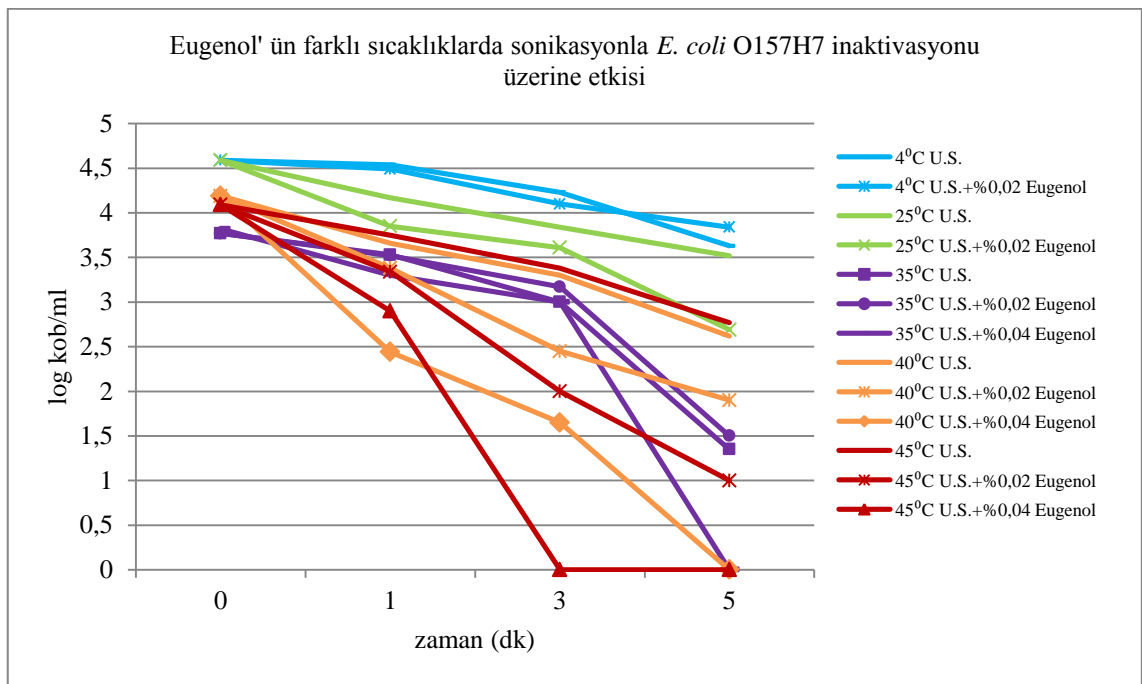
4. 6. 1. Sonikasyonun uçucu yağlar ile birlikte kullanımının portakal suyuna eklenmiş *E.coli* O157:H7' nin inaktivasyonu üzerine etkisi

Portakal suyuna 200, 400 ve 800 µl/L konsantrasyonlarında Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde ilave edilmiş ve sonra *E.coli* O157:H7 ekilerek farklı sıcaklıklarda 5 dakika boyunca sonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 11.–4. 13' de gösterilmiştir. Uçucu yağların 800 µl/L' lik konsantrasyonları ile elde edilen *E.coli* O157:H7 inaktivasyonları ise, ayrı bir grafikte sunulmuştur (Şekil 4. 14.).

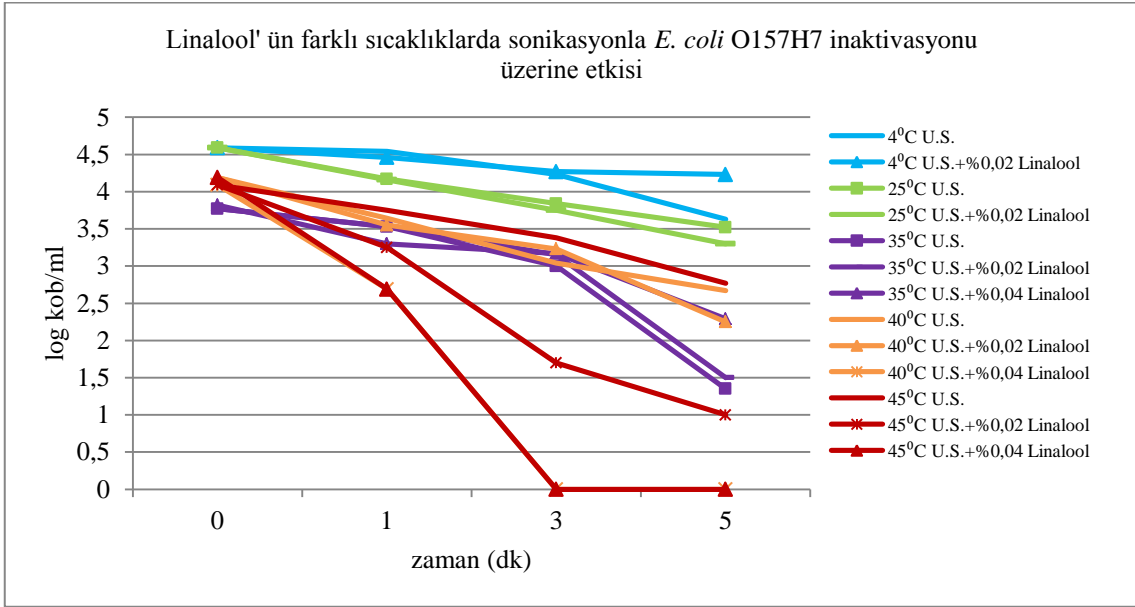
E.coli O157:H7' nin farklı sıcaklıklarda sonikasyonla inaktivasyonu üzerine, portakal suyuna eklenen Eugenol konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde; 45 °C' de yapılan sonikasyonda 400 µl/L Eugenol kullanımının *E.coli* O157:H7 sayısını 3 dakika içinde 4 logaritmik birim azaltarak önemli bir fark yaratmıştır (Şekil 4. 11.).

Şekil 4. 12.' de görüldüğü gibi 400 µl/L Linalool, 45 °C' de yapılan sonikasyonda canlı hücre sayısında 3 dakika içinde yaklaşık 4 logaritmik birim azalmaya neden olmuştur.

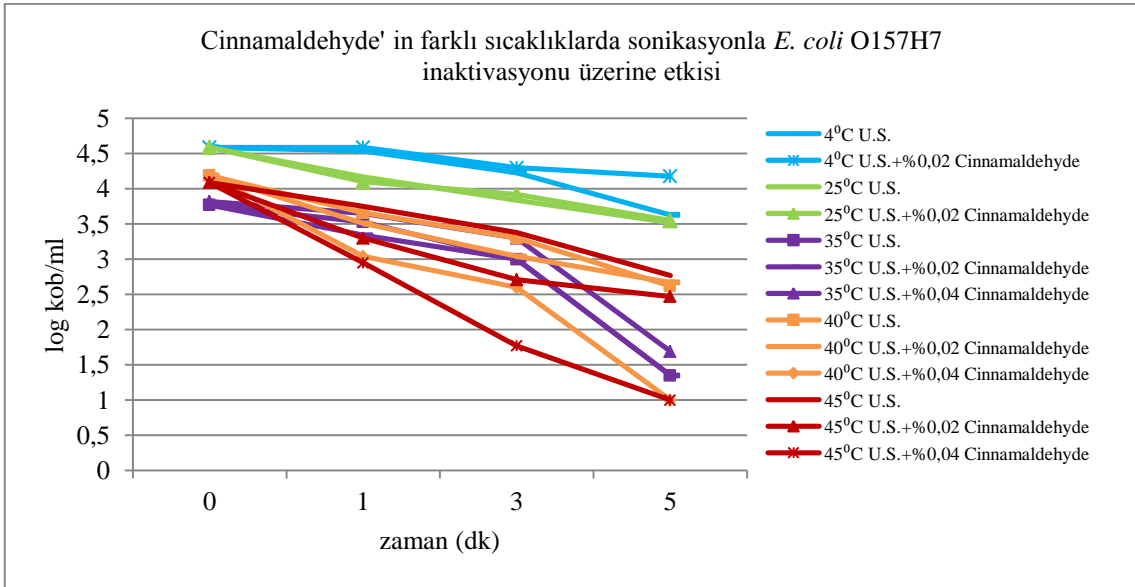
Şekil 4. 13.' deki 200 ve 400 µl/L Cinnamaldehyde ile birlikte yapılan sonikasyonun (4, 25, 35, 40 ve 45 °C' de) portakal suyuna ilave edilen *E. coli* O157:H7 üzerine etkisi incelendiğinde; 5 dakika süre sonunda canlı hücre sayısında 0,5–3,5 logaritmik birim azalma sağladığı görülmüştür. 45 °C' de 400 µl/L dozunda Cinnamaldehyde' in kullanıldığı sonikasyon uygulamasında canlı hücre sayısının 5 dakikada yaklaşık 4 logaritmik birim azaldığı görülmüştür.



Şekil 4. 11. Sonikasyonun Eugenol ile birlikte uygulanmasının *E. coli* O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.



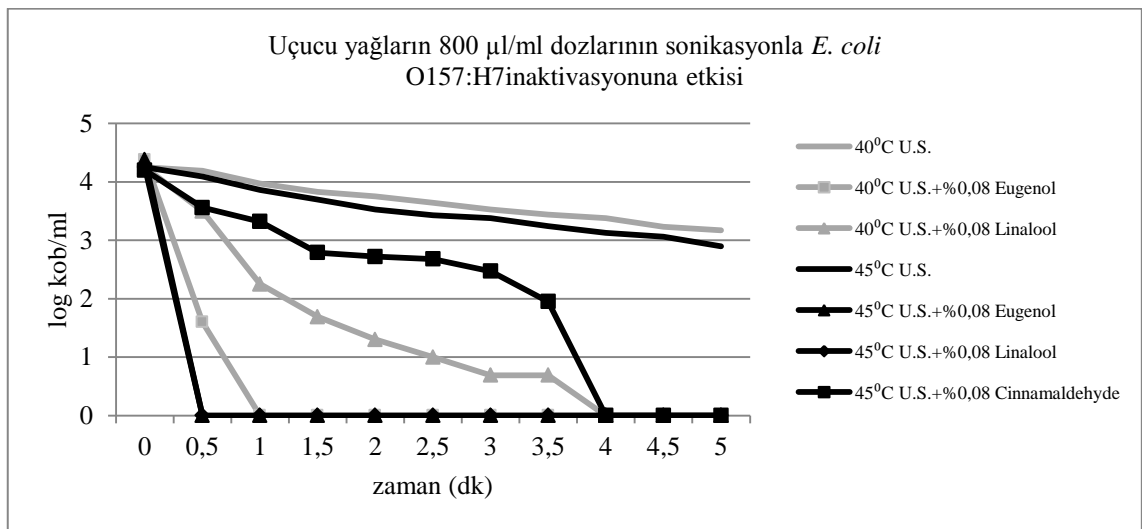
Şekil 4. 12. Sonikasyonun Linalool ile birlikte uygulanmasının *E. coli* O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.



Şekil 4. 13. Sonikasyonun Cinnamaldehyde ile birlikte uygulanmasının *E. coli* O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sonikasyonla *E. coli* O157:H7 inaktivasyonunda en etkili ortam koşullarının, 40 ve 45 °C’ de 400 µl/L dozunda Eugenol ve Linalool ile 45 °C’ de 400 µl/L dozunda Cinnamaldehyde’ in kullanıldığı ortam koşulları olduğu söylenebilir. *E. coli* O157:H7’ nin sonikasyonla inaktivasyonu için gerekli sürenin kısaltılması amacıyla uçucu yağ konsantrasyonlarının artırılması düşünülmüştür. Bu nedenle, uçucu yağ konsantrasyonları iki katına çıkartılarak (800 µl/L) daha kısa zaman aralıklarında örnek alınmıştır.

Şekil 4. 14.’ de 800 µl/L dozunda uçucu yağ kullanımı ile sonikasyonun öldürücü etkisinin artışı görülmektedir. Uçucu yağ miktarlarının 800 µl/L dozuna çıkarılması ile uygulanan sonikasyonun Şekil 4. 14.’ de görülen sonuçlarına göre, Cinnamaldehyde’ in bakteriyel inaktivasyon üzerine etkisinin aynı şartlarda kullanılan Eugenol ve Linalool’ e oranla daha az olduğu ve *E. coli* O157:H7 üzerine en etkili inaktivasyonun 45 °C’ de portakal suyuna ilave edilen 800 µl/L’ lik Eugenol ve Linalool ile uygulanan sonikasyon ile sağlandığı belirlenmiştir. Her iki ortak koşulunda da 0,5 dakikalık sonikasyon sonunda bakteri inaktivasyonu gerçekleşmiş ve Eugenol canlı sayısında 4,38 logaritmik birim, Linalool ise 4,25 logaritmik birim azalma meydana getirmiştir.

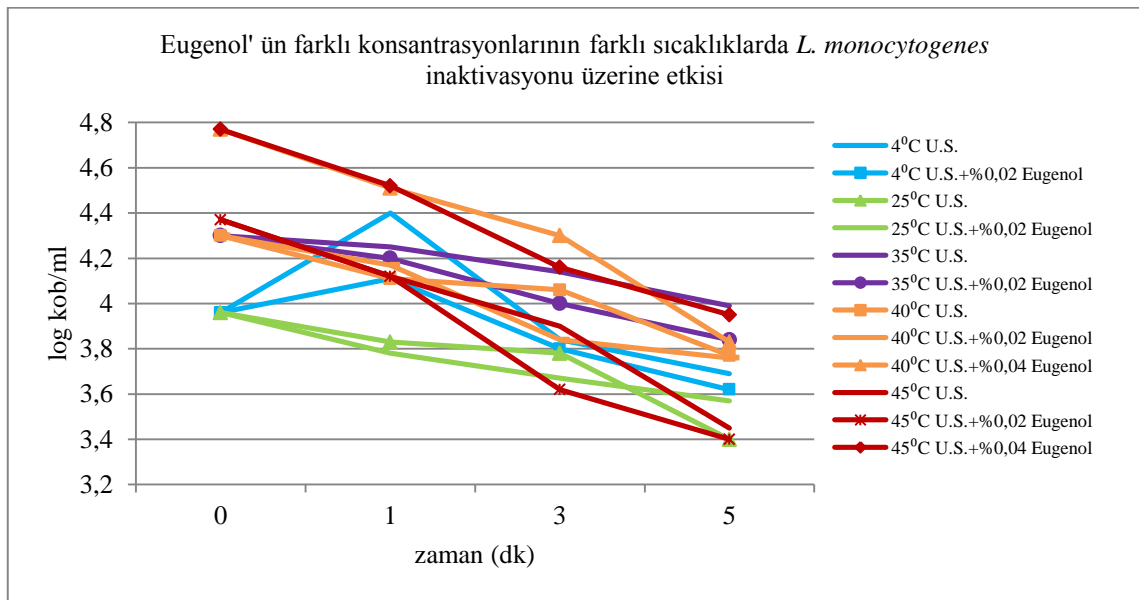


Şekil 4. 14. Sonikasyonla birlikte 800 µl/L dozunda uçucu yağların kullanımlarının *E. coli* O157:H7 inaktivasyonuna etkisi.

4. 6. 2. Sonikasyonun uçucu yağlar ile birlikte kullanımının portakal suyuna eklenmiş *L. monocytogenes*' in inaktivasyonu üzerine etkisi

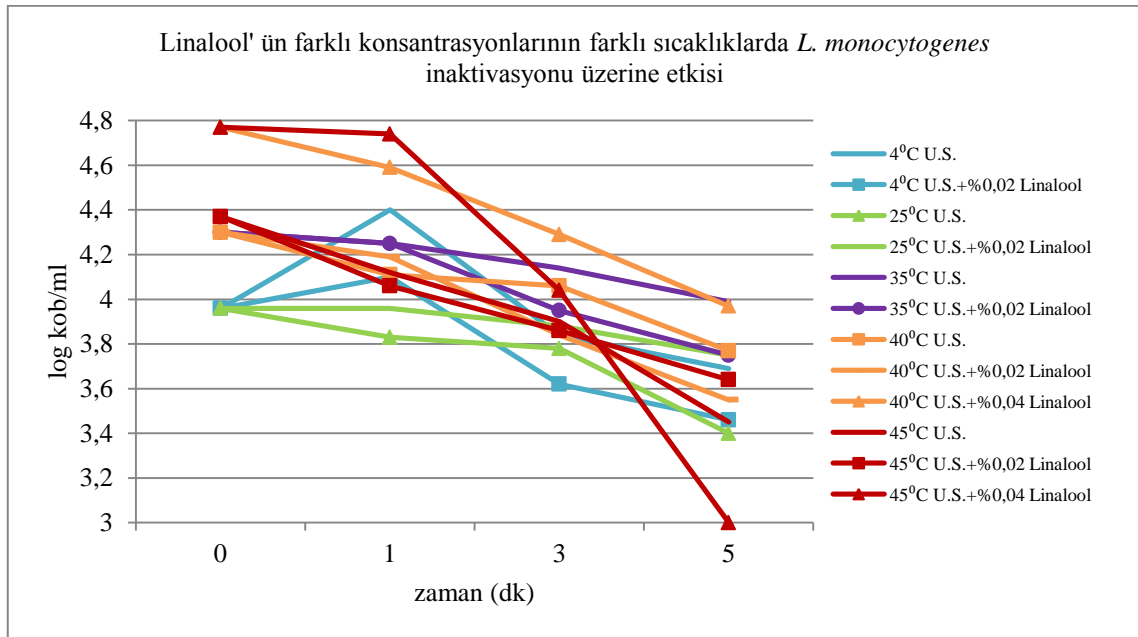
Portakal suyuna 200, 400 ve 800 µl/L konsantrasyonlarında Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde ilave edilmiş ve sonra *L. monocytogenes* ekilerek farklı sıcaklıklarda 5 dakika boyunca sonikasyon uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 15.–4. 17' te gösterilmiştir. Uçucu yağların 800 µl/L' lik konsantrasyonları ile elde edilen *L. monocytogenes* inaktivasyonları ise ayrı bir grafikte sunulmuştur (Şekil 4. 18.).

Şekil 4. 15.' te *L. monocytogenes*' in farklı sıcaklıklarda sonikasyonla inaktivasyonu üzerine, portakal suyuna eklenen Eugenol konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde; 45 °C' de yapılan sonikasyonda 400 µl/L Eugenol kullanımının *L. monocytogenes* sayısını sadece 1 logaritmik birim azalma sağladığı belirlenmiştir. Buna göre 4, 25, 35, 40 ve 45 °C' de 200 ve 400 µl/L' lik Eugenol konsantrasyonlarının *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine sinerjistik bir etki yaratmadığı söylenebilir.



Şekil 4. 15. Sonikasyonun Eugenol ile birlikte uygulanmasının *L. monocytogenes* inaktivasyonuna etkisi.

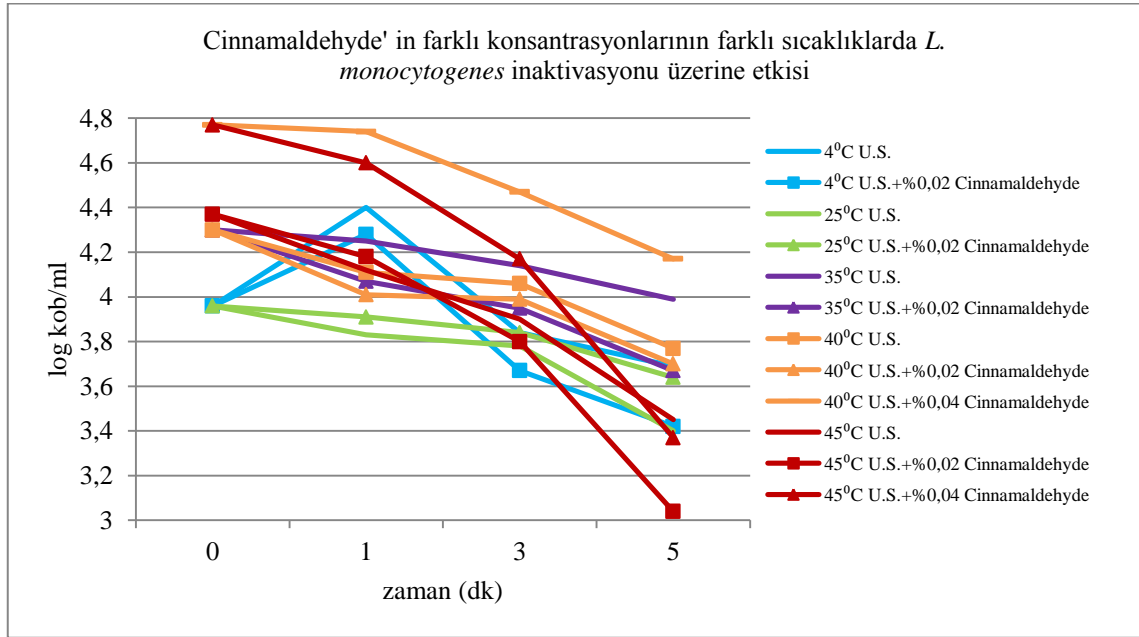
Şekil 4. 16.' da 200 ve 400 µl/L konsantrasyonunda Linalool' ün portakal suyuna eklenmesi ile uygulanan beş farklı sıcaklıktaki sonikasyon işleminin *L. monocytogenes* inaktivasyonuna etkisi gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, 45 °C' de 400 µl/L' lik Linalool konsantrasyonunda 5 dakikalık sonikasyon sonunda bakteri sayısında 1,8 logaritmik birimlik bir azalma gözlenmiş, aynı koşullardaki kontrollerde bakteri sayısındaki azalmanın ise 0,9 logaritmik birim olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 16. Sonikasyonun Linalool ile birlikte uygulanmasının *L. monocytogenes* inaktivasyonuna etkisi.

Cinnamaldehyde' in 200 ve 400 µl/L dozunda portakal suyuna ilave edilmesi ile 4, 25, 35, 40 ve 45 °C' de sonikasyon uygulanması *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi Şekil 4. 17.' de gösterilmiştir. Sonikasyonla birlikte Cinnamaldehyde' in etkisinin belirlendiği denemelerde, 45 °C' de yapılan sonikasyon işlemi sonucunda 400 µl/L konsantrasyonunda Cinnamaldehyde kullanımının bakteri sayısında sadece 1,4 logaritmik birim azalma meydana getirdiği belirlenmiştir. Aynı sıcaklıktaki kontrol çalışmasında *L. monocytogenes* sayısındaki azalmanın 0,92 logaritmik birim olduğu göz

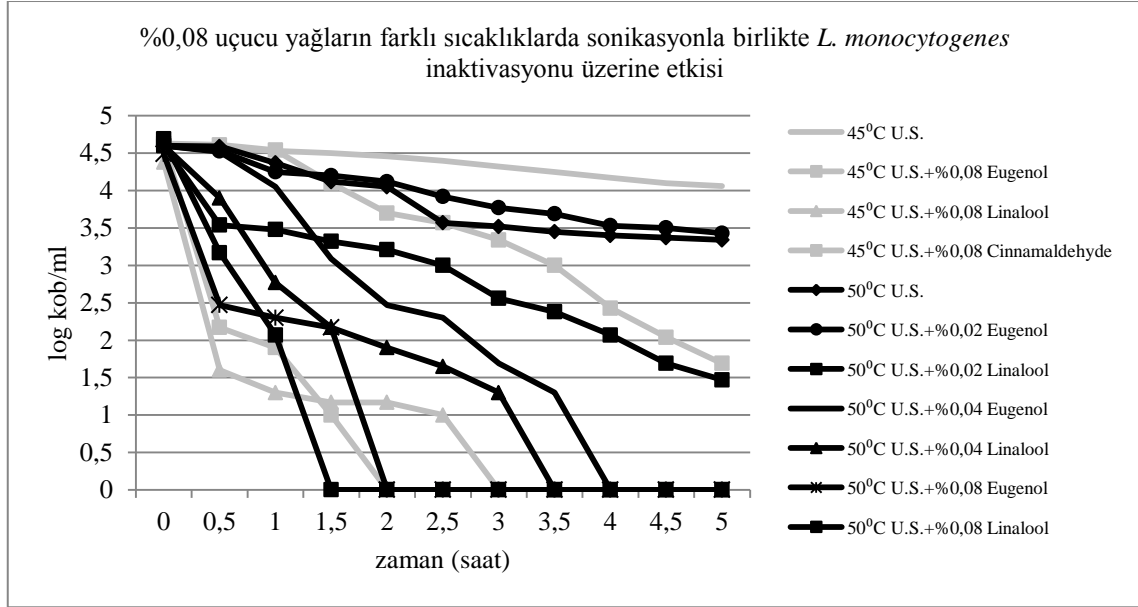
önüne alınırsa, 400 µl/L' lik Cinnamaldehyde' in sonikasyonla inaktivasyonda önemli bir değişim oluşturmadığı söylenebilir.



Şekil 4. 17. Sonikasyonun Cinnamaldehyde ile birlikte uygulanmasının *L. monocytogenes* inaktivasyonuna etkisi.

Yukarıda verilen sonuçlar değerlendirildiğinde; kullanılan uçucu yağ miktarlarının *L. monocytogenes* inaktivasyonunda yeterli olmadığı belirlenmiş ve 45 °C' de 800 µl/L konsantrasyonunda uçucu yağlar ile çalışılmaya karar verilmiştir. Ayrıca *L. monocytogenes* için denemelere 50 °C' de dahil edilerek daha kısa inaktivasyon süreleri elde edilmeye çalışılmıştır. Şekil 4. 18.' de görüldüğü gibi 45 ve 50 °C' de Eugenol ve Linalool miktarının 800 µl/L' ye çıkarılması, sonikasyonlu çalışmalarda bakteri inaktivasyonunu gerçekleştirmiştir. 45 °C' de, Cinnamaldehyde oranının 800 µl/L' ye yükseltilmesi 5 dakikalık sonikasyon sonunda bakteri inaktivasyonunu tamamen gerçekleştiremese de canlı hücre sayısında yaklaşık 3 logaritmik birim azalma sağlamıştır. Ancak Cinnamaldehyde' in, Eugenol ve Linalool gibi 5 dakikalık sonikasyon sonunda bakteri inaktivasyonunda istenilen ölçüde etkili

olamamasından dolayı sadece Eugenol ve Linalool' ün 45 ve 50 °C' de 800 µl/L dozlarının sonikasyonla birlikte kullanılması uygun görülmüştür.



Şekil 4. 18. Sonikasyonla birlikte 800 µl/L dozunda uçucu yağların ve 50 °C' deki Eugenol ve Linalool kullanımlarının *L. monocytogenes* inaktivasyonuna etkisi.

Şekil 4. 18.' te görüldüğü gibi 45 ve 50 °C' de sıcaklıkta Eugenol ve Linalool miktarlarının 800 µl/L' ye çıkartılarak sonikasyon uygulanmasının portakal suyundaki *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine çok daha etkili olduğu görülmüştür. 45 °C' deki kontrol çalışmasında bakteri sayısında 0,92 logaritmik birimlik bir azalma meydana gelmişken, aynı ortam koşulunda portakal suyuna 800 µl/L konsantrasyonunda Eugenol' ün ilave edildiği sonikasyon sonucunda bakteri sayısının 2 dakika sonunda 4,63 logaritmik birim ve 800 µl/L konsantrasyonunda Linalool' ün ilave edildiği sonikasyon sonucunda bakteri sayısının 3 dakika sonunda 4,38 logaritmik birim azaldığı belirlenmiştir. Sıcaklık 50 °C' ye çıkartıldığında ise 5 dakika boyunca sadece sonikasyon uygulanması portakal suyundaki bakteri sayısında ancak 1,26 logaritmik birim azalma meydana getirmekteyken, aynı ortam koşullarına 800 µl/L konsantrasyonunda Eugenol ve Linalool eklenmesi bakteri sayısında sırasıyla 2 dakikada 4,49 ve 1,5 dakikada 4,69 logaritmik birim azalma meydana getirmiştir.

4. 7. Portakal Suyunda *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* Gelişimi Üzerine Sitrik Asitin Etkisi

4. 7. 1. Sitrik asit konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığının etkisi

Sitrik asit birçok gıdada özellikle de meyve sularında koruyucu olarak kullanılan bir kimyasaldır (Stratford, et al., 2003). Çalışmanın bu kısmında sitrik asitin test bakterileri üzerindeki inhibitör etkisi incelenmiştir.

Bu amaçla sitrik asit, uçucu yağ denemelerinde kullanılan oranlarda portakal suyuna eklenerek farklı sıcaklıklarda (4, 25, 35, 40 ve 45 °C) inkübasyonu sırasında *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* sayısındaki değişim belirlenmiştir.

4. 7. 1. 1. Portakal suyunda *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerine sitrik asitin etkisi

Belirli oranlarda sitrik asit eklenmiş portakal sularının farklı sıcaklıklardaki inkübasyonunun *E. coli* O157:H7 gelişimine etkisi Şekil 4. 19.' da gösterilmektedir.

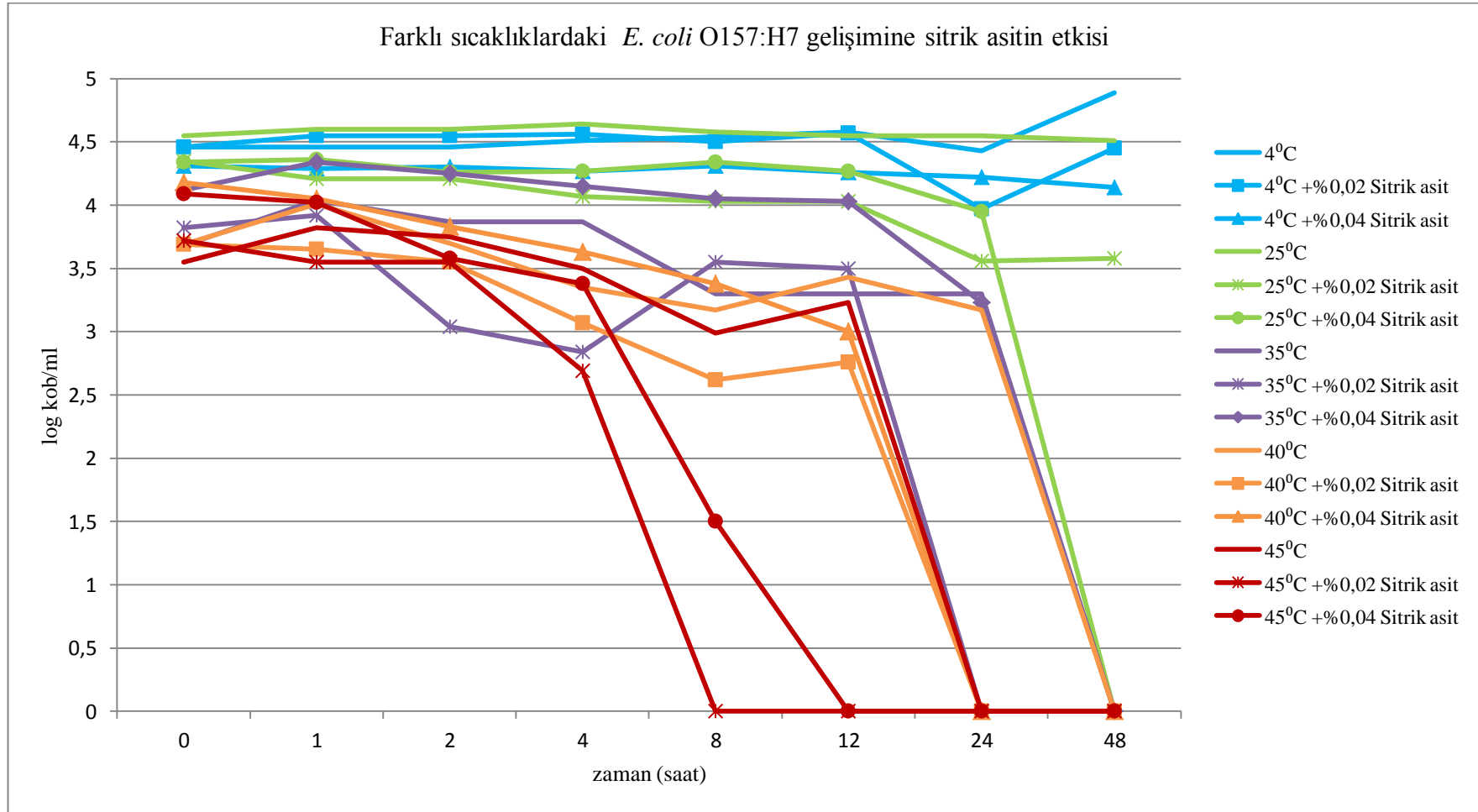
- 4 °C' de yapılan çalışmalarda, kullanılan hiçbir sitrik asit konsantrasyonu *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerine olumsuz bir etki yaratmamış ve sayıları neredeyse sabit kalmıştır.
- 25 °C' deki inkübasyon sonunda, sadece 400 µl/L' lik sitrik asit ilavesi ile 48 saat sonunda *E. coli* O157:H7 sayısında 4,3 logaritmik birimlik bir azalma meydana gelmiştir.
- Sıcaklığın etkisinin artışıyla, 35 °C' de sitrik asitin kullanılan her iki dozunun da, sıcaklığında etkisi ile bakteri hücre sayısında ortalama 3,5 logaritmik birim azalma sağladığı belirlenmiştir.
- Tek başına 48 saat sonunda 3,5 logaritmik birimden fazla bakteri hücre sayısında azalma sağlayan 40 °C' nin sitrik asit ilave edilmesi ile bu etkisinin 24 saate düştüğü görülmüştür.

- Canlı hücre sayısındaki azalma 45 °C’ de diğerlerine oranla daha dikkat çekici olmuştur. 45 °C’ de inkübe edilen portakal suyunda *E. coli* O157:H7 sayısında 24 saat sonunda yaklaşık 3,5 logaritmik azalma görülüyorken, 200 ve 400 µl/L dozunda sitrik asitin ilave edilmesi ile sırasıyla 8 ve 12 saatte yaklaşık 4 logaritmik birimlik azalma tespit edilmiştir.

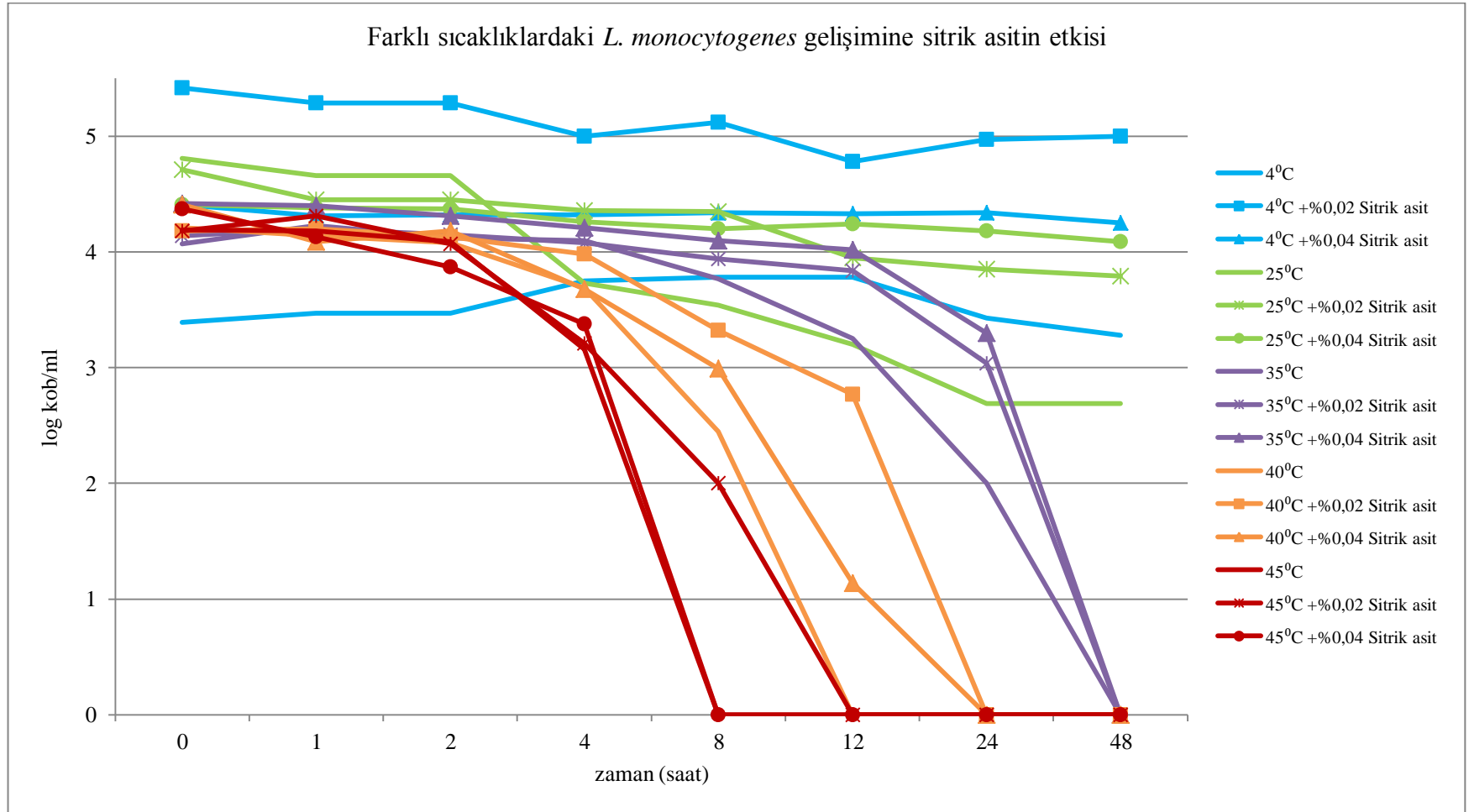
4. 7. 1. 2. Portakal suyunda *L. monocytogenes* gelişimi üzerine sitrik asitin etkisi

Portakal suyuna 200 ve 400 µl/L dozlarında sitrik asitin eklenmesi ile *L. monocytogenes* gelişimindeki değişim Şekil 4. 20.’ de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi;

- 4 ve 25 °C’ de portakal suyuna ilave edilen sitrik asit *L. monocytogenes* gelişimi üzerine önemli bir etki göstermemiştir.
- 35 °C’ de portakal suyunda inkübe edilen *L. monocytogenes* gelişiminde 48 saat sonunda canlı hücre sayısında ortalama 4 logaritmik azalma görülmüştür ve sitrik asitin ortama ilave edilmesi bu etki üzerinde önemli bir fark yaratmamıştır.
- 40 ve 45 °C’ lerde ise 400 µl/L sitrik asit ilave edilmesi ile portakal suyundaki *L. monocytogenes* sayısı sırasıyla 24 saatte 4,41 logaritmik birim ve 8 saatte 4,37 logaritmik birim düşmüştür. Bakteri sayısındaki bu düşüşlerin nedeni, sıcaklığın artışı ve besin eksilmesidir.



Şekil 4. 19. Sitrik asit' in farklı sıcaklıklarda *E. coli* O157:H7' nin gelişimine etkisi.



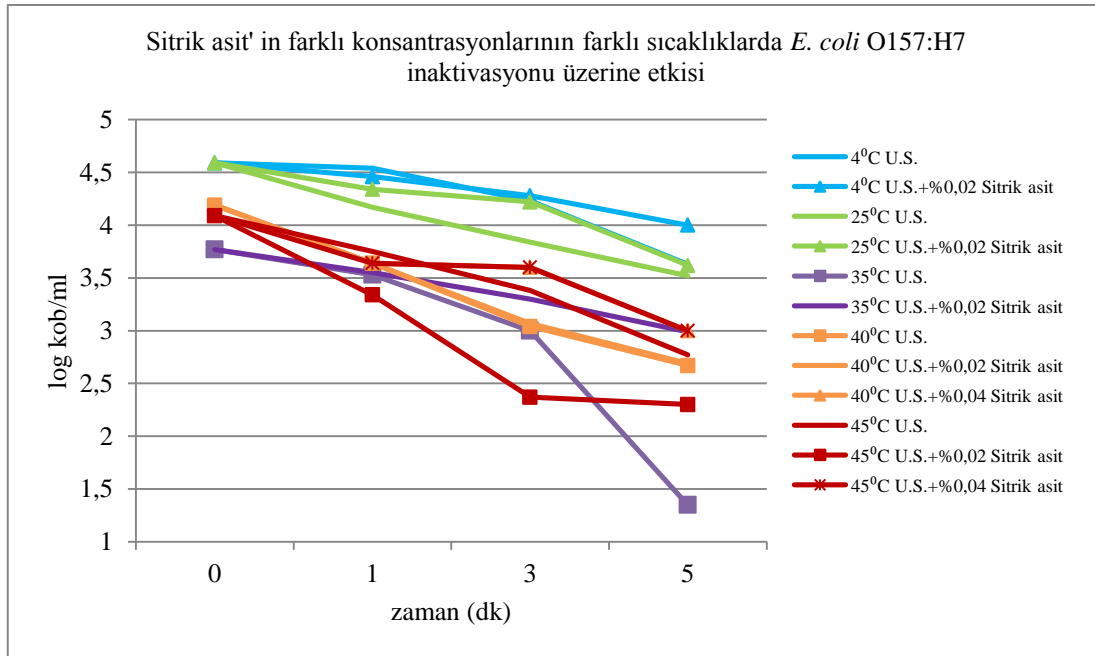
Şekil 4. 20. Sitrik asit' in farklı sıcaklıklarda *L. monocytogene*' in gelişimine etkisi.

4. 7. 2. Sitrik asit ve sonikasyonun birlikte etkisi

Çalışmanın bu kısmında sonikasyonun sitrik asitin inhibitör etkisini artırıp arttırmadığı belirlenmiştir. Denemelerde portakal suyuna 200 ve 400 µl/L dozunda sitrik asit eklenmiş ve farklı sıcaklıklarda (4, 25, 35, 40 ve 45 °C) 5 dakika sonikasyon uygulanmıştır.

4. 7. 2. 1. *E. coli* O157:H7' ve etkisi

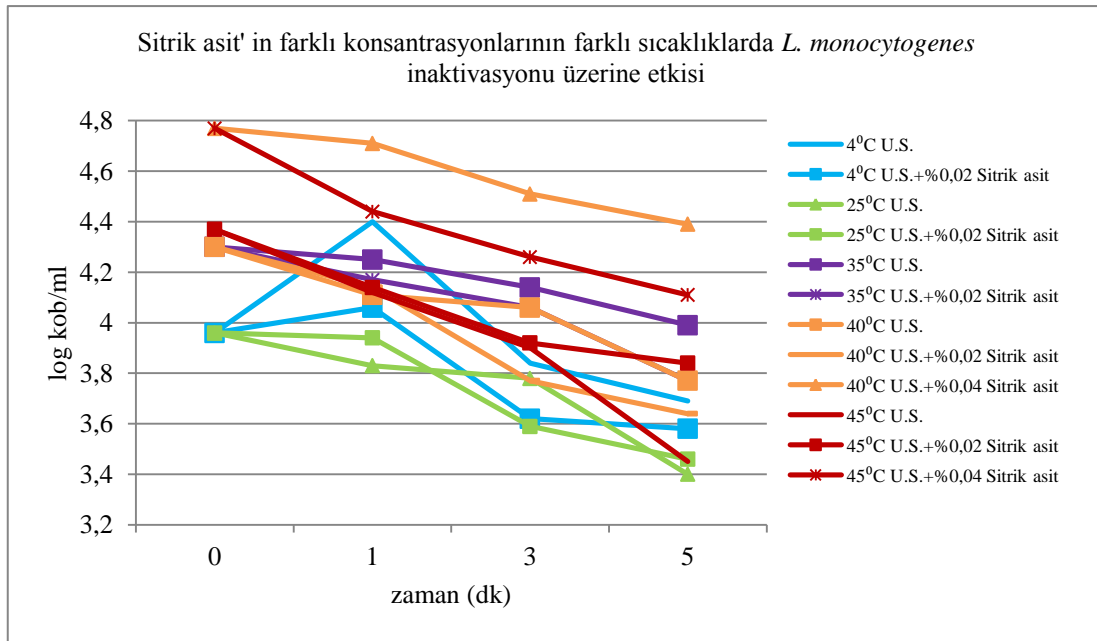
Sadece sonikasyon uygulanmış kontrollerle karşılaştırıldığında, 200 ve 400 µl/L sitrik asit ilavesinin ortamdaki *E. coli* O157:H7 sayısı üzerinde bir değişim meydana getirmediği Şekil 4. 21.' de görülmektedir. 40 ve 45 °C' de 5 dakikalık sonikasyon sonrasındaki *E. coli* O157:H7 sayılarındaki düşüşün nedeni artan sıcaklık olmuştur.



Şekil 4. 21. Sitrik asitin sonikasyonla birlikte *E. coli* O157:H7 üzerine etkisi.

4. 7. 2. 2. *L. monocytogenes* ' e etkisi

Sitrik asitin sonikasyonla birlikte *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisinin denendiği hiçbir sıcaklıkta sinerjistik bir etkileşim belirlenmemiştir. Sıcaklık kontrolleriyle karşılaştırılmalı olarak sitrik asit ve sonikasyonun birlikte uygulanmasından elde edilen sonuçlar Şekil 4. 22.' de verilmiştir. Bakteri sayısındaki düşüşün artan sıcaklık nedeniyle olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 22. Sitrik asitin sonikasyonla birlikte *L. monocytogenes* üzerine etkisi.

4. 8. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* İnaktivasyon Süreleri

Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyon ile birlikte çeşitli uçucu yağlar ve sitrik asit kullanımının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inaktivasyon süresi üzerine etkisi Çizelge 4. 3. ve Çizelge 4. 4.' de verilmiştir.

Çizelge 4. 3. *E. coli* O157:H7' nin inaktivasyon süreleri ve canlı hücre sayısındaki logaritmik azalmalar.

Sıcaklık (°C)	Uçucu yağ	Konsantrasyon (µl/L)	İnaktivasyon süresi(dakika)	Canlı hücre sayısındaki logaritmik azalma
4	Kontrol (Sadece US)	–	>5	0,96
	Eugenol	200	>5	0,75
	Linalool	200	>5	0,36
	Cinnamaldehyde	200	>5	0,41
	Sitrik asit	200	>5	0,59
25	Kontrol (Sadece US)	–	>5	1,07
	Eugenol	200	>5	1,9
	Linalool	200	>5	1,29
	Cinnamaldehyde	200	>5	1,04
	Sitrik asit	200	>5	0,97
35	Kontrol (Sadece US)	–	>5	2,42
	Eugenol	200	>5	2,27
		400	5	3,82
	Linalool	200	>5	1,53
		400	>5	2,27
	Cinnamaldehyde	200	>5	2,42
		400	>5	2,13
	Sitrik asit	200	>5	0,78
		400	>5	1,19
	40	Kontrol (Sadece US)	–	>5
Eugenol		200	>5	2,29
		400	5	3,82
		800	1	4,25
Linalool		200	>5	1,94
		400	5	4,09
		800	4	4,25
Cinnamaldehyde		200	>5	1,52
		400	>5	3,19
Sitrik asit		200	>5	1,5
		400	>5	1,19
45		Kontrol (Sadece US)	–	>5
	Eugenol	200	>5	3,09
		400	3	4,09
		800	0,5	4,38
	Linalool	200	>5	3,09
		400	3	4,19
		800	0,5	4,25
	Cinnamaldehyde	200	>5	1,62
		400	>5	3,09
		800	4	4,2
	Sitrik asit	200	>5	1,79
		400	>5	1,09

Çizelge 4. 4. *L.monocytogenes*' in inaktivasyon süreleri ve canlı hücre sayısındaki logaritmik azalmalar.

Sıcaklık (° C)	Uçucu yağ	Kullanılan miktar	İnaktivasyon süresi	Canlı hücre sayısındaki logaritmik azalma
4	Kontrol (Sadece US)	–	>5	0,27
	Eugenol	200	>5	0,34
	Linalool	200	>5	0,5
	Cinnamaldehyde	200	>5	0,54
	Sitrik asit	200	>5	0,38
25	Kontrol (Sadece US)	–	>5	0,56
	Eugenol	200	>5	0,39
	Linalool	200	>5	0,21
	Cinnamaldehyde	200	>5	0,32
	Sitrik asit	200	>5	0,5
35	Kontrol (Sadece US)	–	>5	0,31
	Eugenol	200	>5	0,46
	Linalool	200	>5	0,55
	Cinnamaldehyde	200	>5	0,63
	Sitrik asit	200	>5	0,53
40	Kontrol (Sadece US)	–	>5	0,53
	Eugenol	200	>5	0,54
		400	>5	0,94
	Linalool	200	>5	0,75
		400	>5	0,8
	Cinnamaldehyde	200	>5	0,6
		400	>5	0,6
	Sitrik asit	200	>5	0,66
400		>5	0,38	
45	Kontrol (Sadece US)	–	>5	0,92
	Eugenol	200	>5	0,97
		400	>5	0,82
		800	2	4,63
	Linalool	200	>5	0,73
		400	>5	1,77
		800	3	4,38
	Cinnamaldehyde	200	>5	1,33
		400	>5	1,4
		800	>5	2,94
	Sitrik asit	200	>5	0,53
400		>5	0,66	
50	Kontrol (Sadece US)	–	>5	1,26
	Eugenol	200	>5	1,17
		400	4	4,6
		800	2	4,49
	Linalool	200	>5	3,13
		400	3,5	4,6
		800	1,5	4,69

Tüm uygulamalar için 5 dakikalık bir işlem süresi kullanılmıştır. Bu süre içinde bakteri sayılarındaki düşüşler logaritmik birim olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 3.' de görüldüğü gibi portakal suyuna eklenen 200 µl/L ve 400 µl/L' lik uçucu yağ dozları, *E. coli* O157:H7 üzerinde 4, 25 ve 35 °C' lik sıcaklıklarda neredeyse hiç etkili olmamıştır.

40 °C' de portakal suyuna uygulanan 5 dakikalık sonikasyonlarda özellikle Eugenol' ün 800 µl/L' lik dozu, *E. coli* O157:H7 üzerinde iyi bir inaktivasyon sağlamış ve başlangıçta 4,25 log kob/ml olan *E. coli* O157:H7 sayısında 1 dakikalık işlem sonunda 4,25 logaritmik birim azalma sağlamıştır.

45 °C' de uygulanan sonikasyonlarda ise portakal suyuna eklenen 800 µl/L Eugenol ve Linalool 30 sn sonunda *E. coli* O157:H7 hücre sayısını sırasıyla 4,38 ve 4,25 logaritmik birim azalmıştır.

E. coli O157:H7' de olduğu gibi 4, 25, 35 ve 40 °C sıcaklığındaki ortamlara eklenen 200 ve 400 µl/L uçucu yağın portakal suyundaki *L. monocytogenes* sayısında önemli bir değişiklik oluşturmadığı belirlenmiştir. Sonikasyon sonunda meydana gelen bakteri sayısındaki düşüş logaritmik birim olarak Çizelge 4. 4.' te gösterilmiştir.

45 °C' de portakal suyuna 800 µl/L Eugenol ve Linalool eklenerek yapılan sonikasyonlarda *L. monocytogenes* sarısıyla 2 ve 3 dakikalık süre sonunda tamamen inaktive olmuştur. Sonikasyonun tek başına 45 °C' de 5 dakika uygulanması ile *L. monocytogenes* sayısında 0,92 logaritmik birim azalma sağlamışken, portakal suyuna 800 µl/L dozunda Eugenol eklenmesi ile uygulanan 2 dakikalık sonikasyon sonunda *L. monocytogenes* sayısında 4,63 logaritmik birim ve 800 µl/L dozunda Linalool eklenmesi ise 3 dakikalık sonikasyon sonunda 4,38 logaritmik birim azalma sağlayarak sinerjistik bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

L. monocytogenes' in Eugenol ve Linalool' ün 200 µl/L lik dozlarının sonikasyon işleminde, portakal suyundaki *L. monocytogenes* inaktivasyonunda önemli bir etkisinin olmadığı ancak 400 µl/L ve 800 µl/L' lik dozlarının etkili oldukları belirlenmiştir. Eugenol' ün 400 µl/L' lik kullanımı 4 dakikalık sonikasyon sonunda *L.*

monocytogenes sayısında 4,6 logaritmik birim azalma, 800 µl/L' lik kullanımının ise 2 dakikalık sonikasyon sonunda *L. monocytogenes* sayısında 4,49 logaritmik birim azalma sağladığı belirlenmiştir. Linalool' ün 400 µl/L' lik dozda kullanımı ile 3,5 dakikalık sonikasyon sonunda *L. monocytogenes* sayısında 4,6 logaritmik birim azalma sağlamışken, 800 µl/L' lik kullanım ile 1,5 dakikalık sonikasyon sonunda *E. coli* O157:H7 sayısında 4,69 logaritmik birim azalma meydana getirmiştir.

Bir çalışmada marul yapraklarındaki *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* sayısına sitrik asitin etkisi incelenmiştir ve %2 oranında sitrik asit kullanımı ile toplam bakteri sayısında 5 dk sonunda meydana gelen ortalama 1,4 logaritmik azalma 40 kHz frekansında 5 dk' lık sonikasyon uygulaması ile %2' lik sitrik asitin birlikte kullanımı sonucunda ortalama 2,4 logaritmik birim olmuştur (Hun-Gu Sagong, et al., 2011). Bizim çalışmamızda ise, 5 dk' lık sonikasyon işlemi ile birlikte uygulanan en yüksek sitrik asit düzeyinde dahi (%0,04), portakal suyundaki test bakterilerinin inaktivasyonu önemli ölçüde etkilenmemiştir. Bunun başlıca nedeni konsantrasyonun düşük olmasıdır.

4. 9. Sinerjistik Etki Değerlendirmesi

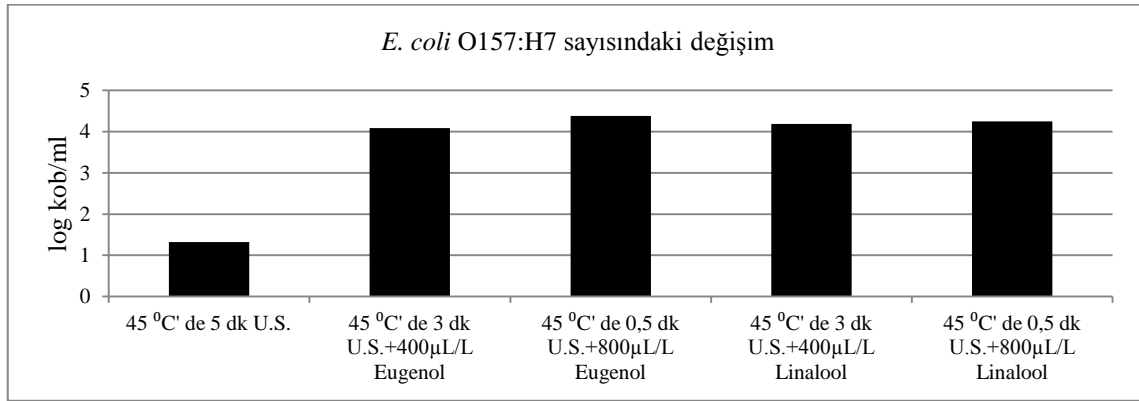
Ultrasound ve uçucu yağların birlikte kullanımındaki amaç test ortamı olarak seçtiğimiz portakal suyunda yeterli bir bakteri inhibisyonu yaratmaktır.

İki farklı inhibitör etkeni birlikte uyguladığımız işlemlerin verimini değerlendirmede, onların birlikteliklerinin bakteri inhibisyonu için bir sinerji yaratıp yaratmadığını belirlemek faydalı olacaktır. Sinerjistik etki, iki etkenin birlikte kullanılmasından elde edilen etkinin, tek başlarına uygulanmaları ile elde edilen etkinin toplamından fazla olmasıdır. Eugenol kullanımı ile Linalool kullanımı arasında sonikasyonla *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu arasında önemli bir fark görülmemiştir.

Şekil 4. 23. ve Şekil 4. 24.' de sıcaklık, sonikasyon ve uçucu yağ gibi inhibitör faktörlerin tek tek ve birlikte kullanımlarından elde edilen sayısal düşüşler karşılaştırılmıştır.

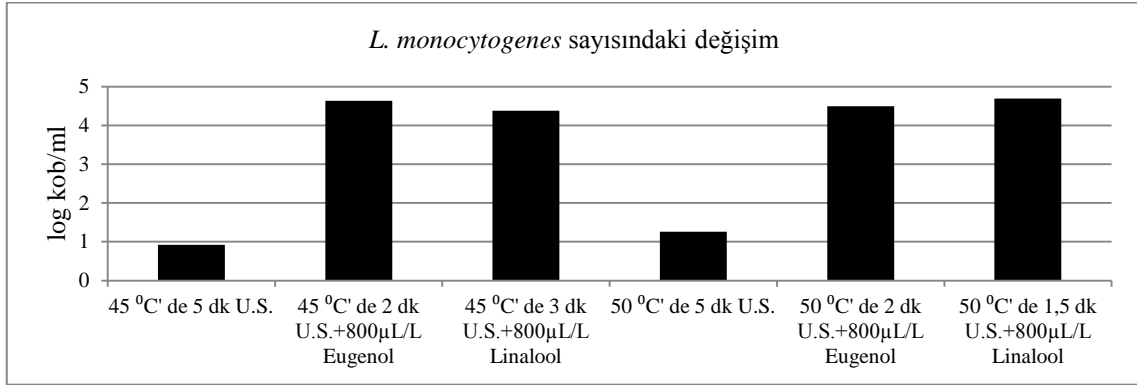
E. coli O157:H7' nin sonikasyonla inaktivasyonu için uygulanan en yüksek sıcaklık olan 45 °C' de dahi 5 dakika süre içinde hücre sayısında 1,32 logaritmik birimlik bir azalma görülürken, aynı sıcaklıkta Eugenol' ün 400 µl/L kullanımı 3 dakikada 4,09 logaritmik birim, 800 µl/L kullanımı 30 sn' de 4,38 logaritmik birim ve Linalool' ün ise 400 µl/L kullanımı 3 dakikada 4,19 logaritmik birim, 800 µl/L kullanımı da 30 sn' de 4,25 logaritmik birim azalma sağlamıştır (Şekil 4. 23.).

Sonuç olarak Eugenol ve Linalool eşliğinde (400 ve 800 µl/L) 45 °C' de yapılan tüm sonikasyon çalışmalarında *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu için sinerjistik bir etkileşimin meydana geldiği söylenebilir.



Şekil 4. 23. *E. coli* O157:H7 üzerine sonikasyon ve uçucu yağların sinerjistik etkisi.

L. monocytogenes için ise durum biraz daha farklıdır. *L. monocytogenes* inaktivasyonu için 45 °C' de yapılan sonikasyon çalışmalarında, *E. coli* O157:H7' ye kıyasla daha uzun inaktivasyon süreleri gerekmiştir. Bu nedenle sıcaklık 5 °C daha yükseltilmiş ve böylelikle uçucu yağlar eşliğinde daha kısa sürede yeterli bir inaktivasyon sağlanmıştır (Şekil 4. 24.). Tek başına sonikasyon uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uçucu yağ eşliğinde 45 ve 50 °C' de yapılan sonikasyonların *L. monocytogenes* inaktivasyonunda sinerjistik bir etki gösterdiği söylenebilir. Ancak tam bir inaktivasyon meydana gelmesi için gereken süre her uygulama için *E. coli* O157:H7' de olduğundan daha uzundur.



Şekil 4. 24. *L. monocytogenes* üzerine sonikasyon ve uçucu yağların sinerjistik etkisi.

4. 10. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi

Bakteriyal inaktivasyon amacıyla kullanılan faktörlerin (sonikasyon, sıcaklık ve uçucu yağ) tek tek veya birlikte uygulanması sonucu gözlenen farklılıkların önemini belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Aşağıda varyans analizinde kullanılan faktörler verilmiştir (Çizelge 4. 5.).

Çizelge 4. 5. Bakteriyal inaktivasyon için kullanılan faktörler ve deneme sayıları.

		N
Bakteri	<i>E. coli</i>	85
	<i>L. monocytogenes</i>	103
Sonikasyon	0	101
	%80 amplitüd	87
Sıcaklık	4	26
	25	36
	35	29
	40	41
	45	43
	50	13
Uçucu yağ	yok	61
	var	127

Varyans analizinin sonuçları ise Çizelge 4. 5.' de verilmiştir. Çizelge 4. 5.' de görüldüğü gibi sonikasyon uygulamaları karşısında bakterilerin davranışları arasındaki fark önemli (mo*sonik p=0.00) olmuştur. Ayrıca farklı sıcaklıklarda yapılan

uygulamalar (sıc p=0,00) ve uçucu yağ kullanımının (UçY p=0,002) bakteriler üzerinde etkisi de önemli olmuştur. İkili interaksiyonlardan sonik*mo ve sonik*sic (sonikasyon yüksek sıcaklıklarda daha etkili olmuş anlamına geliyor) önemli olmuştur. Üçlü ve 4' lü interaksiyonlardan ise sadece, sonik*sic*mo önemli (p=0,038; p< 0,05) olmuştur. mikroorganizmalar sıcak*sonik kombinasyonlarına farklı tepkiler vermişler ama genel olarak tüm deneme kapsamında ortalama olarak aynı düzeyde etkilenmişler.

Çizelge 4. 6. Varyans kaynakları arasındaki testler **T 2. Tests of Between-Subjects Effects**

Varyans kaynağı	Tip III kareler ortlamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Önemlilik (Sig.)
MİKROORGANİZMA (MO)	,541	1	,541	3,581	,060
SONİKASYON	148,775	1	148,775	985,560	,000
SICAKLIK	22,499	5	4,500	29,809	,000
UÇUCU YAĞ (UçY)	1,501	1	1,501	9,944	,002
MO * SONİK	3,446	1	3,446	22,829	,000
MO * SIC	,672	4	,168	1,113	,353
SONİK * SIC	7,458	5	1,492	9,881	,000
MO * SONİK * SIC	,258	4	,064	,427	,789
MO * UçY	,526	1	,526	3,484	,064
SONİK * UçY	,193	1	,193	1,278	,260
MO * SONİK * UçY	,664	1	,664	4,399	,038
SIC * UçY	1,058	5	,212	1,402	,227
MO * SIC * UçY	,229	4	,057	,379	,823
SONİK * SIC * UçY	,199	5	,040	,264	,932
MO * SONİK * SIC * UçY	,073	3	,024	,162	,922
Hata payı	21,888	145	,151		
Toplam	932,159	188			
Düzeltilmiş toplam	308,622	187			

a R Squared = ,929 (Adjusted R Squared = ,909)

Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyon sırasında uçucu yağ kullanımının bakteriyel inaktivasyon üzerine etkisi ise çizelge 4. 7.' de görülmektedir.

Çizelge 4. 7. Farklı sıcaklıklarda yapılan sonikasyon sırasında uçucu yağ kullanımının bakteriyel inaktivasyon üzerine etkisi.

Varyans kaynağı	Tip III kareler ortlaması	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Önemlilik (Sig.)
Doğrulanmış Model	9,144(a)	21	,435	9,604	,000
a katsayısı/sabit	23,773	1	23,773	524,332	,000
MO	3,808	1	3,808	83,991	,000
SIC	2,924	5	,585	12,900	,000
UçY	,300	1	,300	6,613	,012
MO * SIC	,430	4	,108	2,373	,061
MO * UçY	,006	1	,006	,123	,727
SIC * UçY	,395	5	,079	1,742	,137
MO * SIC * UçY	,062	4	,016	,343	,848
Hata payı	2,947	65	,045		
Toplam	45,678	87			
Düzeltilmiş toplam	12,091	86			

a R Squared = ,756 (Adjusted R Squared = ,678)

Burada görüldüğü gibi bakteri türü, sıcaklık ve uçucu yağ varlığı önemli olmuş ancak bunların interaksiyonları önemsiz olmuştur.

Çizelge 4. 7.' de görüldüğü gibi, sonikasyon uygulamasında *E. coli* için logD 0,4533 (D= 2,84 dk) olurken *L. monocytogenes* için logD 0,7643 (D 5,81 dk) olmuştur. İki bakteri arasındaki ortalama D değerleri arasındaki fark yaklaşık 2 kat civarındadır. Burada ortalamaların geometrik ortalama olduğu dikkate alınarak karşılaştırmayı D değerleri üzerinden yaparsak bu fark daha da açılacaktır.

Çizelge 4. 8. Sonikasyon uygulamasında *E. coli* ve *L. monocytogenes* için belirlenen logD değerleri.

Mikroorganizma	Ortalama	N	Standart sapma
<i>E. coli</i>	,4533	40	,21453
<i>L. monocytogenes</i>	,7643	47	,42235
Toplam	,6213	87	,37496

Çizelge 4. 8.' de görüldüğü gibi sıcaklık düzeyi de LogD değeri üzerine etkili olmuştur (p=0,000). Sıcaklıkların etkisini tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırsak, Sonuçlar Çizelge 4. 9.' da görülmektedir (Çizelge 4. 9.). LogD değerleri artan sıcaklığa

bağlı olarak düzenli bir azalma göstermektedir. Sonikasyon uygulandığında 4 °C’de ortalama 0,9052 olan logD (D= 8 dk) 50 °C’ de 0,1131 (D=1,3 dk) olmuştur.

Çizelge 4. 9. Sıcaklık düzeyinin LogD değeri üzerine etkisi.

Sıcaklık (°C)	Ortalama	N	Standart sapma
4	,9052	13	,15923
25	,7975	15	,33481
35	,6567	11	,34670
40	,6258	19	,32059
45	,4737	22	,34562
50	,1131	7	,37466
Toplam	,6213	87	,37496

Yine Çizelge 4. 9.’ da görüldüğü gibi sonikasyon yapılan örneklerde uçucu yağ kullanılıp kullanılmaması da inaktivasyonda etkili olmuştur (p=0,012). Çizelge 4. 10.’ da uçucu yağ kullanılan ve kullanılmayan inaktivasyon çalışmalarından elde edilen D değerlerinin logaritmaları karşılaştırılmaktadır. Koruyucu kullanılmayan kontrol grubu çalışmalardaki logD ortalaması 0,7520 (D= 5,7 dk) olurken, koruyucu kullanılanlarda bu değer 0,5375’e (D= 3,4 dk) inmiştir.

Çizelge 4. 10. Uçucu yağ kullanılan ve kullanılmayan inaktivasyon çalışmalarından elde edilen D değerlerinin karşılaştırılması.

UçY	Ortalama	N	Standart sapma
,00	,7520	34	,29147
1,00	,5375	53	,40033
Toplam	,6213	87	,37496

Kullanılan uçucu yağlardan hangisinin inaktivasyonda daha fazla etkili olduğunu belirlemek amacıyla yapılan varyans analizinde, uçucu yağ çeşitinin inaktivasyon üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuş ancak, uçucu yağ kullanımının LogD değerleri üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4. 10.). Uçucu yağ kullanılmayan şahitler ve uçucu yağ konsantrasyonu sıfır olan düzeyler “4” kodu ile işaretlenmiştir. Bu grupta logD 0,7520 (D=5,7 dk) olurken 3 farklı uçucu yağ kullanılan grupların ortalamaları 0,5129–0,5772 arasında değişmiştir. Bu üç grubun ortalamalarının birbirlerinden farkı

önemsizken, uçucu yağ kullanılmayan kontrol grubu ile sadece 1 ve 2 nolu uçucu yağların ortalamalarının farkı önemli bulunmuştur.

Çizelge 4. 11. Sonikasyonda kullanılan uçucu yağ çeşitlerinin inaktivasyon üzerindeki etkisi.

Uçucu yağ	Ortalama	N	Standart sapma
1	,5245	18	,43390
2	,5129	18	,43220
3	,5772	17	,34614
4	,7520	34	,29147
Toplam	,6213	87	,37496

Sonikasyon, sıcaklık ve uçucu yağların birlikte kullanımının *E. coli* O157:H7' ye da *L. monocytogenes*' in D değerlerini ne şekilde etkilediği ise Çizelge 4. 12.' de görülmektedir. Yüksek sıcaklıklarda yapılan sonikasyonda uçucu yağların kullanımı ile 4 D süreleri 5–10 dakikaya inmiştir.

Çizelge 4. 12. Sonikasyon, sıcaklık ve uçucu yağların birlikte kullanımının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*' in D değerleri üzerine etkisi.

Mikroorganizma	Sıcaklık	Uçucu yağ	Ortalama	N	Standart sapma	D	4D
<i>E.coli</i>	4	,00	,7142	3	,00000	5,178453	20,71381
		1,00	,7754	3	,05301	5,96211	23,84844
		Toplam	,7448	6	,04742	5,556483	22,22593
	25	,00	,5480	5	,20088	3,531832	14,12733
		1,00	,4667	3	,00000	2,928869	11,71548
		Toplam	,5175	8	,15756	3,292305	13,16922
	35	,00	,3279	1	.	2,127649	8,510596
		1,00	,4307	6	,10485	2,695877	10,78351
		Toplam	,4160	7	,10330	2,606154	10,42461
	40	,00	,5192	4	,12791	3,305217	13,22087
		1,00	,2750	6	,19405	1,883649	7,534596
		Toplam	,3727	10	,20559	2,358848	9,435393
	45	,00	,4443	4	,30376	2,781634	11,12654
		1,00	,2214	5	,02149	1,664945	6,659782
		Toplam	,3205	9	,22053	2,091703	8,366812
	Total	,00	,5332	17	,20329	3,413501	13,654
		1,00	,3943	23	,20726	2,479134	9,916536
		Toplam	,4533	40	,21453	2,83988	11,35952

Çizelge 4. 12. Sonikasyon, sıcaklık ve uçucu yağların birlikte kullanımının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*' in D değerleri üzerine etkisi (devam).

Mikroorganizma	Sıcaklık	Uçucu yağ	Ortalama	N	Standart sapma	D	4D	
<i>L.monocytogenes</i>	4	,00	1,0185	4	,01949	10,43518	41,74073	
		1,00	1,0747	3	,00000	11,87682	47,50726	
		Toplam	1,0426	7	,03304	11,03062	44,12249	
	25	,00	1,0995	4	,12727	12,57477	50,29907	
		1,00	1,1415	3	,00000	13,8516	55,40641	
		Toplam	1,1175	7	,09275	13,1069	52,4276	
	35	,00	1,2097	1	.	16,2069	64,82761	
		1,00	1,0339	3	,00000	10,81185	43,2474	
		Toplam	1,0778	4	,08793	11,9619	47,84758	
	40	,00	1,0227	3	,00000	10,53659	42,14635	
		1,00	,8492	6	,10667	7,066429	28,26572	
		Toplam	,9070	9	,12101	8,07235	32,2894	
	45	,00	,8045	4	,09112	6,375291	25,50116	
		1,00	,4799	9	,42503	3,019256	12,07703	
		Toplam	,5798	13	,38318	3,800144	15,20057	
	50	,00	,5373	1	.	3,445879	13,78352	
		1,00	,0424	6	,35561	1,102554	4,410217	
		Toplam	,1131	7	,37466	1,297478	5,189912	
	Total	,00	,9709	17	,17918	9,351903	37,40761	
		1,00	,6473	30	,47544	4,439152	17,75661	
		Toplam	,7643	47	,42235	5,811657	23,24663	
	Toplam	4	,00	,8881	7	,16324	7,728585	30,91434
			1,00	,9251	6	,16730	8,415889	33,66356
			Toplam	,9052	13	,15923	8,038962	32,15585
25		,00	,7931	9	,33279	6,21012	24,84048	
		1,00	,8041	6	,36956	6,369422	25,47769	
		Toplam	,7975	15	,33481	6,273357	25,09343	
35		,00	,7688	2	,62354	5,872189	23,48875	
		1,00	,6318	9	,31275	4,283512	17,13405	
		Toplam	,6567	11	,34670	4,536282	18,14513	
40		,00	,7350	7	,28397	5,432503	21,73001	
		1,00	,5621	12	,33495	3,648379	14,59352	
		Toplam	,6258	19	,32059	4,22474	16,89896	
45		,00	,6244	8	,28314	4,211143	16,84457	
		1,00	,3876	14	,35754	2,441181	9,764724	
		Toplam	,4737	22	,34562	2,97646	11,90584	
50		,00	,5373	1	.	3,445879	13,78352	
		1,00	,0424	6	,35561	1,102554	4,410217	
		Toplam	,1131	7	,37466	1,297478	5,189912	
Total		,00	,7520	34	,29147	5,64937	22,59748	
		1,00	,5375	53	,40033	3,447466	13,78986	
		Toplam	,6213	87	,37496	4,181191	16,72476	

4. 11. Sonikasyon İşleminde Sonra Farklı Sıcaklıklarda Depolanan Portakal Sularında Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyal Değişimler

Sonikasyon uygulaması sonrası, işlem görmüş portakal suyunda canlı kalmış olabilecek *E. coli* O157:H7 ya da *L. monocytogenes* hücrelerinin, farklı koşullarda tekrar aktivite kazanıp kazanmayacağı belirlenmiştir.

Gıda güvenliği için saklama koşulları oldukça önem taşır. Özellikle çabuk bozulabilen gıdalar için saklama ortamının sıcaklık derecesi önemli bir etkidir.

55 °C' de 30 kHz şiddetinde 10 dk' lık sonikasyon (US) ile 40 kV/cm şiddetinde 100 µs süre ile uygulanan vurgulu elektirik alan (US/PEF) ve 94 °C' de 26 sn uygulanan termosonikasyonun (HTST) portakal suyunun raf ömrü üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, her iki uygulama sonucunda da raf ömrü bakımından benzer eğilimler gözlenmiş ve 168 gün boyunca portakal suyu için kabul edilebilir sayılarda bakteri üremesi gözlemlenmiştir. Renk değişikliği kontrolünde, kombine kullanımın ilk başlarda daha iyi sonuç vermesine rağmen uzun süreli depolamalarda yüksek ısıli pastörizasyonun daha tutarlı olduğu görülmüştür. US/PEF kombine kullanımı uygulama öncesi ve sonrası arasında çok fazla değişiklik meydana getirmese de, 28. günden sonra bakteri sayısında azda olsa bir artış gözlenmiştir. Portakal suyunda 168 gün sonunda en fazla 2,6 logaritmik bakteri sayısı tespit edilmiştir. HTST uygulanması sonucunda ise portakal suyunda yine 14. günden itibaren bakteri sayısında azalma meydana gelmiş ve 28. günden 84. güne kadar önemli bir bakteri üremesi gözlenmemiştir. 84. günden sonra bakteri sayısında artış olsa da 2 logaritmik birimden daha az olmuştur (Walkling-Ribeiro, M., et al., 2009).

Çalışmanın bu kısmında portakal sularındaki bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal değişimlerde ortam koşullarının ve portakal suyunun işlem görüp görmemesinin etkileri incelenmiştir.

Aşağıdaki gibi hazırlanmış ortamlar farklı saklama koşullarında bekletilmiştir.

- I. İşlem görmemiş pastörize portakal suyu,
- II. Test bakterisi eklenmiş pastörize portakal suyu,

- III. Test bakterisi eklenmiş ve 45 °C' de 5 dakika sonikasyon uygulanmış portakal suyu,
- IV. Test bakterisi ve 800 µl/L Eugenol eklenerek 45 °C' de 5 dakika sonikasyon uygulanmış portakal suyu,
- V. Test bakterisi ve 800 µl/L Linalool eklenerek 45 °C' de 5 dakika sonikasyon uygulanmış portakal suyu.

Her örnek +4 ve 25 °C' lik ortamlarda 48 gün boyunca bekletilmiştir ve bekleme süresince meydana gelen değişimler Çizelge 4. 13. ve Çizelge 4. 14.' da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre;

- +4 °C' de bekletilen örneklerde fark edilir bir renk değişikliği gözlenmemiştir. 25 °C' de bekletilen örneklerde ise 16. günde çok az olmakla beraber 24. günden itibaren renk koyulaşması görülmüştür.
- Bakteri üremelerine bakıldığında ise, her iki bakteri için de sadece bakteri eklenmiş ve bakteri eklenerek 45 °C' de 5 dakika sonikasyon uygulanmış portakal sularının 25 °C' deki bekletilmelerinde ise 16 gün boyunca üreme gözlenmiştir. *E. coli* O157:H7 için bu üremenin 24. gün sonunda gözlenmediği, *L. monocytogenes* için devam ettiği belirlenmiştir.
- pH değişimleri 48 günlük süre boyunca belirlenmiştir. 3,6 olan portakal suyunun pH' ı, *E. coli* O157:H7 eklenmiş portakal suyunda değişim göstermemiş, *L. monocytogenes* eklenmesiyle 3,7 olmuştur. Aynı zamanda portakal suyunun pH' ı sonikasyon uygulanmış örneklerde 3,7-3,8, uçucu yağ eklenmiş örneklerde 3,9 olarak ölçülmüştür. Bu değerlerde depolama süresi boyunca önemli bir ölçüde değişim görülmemiştir.
- 4 ve 25 °C' de depolama sırasında; uçucu yağ varlığında sonikasyona maruz bırakılmış portakal sularında 48. güne kadar ne *E. coli* O157:H7 ne de *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir. Bu da portakal suyuna uygulanan işlemin

canlı kalmış olabilecek, ancak hasar görmüş bakteri hücrelerindeki tamir mekanizmalarını olumsuz yönde etkilediğini düşündürmektedir. Sadece sonikasyon uygulamasına maruz bırakılmış portakal sularında canlı kalan *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* hücreleri ise, 4 ve 25 °C’ de depolamanın 16. günü sonuna kadar canlı kalabilmiştir. 24. günden itibaren 4 °C’ de depolanan portakal sularında canlı bakteriye rastlanmamış, 25 °C’ de ise 48. günün sonuna kadar canlı bakteri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; sonikasyon eşliğinde uçucu yağların kullanımının bakteriyel inaktivasyonda sinerjistik etki yaratmakla birlikte, aynı işlem farklı sıcaklıkta depolama sırasında avantaj sağlamıştır. Depolama süresinde canlı kalan hasar görmüş bakteri hücreleri tekrar aktif hale geçememiştir.

Çizelge 4. 13. Farklı işlem görmüş portakal sularının farklı depo sıcaklıklarında saklanması süresince yapılan *E. coli* O157:H7 sayımları ve renk değişimleri.

ortam		1.gün		2.gün		4.gün		8.gün		16.gün		24.gün		32.gün		40.gün		48.gün	
		4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
PS	üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+E.c.	üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+E.c.+US	üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+E.c.+US +Eugenol	üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+E.c.+US +Linalool	üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+

PS : Pastörize portakal suyu

US : Ultrasound

E.c. : *E. coli* O157:H7

Çizelge 4. 14. Farklı işlem görmüş portakal sularının farklı depo sıcaklıklarında saklanması süresince yapılan *L. monocytogenes* sayımları ve renk değişimleri.

ortam		1.gün		2.gün		4.gün		8.gün		16.gün		24.gün		32.gün		40.gün		48.gün	
		4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
PS	üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+L.m.	üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+L.m.+US	üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+L.m.+US +Eugenol	üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PS+L.m.+US +Linalool	üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Renk değişimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+

PS : Pastörize portakal suyu

US : Ultrasound

L.m. : *L. monocytogenes*

Şekil 4. 25.–Şekil 4. 27.’ de farklı işlemlerden sonra farklı sıcaklıklarda depolanan pastörize edilmiş portakal sularının renk değişimleri gösterilmiştir.

Portakal suları şu sıra ile gösterilmiştir:

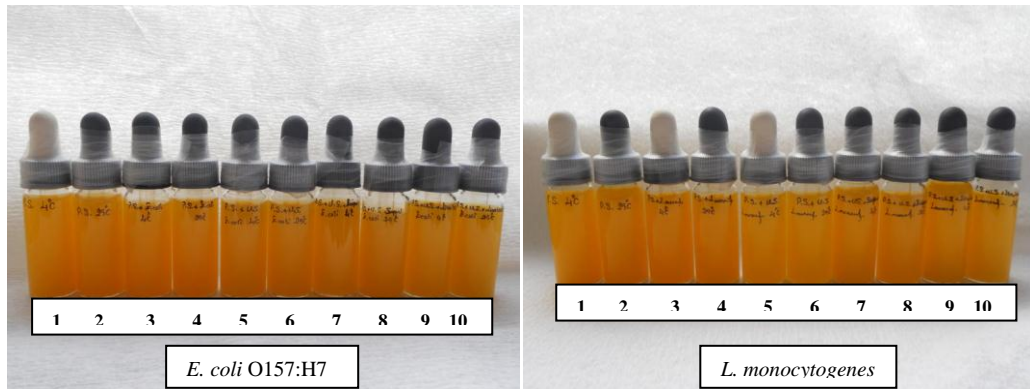
1/2 : İşlem görmemiş portakal suyu (4 °C’ de / 25 °C’ de)

3/4 : Test bakterisi eklenmiş portakal suyu (4 °C’ de / 25 °C’ de)

5/6 : 5 dk’ lık sonikasyon uygulanmış test bakterisi eklenmiş portakal suyu (4 °C’ de / 25 °C’ de)

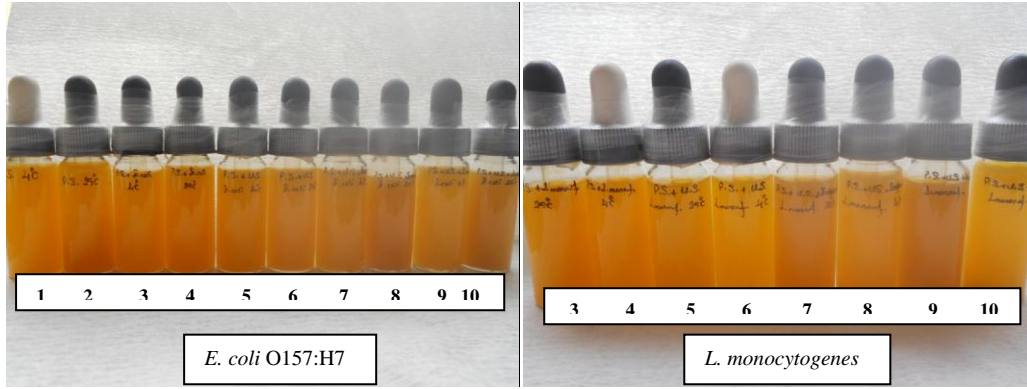
7/8 : 800µl/ml konsantrasyonunda Eugenol eklenerek 5 dk’ lık sonikasyon uygulanmış portakal suyu (4 °C’ de / 25 °C’ de)

9/10 : 800µl/ml konsantrasyonunda Linalool eklenerek 5 dk’ lık sonikasyon uygulanmış portakal suyu (4 °C’ de / 25 °C’ de)



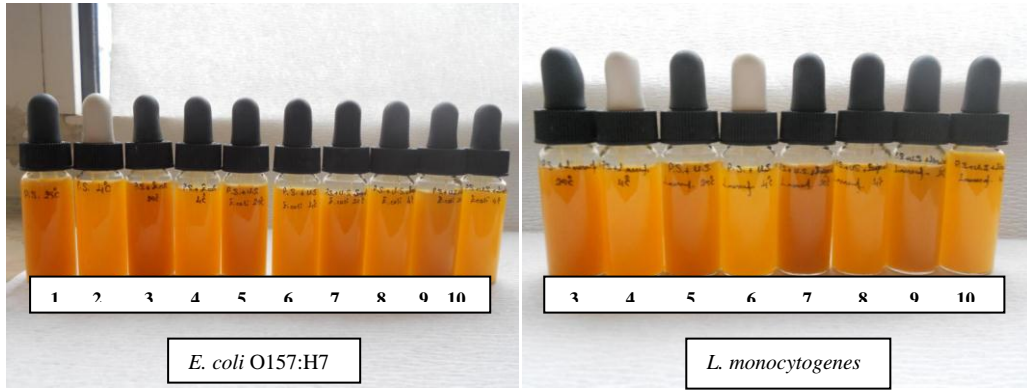
Şekil 4. 25. 4 ve 25 °C’ de depolanmaya başlanmadan önceki portakal suları.

Şekil 4. 25.’ de belirlenen işlemlerin uygulanmasından sonra 4 ve 25 °C’ de depolanmak üzere steril şişelere alınan portakal sularının renklerinin aynı ve normal portakal suyu görünümünde oldukları görülmektedir.



Şekil 4. 26. 4 ve 25 °C’ de depolanan portakal sularının 16. günde görünüşleri.

Şekil 4.26.’ da görüldüğü gibi farklı işlem görmüş ve görmemiş portakal sularının iki farklı sıcaklıkta 16 günlük depolama sonunda, 4 °C’ de depolanan örneklerde herhangi bir renk değişikliği görülmemiş ancak 25 °C’ de depolanan örneklerde ise çok hafif bir renk koyulaşmasının başladığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 27. 4 ve 25 °C’ de depolanan portakal sularının 48. günde görünüşleri.

Şekil 4. 27.’ de görüldüğü üzere portakal sularının 48 günlük depolama süreleri sonunda 4 °C’ deki örneklerde fark edilir bir renk değişimi gözlenmezken, 25 °C’ deki örneklerde ciddi bir renk kararması gözlenmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ

Gıda muhafazasında doğal bileşiklerin ve termal olmayan “çevreyle dost” yöntemlerin kullanılması son zamanlarda tüketicilerin, gıda üreticilerinin ve araştırmacıların oldukça ilgisini çeken bir konu haline gelmiştir. Bu biçimdeki işlemlerin, ürünün aroma kalitesinin ve tazeliğinin korunmasında önemli avantajlar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Gıda üretiminde ve muhafazasında kullanılan klasik tekniklerin yerini alabilecek alternatif metotların geliştirilmesi ve bunun endüstriye adapte edilmesi oldukça uzun süren bir yolculuktur. Alternatif olarak sunulan yöntemin güvenliği, ürün muhafazası açısından kazandıracığı avantajlar ve yöntemin maliyeti araştırılması gereken önemli konu başlıklarıdır.

Bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde çalışmamızdan elde edilen önemli bulgular şunlardır:

- Çalışmamızda, portakal suyunda bulunabilecek patojenleri (*E. coli* ve *L. monocytogenes* gibi) inhibe etmek amacıyla 20 kHz frekansta ultrases dalgaları ve doğal antimikrobiyal ajanlar (Eugenol, Linalool ve Cinnamaldehyde gibi uçucu yağlar), alternatif bir muhafaza yöntemi olarak güvenilirliği değerlendirilmiştir. İki engel tekniğinin birlikte kullanımının, sözü edilen patojenlerin portakal suyundaki inhibisyonu konusunda sinerjistik bir etki yarattığı sonucuna varılmıştır.
- Yukarıda anlatılan şekilde muamele görmüş portakal suları, farklı sıcaklıklarda (4 ve 25 °C’ de 48 gün) depolanmaları süresince tamamen steril kalmıştır. Aynı süreçte, portakal suyunun fiziksel özelliklerinde de gözle fark edilen bir değişim izlenmemiştir ve pH’ ları değişmeden kalmıştır. Yani, patojenler açısından yeterli ve güvenli bir inaktivasyon işleminin

gerçekleştirilmiş olduğu ve ürünün raf ömrünün uzatılabildiği ifade edilebilir.

- İki engel tekniğinin bir arada kullanılmasıyla, 45-50 °C gibi oldukça düşük sıcaklıkta (pastörizasyona göre) ve düşük uçucu yağ konsantrasyonu (800 µl/L Eugenol ve Linalool, v/v) kullanılarak yeterli bir bakteriyal inaktivasyon (4,25–4,69 değerlerinde logaritmik düşüşler) sağlanmıştır. Bu da yöntemin uygulama maliyetini düşürmede avantaj sağlamaktadır.
- Çalışmada kimyasal ajan olarak doğal kaynaklardan elde edilmiş uçucu yağların kullanılmış olması, tüketicilerin sentetik gıda koruyucularına olan hassasiyeti konusuna çözüm getirmekle birlikte bunların düşük dozlarda inhibitör etkili olması, üründe tercih edilmeyen koku ve lezzet oluşumuna neden olmamıştır.
- Uçucu yağların ultrasonik dalgalarla birlikte kullanıldığında portakal suyundaki adı geçen patojenlerin inaktivasyonu için gereken süreyi kısaltması yine işlemin ekonomik boyutu açısından önemli bir avantaj sağlamıştır.

Gelecekte yapılacak çalışmalarla, ultrasonik uygulamaların etkinliğini arttırmak için, ürüne özgü olarak, istenen aroma ve lezzeti sağlayan yada arttıran farklı uçucu yağların denenmesi faydalı olacaktır. Ayrıca uygun engel tekniklerinin kombinasyonlarının bir arada uygulandığı sürekli sistemler geliştirme ve bu sistemlerin optimizasyonu konusunda çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acheson, D.W.K., 2000, How Does *E. coli* O157:H7 Testing in Meat Compare with What We Are Seeing Clinically?, *Journal of Protection*, 63:6, 819-821.
- Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S., Ahmad, A., Kumar, T.R.S., Gupta, V.K. and Kumar S., 2002, Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*, *Flavour Frag Journal*, 17, 59–63.
- Akgül, A. ve Kivanç, M., 1988, Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi, *International Journal Food Microbiol*, 6, 263–8.
- Allinger, H., 1975, Ultrasonic disruption, *American Laboratory*, 10, 75–85.
- Altieri, C., Bevilacqua, A., Cardillo, D. and Sinigaglia, M., 2008b, Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against Gram negative pathogens, *International Journal of Food Science and Technology*, doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01744.x.
- Alvarez, I., Manas, P. and Condon S., 2006, Inactivation of *Salmonella seftenberg* 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities, *International Journal Food Microbiology*, 108, 218-225.
- Alzoreky, N.S., and Nakahara, K., 2002, Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, *International Journal Food Microbiology*, 80: 223-230.
- Anonim, 2007, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü veri tabanı, Erisim: www.food.gov.tr

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Anonim 2009a, Gıda Mikrobiyolojisi, <http://www.mikrobiyoloji.org>

Anonim, 2009b, Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Food borne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods, Jan 2001, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisksu.html>

Anonymus, 2000, Food and Drug Administration Report, Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: Ultrasound, Available at <http://vm.cfsan.fda.gov/~com/ifts-us.html>.

Anonymous, 2000-2001, Devlet İstatistik Enstitüsü, Ankara.

Arslan, N. ve Gürbüz, B., 1994, Değişik bölgelerden toplanan Kışniş (*Coriandrum sativum* L.) populasyonlarında verim ve diğer karakterler üzerine bir araştırma, Tarla Bitkileri Kongresi, Angronomi Bildirileri, İzmir, Cilt 1, 132-136.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S. Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., et. al., 2008, Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 155-160.

Ayala-Zavala, J.F., del-Toro-Sanchez, L., Alvarez-Parrilla, E. and Gonzalez-Aguilar, G.A., 2008a, High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems?, Journal Food Science, 73:R41–R7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ayala-Zavala, J.F, Soto-Valdez, H., Gonzalaz-Leon, A., Alvarez-Parrilla, E., Martin-Belloso, O. and Gonzalez-Aguilar, G.A., 2008c, Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomumzeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin, *Journal Includ Phenom Macro*, 60:359–68.
- Bagambolula, J.F., Uyttendaele, J. and Debevere, J., 2004, Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*, *Journal Food Microbiology*, 21, 34.
- Balla, C. and Farkas, J., 2006, Minimally processed fruits and fruit products and their microbiological safety, In: Hui, Y.H., Barta, J., Cano, M.P., Gusek, T. and Sidhu JS. (Eds.).
- Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R., Ouattara, C.A.T., Kabore, Z.I. and Traore, S.A., 2003, Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso, *Phytochemistry*, 62, 209–212.
- Bates, R.P., Morris, J.R., Crandall, P.G., 2001, Principles and practices of small and medium scale fruit juice processing, *Agricultural Services Bulletin*, Rome, 146.
- Bauer, K. and Garbe, D., 1985, Common Fragrance and Flavor Materials, Preparation, Properties and Uses, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 213.
- Beaufort, A., Cardinal, M., Le-Bail, A. and Midelet-Bourdin G., 2009, The effects of superchilled storage at -2 degrees C on the microbiological and organoleptic properties of cold-smoked salmon before retail display, *International Journal of Refrigeration*, 32, 1850-1857.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Behrend, O. and Schubert H., 2001, Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification, in: *Ultrasonics Sonochemistry*, 271-276.
- Bendicho, S., Barbosa-Canovas, GV. and Martin O., 2002, Milk processing by high intensity pulsed electric fields, *Trends in Food Science and Technology*, 13, 195-204.
- Bernard, M., Padgitt, M. and Uri, N.D., 1997, Pesticide use and its measurement, *International Pest Control* 39, 161e164.
- Beuchat, L.R., 2002, Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables, *Microbiology Infections*, 4: 413-23.
- Blaszyk, M., Holey, RA., 1998, Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth on common meat spoilage and pathogenic organism, *International Journal Food Microbiology*, 39, 175 -183.
- Blume, T., Neis, U. 2004, Improved wastewater disinfection by ultrasonic pretreatment, *Ultrason Sonochemistry*, *Food Technology*, 34, 42-64.
- 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, *Lournal Microbiology Methods*, 60, 207-216.
- Brackett, R.E. 1994, Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables, In: Wiley R.C. Ed., *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*, New York, P. 269-312.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Branen, A.L., Davidson, B. and Katz, P.M., 1980, Antibacterial properties of phenolic antioxidants and lipids, *Food Technology*, 34, 42-63.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P. and Glaser P., 2003, Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: Clues for evolution and pathogenicity, *FEMS Immunology Medicine Microbiology*, 35, 207–213.
- Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Burt, S.A. and Reinders, R.D., 2003, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, *Letters in Applied Microbiology*, 36 (3), 162– 167.
- Busta, F.F., Suslow, T.V., Parish, M.E., Beuchat, L.R., Farber, J.N., Garrett, E.H. and Harris, L.J., 2003, The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Compreh Review Food Science Food Safety*, 2, 179–85
- Butz, P. and Tauscher, B., 2002, Emerging Technologies: Chemical aspects, *Food Research International*, 35, 279-284.
- Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G., 1999a, Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin, *International Journal Food Microbiology*, 51, 19-30.
- Calik, H., Morrissey, M.T., Reno, P.W. and An, H., 2002, Effect of high pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters, *Journal of Food Science*, 67, 1507-1510.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cemeroğlu, B. ve Acar, J. 1986, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Literatür Yayıncılık. Ankara, 511 s.
- Canselier, J.P., Delmas, H., Wilhelm, A.M. and Abismail, B., 2002, Ultrasound emulsification – An overview, Journal of Dispersion Science and Technologies, 23, 333-349.
- Castillo, L.A., Meszaros, L. and Kiss, I.F., 2004, Effect of high hydrostatic pressure and nisin on microorganisms in minced meats, Acta Alimentaria, 33, 183–190.
- Chang, S.T., Chen, P.F. and Chang, S.C., 2001, Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*, Journal Ethnopharmacol 77, 123–7.
- Charai, M., Mosaddak, M. and Faid, M., 1996, Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. Journal Essential Oil Residence, 8, 657–64.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.J., and Haroutounian, S.A., 2004, Essential oils of Satureja, Origanum, and Thymus species: Chemical composition and antibacterial activities against food borne pathogens, Journal of Agriculture Food Chemistry, 52, 8261–8267.
- Christi, Y., 2003, Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity, Trends Biotechnology, 21, 89-93.
- Conte, A., Sinigaglia, M. and Del Nobile, M.A., 2007a, Use of lemon extract to inhibit the growth of malolactic bacteria, Journal of Food Protection, 70, 114-118.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Conte, A., Speranza, B., Sinigaglia, M. and Del Nobile, M.A. 2007b, Effect of lemon extract on foodborn microorganisms, *Journal of Food Protection*, 70, 1896-1900.
- Cotter, P.D., Gaban, C.G.M. and Hill, C., 2000, Analysis of the role of *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 137-146.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F., 1999, In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130– 135.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G., 2000, The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.
- Cserhalmi, Z.S., Vidacs, I., Beczner, J. and Czukor, B., 2002, Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3: 41-45.
- Dadjour, M.F., Origo, C., Matsumura, S. and Shimizu, N., 2006, Disinfection of *Legionella pneumophila* by ultrasonic treatment with TiO₂, *Water Res*, 40, 1137-1142.
- D'Amico, D.J., Silk, T.M., Wu, J. and Guo, M., 2006, Inactivation of microorganism in milk and apple cider treated with ultrasound, *Journal of Food Protection*, 69, 556-563.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Data, A.Z. and Davidson, P.M., 2001, Microwave and radio frequency processing, *Journal of Food Science*, 32-41.
- Davidson, P.M., and Parish, M.E., 1989, Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, *Food Technology*, 43, 148-155.
- Davidson, P.M., and Naidu, A.S., 2000, Phyto-Phenols. In: *Natural Food Antimicrobial System*, Naidu, A.S. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL., 8493-2047, 265-294.
- Davidson, P.M., 2001, Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville T.J., Eds., *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, Washington D.C., 593-627.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G., 2002, Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils, *International Journal Food Microbiology*, 74, 101-109.
- Demirdöven, A., and Baysal, T., 2009, The use of ultrasound and combined Technologies in food preservation, *Food Reviews International*, 25, 1-11.
- Demo, M.S, de las Mercedes Oliva, M., 2009, Antimicrobial activity of medicinal plants from South America. In: *Botanical medicine in clinical practice*. Oxfordshire, U.K., 152-63.
- Didry, N., Dubreuil, L. and Pinkas, M., 1993, Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or combination, 48, 301-304.
- Doble, M. and Hemaiswarya, S., 2009, Synerjistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, Department of Biotechnology Madras, India, 997.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308– 316.
- Duckhouse, H., Mason, T.J, Phull, S.S. and Lorimer, J.P., 2004, The effect of sonication on microbial disinfection using hypochlorite, *Ultrason Sonochem*, 11, 173-176.
- Elgayyar, M., Draughon, F.A, Golden, D.A. and Mount, J.R., 2001, Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, *Journal Food Protection*, 64, 1019–24.
- Eliot-Godereaux, S., Zuber, F., Goullieux, A., 2001, Processing and stabilisation of cauliflower by ohmic heating technology, *Innovation Food Science Emergency Technology*, 2, 278–279.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewed, F.M. and El-Baroty, G.S.A., 1989, Antimicrobial activity of some Egyptian spice oils, *Journal Food Protection*, 52, 665–667.
- Farber, J.M., 1991, *Listeria monocytogenes* *Journal of AOAC International*, 74(4), 701-704.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I., 1991, *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *Microbiology Review*, 55: 476-511.
- Fernanda San Martin, M., Harte, F.M., Lelieveld, H., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G., 2001, Inactivation effect of an 18-T pulsed magnetic field combined with other technologies on *E. coli*, *Innovation Food Science Emergency Technology*, 2, 273–277.
- Firouzi, R., Azadbakht, M. and Nabinedjad, A., 1998, Anti-listerial activity of essential oils of some plants, *Journal Applied Animal Research*, 14, 75–80.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fisher, K. and Phillips, C., 2008, Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?, *Trends Food Science Technology*, 19, 156–64.
- Fisher, K., and Philips, C., 2008, Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?, *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164.
- Fisher, K., Rowe, C. and Philips, C.A., 2007, The survival of tree strain of *Aerobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food, *Letters Applied Microbiology*, 44, 495-499.
- Friedman, M., Henika, P.R. and Mandrel, R.E., 2002, Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Camphylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*, *Journal Food Protection*, 65, 1545-1560.
- Furuta, M., Yamaguchi, M., Tsukamoto, T., Yim, B., Stavarache, C.E., Hasiba, K. and Maeda, Y., 2004; Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation, *Ultrason Sonochem*, 11, 57-60.
- Gill, A.O. and Holley, R.A., 2000, Surface application of lysozyme, nisin and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and Bologna, *Journal of Food Protection*, 63, 1338–1346
- Gill, A.O., Delaquis, P.J., Russo, P. and Holley, R.A., 2002, Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham, *International Journal Food Microbiology*, 73, 83–92.
- Gola, S., Mutti, P., Manganelli, E., et al., 2000, Behaviour of pathogenic *E. coli* in a model system and in a raw minced meat treated by HP: microbiological and technological aspects, *Industria Conserve*, 75, 13-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gould, G.W. 1995, Homeostatic mechanism during food preservation by combined methods, In: G. Barbosa-Canovas and J. Welti-Chanes (Eds.), Food preservation by moisture control, Lancaster, Techromic Publishing, 397-401.
- Gould, G.W., 2001, New processing technologies: an overview, Proceedings of the Nutrition Society, 60, 619-628.
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V., 1991, Shiga-like Toxin- Producing *E.coli* Infections, The Epidemiology of Infections Caused by *E.coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E.coli* and Associated Hemolytic Uremic Syndrome. Epidemiologic Reviews, 13, 61-91.
- Guraya, R., Frank, J.F. and Hassan, A.N., 1998, Effectiveness of Salt, pH, and Diacetyl as Inhibitors for *E.coli* O157:H7 in Dairy Foods Stored at Refrigeration Temperatures, Journal Food Protection, 1998, 61:9, 1098-1102.
- Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C. and Bourke, P., 2008, The antimicrobial efficacy of plant essential oil combination and interactions with food ingredients, International Journal Food Microbiology, 124, 91-97.
- Guynot, M.E, Ramos, A.J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V. and Marin, S., 2003, Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products, Journal Applied Microbiology, 94, 893-9.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal Applied Microbiology, 86, 985-90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hansen, E., Juncher, D., Henckel, P., Karlsson, A., Bertelsen, G., Skipsted, L.H., 2004, Oxidative stability of chilled pork chops following long term freeze storage, *Meat Science*, 68, 479-484.
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M.P., 1998a, Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry, *Food Microbiology*, 15, 367–378.
- Ilseley, S., Miller, H., Greathead, H. and Kamel, C., 2002. Herbal sow diets boost pre-weaning growth, *Pig Progress*, 18 (4), 8 –10.
- Isman, M.B., 2000, Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Protection*, 19, 603e608.
- Jay, J.M., 1992, *Modern Food Microbiology*, Chapman and Hall, N.Y., 701.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D.S. and Holley, R.A., 1999, Pulsed electric fields processing of foods: A review, *Journal Food Protection*, 62, 1088-1096.
- Juntilla, J.R., Niemela, S.I. and Hirn, J., 1988, Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*, *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 321-327.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H., 1994, Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents, *Journal Applied Bacteriology*, 76, 626-631.
- Kader, A.A., 2008, Flavor quality of fruits and vegetables, *Journal Science Food Agriculture*, 88, 1863–8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kıvanç, M., 1991, Gıda koruyucusu olarak sorbik asit ve tuzları: III. Genel özellikleri, 16 (1), 39-45.
- Kim, J., Marshall, M.R. and Wei, C.I., 1995a, Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2839–2845.
- Kim, H.O., Park, S.W. and Park, H.D., 2004, Inactivation of *Escherichia coli* O157H:7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot, *Food Microbiology*, 21, 105-110.
- Kubo, I, Fujita, K., Kubo, A., Nihei, K. and Ogura, T., 2004, Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*, *Journal Agricultural Food Chemical*, 52, 3329-3332.
- Kuttruff, H., 1988, *Physik und Technik des Ultraschalls*, Stuttgart: S. Hirzel Verlag.
- Lado, B.H. and Yousef, A.E., 2002, Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanism, *Microbes and Infection*, 4, 433-440.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Cootel, P.J. and Nychas, J.E., 2001, A study of minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-460.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni M.E. and Gardini, F., 2004, Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits, *Trends Food Science Technology*, 15, 201–8.
- Lawrie, R.A. and Ledward, D.A., 2006, *Lawrie's Meat Science Seventh English (Ed.)*, Cambridge England, Woodhead Publishing Limited.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Lean, L.P., Suhaila, M., 1999, Antioxidative and Antimycotic effect of turmeric, lemon-grass, Betel leaves, Clove, Black Papper Leaves and *Garcinia Atriviridis* on butter cakes.
- Lee ,S.J., Umamo, K., Shibamoto, T. and Lee, K.G., 2005, Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 91, 131–7.
- Leighton, T.G., 1998, The principle of cavitation, In: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds), *Ultrasound in food processing*, Blackie Academic and Professional, London, 151-178.
- Leighton, TG., 2007, What is ultrasound?, *Prog Biophys Molecüler Biology*, 93, 3–83.
- Leistner, L., 1978, Hurdle effect and energy saving, In: Downey, W.K., (Ed.), *Food Quality and Nutrition*, Applied Science Published, London, 553.
- Lis-Balchin, M. and Deans, S.G., 1997, Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal Applied Microbiology*, 82, 759-762.
- Lopez–Malo, A., Paulo, E., Jimenez–Fernandez, M., Alzamora, S.M. and Guerrero, S., 2005, Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials, *Journal Food English*, 67, 87-93.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 1997, Brock Biology of Microorganisms P.P. Eight Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Mainville, I., Montpetit, D., Durand, N. and Farnworth, E.R., 2001, Deactivating the bacteria and yeast in kefir using heat treatment, irradiation and high pressure, International Dairy Journal, 11, 45–49.
- Manabe, A., Nakayama, S. and Sakamoto, K., 1987, Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes, Japanese Journal of Pharmacology, 44, 77–84.
- Mangena, T. and Muyima, N.Y.O., 1999, Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. Letters in Applied Microbiology, 28, 291–296.
- Manvell, C., 1997, Minimal processing of food, Food Science and Technology Today, 11, 107-111.
- Marino, M., Bersani, C. and Comi, G., 2001, Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae, International Journal of Food Microbiology, 67, 187– 195.
- McClements, D.J., 1995, Advances in the application of ultrasound in the food analysis and processing, Trend Food Science 6, 293-299, for ensuring safety of food products, International Journal Food Microbiology, 24, 33-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McCarthy, J., Holbrook, R. and Stephens, P.J., 1998, An Improved Direct Method for the Enumeration of Stressed *E.coli* O157:H7 from Food Journal Food Protection, 61:9, 1093-97.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. and Jewell, K., 2004, *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods, International Journal of Food Microbiology, 92, 15-33.
- Mehnert, W. and Mader, K., 2001, Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications, Adv. Drug Del. Rev., 47, 165-196.
- Mizrach, A., Galili, N. and Rosenhouse, G., 1994, Determining quality of fresh products by ultrasonic excitation, Food Technology, 48, 68-71.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J, Philip, N. and Saoudi, B., 2001, Plasma sterilisation, Methods and mechanisms, Pure and Applied Chemistry, 74(3), 349-358.
- Moleyar, V. and Narasimham, P., 1992, Antibacterial activity of essential oil components. International Journal of Food Microbiology, 16, 337– 342.
- Mourey, A., Canillac, N., 2002, Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. Food Control, 13, 289– 292.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M. and Martin-Belloso, O., 2008, Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices, Food Microbiology, 25, 479–491.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M. and Mart'ın-Belloso, O., 2008b, Inactivation of *Salmonella enterica ser. enteritidis* in tomato juice by combining of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials, *Journal Food Science*, 73, M47–53.
- Moyler, D., 1998, CO₂ extraction and other new technologies: an update on commercial adoption, *International Federation of Essential Oils and Aroma Trades 21st International Conference on Essential Oils and Aroma's*, London, 33– 39.
- Murakami, M., Tedzuka, H. and Yamazaki, K., 1998, Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH, *Food Microbiology*, 15, 577-582.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H., 1995, *Manual of Clinical Microbiology*, In: Gray, L.D. (Ed.), *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia*, Washington, D.C., 450-452.
- Müller, H.E., 1988, *Journal of Listeriosis in Animals Infection*, 2(4), 505-519.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1991, *Listeria monocytogenes: Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods*. *International Journal Food Microbiology*, 14, 185–246.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jagan Rao Mohan, L. and Sakariah, K.K., 1999, Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,47, 4297– 4300.
- Nguyen-The, C. and Carlin, F., 1994, The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables, *Crit Rev Food Science Nutritions*, 34, 371-401.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Norrung, B., 2000, Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches, International Journal of Food Microbiology, 62, 217–221.
- Nowlan, S.S., Dyer, W.J. and Keith, R.A., 1974, Superchilling a new application for preserving freshness of fish fillets during marketing, Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 7, A16-A19.
- Nychas, G.J.E., 1995, Natural antimicrobials from plants, In: Gould, G.W., (Ed.), New methods of food preservation, London, Blackie, Academic Professional, 58.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N. and Tassou, C.C., 2003, Antimicrobials from herbs and spices, In: Roller S., (Ed.), Natural antimicrobials for the minimal processing of foods, Washington D.C., 177-99.
- Ockerman, B.W. and Basu, L., 2004, Carcass chilling and bonning, International Journal of Food Preservation (Ed.), Encyclopedia of Meat Sciences, Oxford Elsevier, 144-149.
- Opalchenova, G. and Obreshkova, D., 2003, Comparative studies on the activity of basil essential oil from *Ocimum basilicum* L. against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods, Journal of Microbiology Methods, 54, 105–110.
- Öner, M., 1992, Mikroorganizmaların Büyüme Özellikleri, Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova İzmir, Yayın No: 6.
- Özhan, N., 2000, Salgı suyunda *E. coli*'nin yaşama süresinin bulunması, Yüksek Lisans Tezi, M.E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Quattara, B., Sabato, S.F. and Lacroix, M., 2001, Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.), *International Journal of Food Microbiology*, 68, 1– 9.
- Qin, B., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. and Pedrow, P.D., 1994, Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms, *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 1(6), 1047-1057.
- 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.
- Patil, S., Bourke P., Kelly, B., Frias, J.M., Cullen, P.J., 2009, The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound, *School of Food Science and Environmental Health, Ireland*, 486-490.
- Patterson, M.F. and Kilpatrick, D.J., 1998, The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry, *Journal Food Protection*, 61, 432-436.
- Peacock, E, Jacob, V.W. and Fallone, S.M., 2001, *E.coli* O157:H7 Etiology, Clinical Features, Complications and Treatment, *Nephrology Nursing Journal*, 28:5, 547-554.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pereira, R.N. and Vicente, A.A., 2009, Environmental impact of novel thermal and non-thermal Technologies in food processing.
- Peterson, R.V. and Pitt, W.G., 2000, The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-squestered *Escherichia coli*. Colloid and Surfaces B. Biointerfaces, 17, 219-227.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. and Casanova, J., 2002, Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica, Flavour and Fragrance Journal, 17, 15– 19.
- Piyasena, P., Mohareb, E. and McKeller, R.C., 2003, Inactivation of microbes using ultrasound: a review, Internat Journal Food Microbiol, 87; 207-216.
- Previdi M. P., Quintavalla, S., Lusardi, C. and Vicini, E. 1997, Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices, *Industria Conserve*, 72, 353-358.
- Raichel, D.R., 2000, The Science and Applications of Acoustics, Springer: New York.
- Raso, J., Palo, A., Pagan, R. and Condon, S., 1998a, In activation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment, Journal of Applied Microbiology, 85, 849-854.
- Raso, J., and Barbosa-Canovas, G.V., 2003, Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(3), 265-285.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J. and Martin-Belloso, O., 2006, Inactivation of *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* and *L. monocytogenes* by combining of high-intensity pulsed electric fields and malic acid in apple juice, In: Workshop on Applications of Novel Technologies in Food and Biotechnology, Cork, Ireland, 11-13.
- Raybaudi-Massilia, R.M., Rojas-Grau, M.A., Mosqueda-Melgar, J. and Martin-Belloso, O., 2008c, Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples, *Journal Food Protection*, 71, 1150–61.
- Roche, S.M., Kerouanton, A., Minet, J., Le Monnier, A., Brisabois, A. and Velge, P., 2009, Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments, *International Journal of Food Microbiology*, 130, 151–155.
- Roller, S. and Seedhar, P., 2002, Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 jC and 8 jC. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 390–394.
- Ross, Z.M., O’Gara, E.A., Hill, D.J., Sleightholme, H.V. and Maslin, D.J., 2001, Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder, *Applied Environmental Microbiology*, 67, 475–80.
- Russell, N.J., 2002, Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing: An overview, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 27–34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sagong, H.G., Lee, S.Y., Chang, P.S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y.J., Kang, D.H., 2011, Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce, Department of Food and Animal Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Republic of Korea, 151-921.
- Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P. and Raso, J., 1995, Effect of heat and ultrasound on microorganism and enzymes, In: *New Methods of Food Preservation* (Ed. by G.W. Gould), London Blackie Academic and Professional, 176-204.
- Shearer A. E. H., Dunne, P. Sikes, A. and Hoover, D.G. 2000, Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives and mild heat, *Journal of Food Protection*, 63 (11), 1503-1510.
- Shephard, G.S., 2008, Risk assesment of aflotoxins in food in Africa, *Food Addittion Contamination*, Berlin, 25, 1246-1256.
- Skandamis, P., Tsigarida, E. and Nychas, G.J.E., 2002, The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 1C under aerobic, VP/MAP conditions, *Food Microbiology*, 19, 97–103.
- Skauen, D., 1976, A comparison of heat production and catitation intensity in several ultrasonic cell disrupters *Ultrasonics*, 14, 173-176.
- Smid, E.J. and Gorris, L.G.M., 1999, Natural antimicrobials for food preservation, In: Rahman, M.S. (Ed.), *Handbook of Food Preservation*, Marcel Dekker, New York, 285–308.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 1998, Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important foodborne pathogens, *Letters Applied Microbiology*, 26, 118–122.
- Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Pati, S. and Del Nobile, M.A., 2008, Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese, *International Dairy Journal*, 18, 624–630.
- Sofos, J., Beuchat, L.R., Davidson, P.M. and Johnson, E.A., 1998, Naturally occurring antimicrobials in food, Task force report, Council Agricultural Science Technology , 103 p.
- Sonboli, A., Eftekhari, F., Yousefzadi, M. and Kanami, M.R., 2005, Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss, Iran, 60, 30-34.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N. and Bertucco, A., 2002, Microbial inactivation by high-pressure, *Journal Supercritical Fluids*, 22, 55–63.
- Splittstoesser, D. F., Lee, C.Y. and Churey, J.J., 1998, Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 18(9), 585-587.
- Stewart, C.M., Jewett Jr., F.F. and Dunne, C.P., Hoover, D.G. 1997, Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*, *Journal Food Safety* ,17, 23-36.
- Suslick, K. S., 1988, Ultrasound, its chemical, physical and biological effects, Chapter 4, *Homogeneous Sonochemistry*, VCH Publishers, 125p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Suslick, K. S., 1990, Interparticle collisions driven by ultrasound, *Sonochemistry Science* (247) 1439–1445.
- Swaminathan, B., 2001, *Listeria monocytogenes*, In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.).
- 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.
- Şahin, A., 2009, Türk Gıda ve İçecek Sektörü 2008 Envanteri Türk Gıda ve İçecek Sanayi Dernekleri Fedarasyonu, Ankara.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H. and Nychas, G.J.E., 1995, Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4 °C and 10 °C, *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593-600.
- Tsukamoto, I., Yim, B., Stavarache, C.E., Furuta, M., Hahiba, K. and Maeda, Y., 2004, Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation, *Ultrason Sonochem*, 11, 65-72.
- Tuley de Silva, K. (Ed.), 1996, A Manual on the Essential Oil Industry, United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., 2003, Gıda Mikrobiyolojisi, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Valero, M. and Salmeron, M.C., 2003, Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth, *International Journal Food Microbiology*, 15;85(1-2), 73-81.
- Valero, M., Rescosio, N., Raua, D., Munoz, N., Marti, N. and Lizama, V., 2007, Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing, *Journal Food England*, 80, 509-516.
- Van de Braak, S.A.A.J. and Leijten, G.C.J.J., 1999, *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*, CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 116 p.
- Van Krimpen, M.M. and Binnendijk, G.P., 2001, Ropadiar as alter 252 S. Burt / *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 223–253 native for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs, Lelystad, *Praktijkonderzoek Veehouderij*, ISSN: 0169-3689, 14 p.
- Van Welie, R.T.H., 1997, *Alle cosmetica ingredienten en hun functies*, Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein, 126 p.
- Vazquez-Boland, A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominiguez-Bernal, G., Goobel, W., Gonzalez-Zom, B., Wehland, J. and Kreft, J., 2001, *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clinical Microbiology Review*, 14, 584–640.
- Villamiel, M. and de Jong, P., 2000, Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in trypticase soy broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating, *Journal of Food*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J.A., 2007, Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region, 54, 921–6.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez JA., 2008, Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet, *International Journal Food Science Technology*, 43, 526-31.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., D.J., Morgan, 2009, Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields, *Food Science and Veterinary Medicine, Ireland*, 102-107.
- Ward, S.M., Delaquis, P.J., Holley, R.A. and Mazza, G., 1998, Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roasted beef by volatile horseradish distillates, *Food Research International*, 31, 19–26.
- Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell A.D., Catrenich, C.E., et al., 2003, Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria, *Journal Applied Microbiology*, 94, 240-247.
- Weissinger, W.R., McWatters, K.H. and Beuchat, L.R., 2001, Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to Salmonella on alfalfa seeds and sprouts. *Journal of Food Protection* 64 (4), 442–450.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- WHO, 2002, Food safety and foodborne illness, World Health Organization Fact sheet, Geneva, 237.
- WHO, 2002, World health report: Reducing risks, promoting healthy life, World Health Organization, Geneva, ISBN 92 4 156207 2 ISSN 1020-3311, 248 p.
- Wiley, C.W., 1994. Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables, New York, Chapman and Hall, 368 p.
- Wilkins, K.M., 1989, Natural Antimicrobial Systems, In Mechanism of Action of Food Preservation Procedures, Gould, G.W. (Ed.), New York, 1989, 285-362.
- Williams, A., 1994, New Technologies in food processing: Part II, Nutrition and Food Science, 1, 20-23.
- Willamiel, M., Hamersveld, E.H. and Van Jong, P.D., 1999, Effect of ultrasound processing on the quality of dairy products, *Milchwissenschaft*, 54, 69-73.
- Wu, Y., Mittal, G.S. and Griffiths, M.W., 2005, Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials, *Biosystems Engineering*, 90, 1-7.
- Wuytack, E.Y., Diels, A.M.J. and Michiels, C.W., 2002, Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure, *International Journal Food Microbiology*, 77, 205-212.
- Yamazaki K., Tedzuka, H. and Shinano, H., 1996, Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 60 (3), 543-545.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yap, A., Jiranek, V., Grbin, P., Barnes, M. and Bates, D., 2007b, Studies on the application of high power ultrasonic for barrel and plank cleaning and disinfection, 22,(3), 44-48.
- Yuk, H.G., Geveke, D.J. and Zhang, H.Q., 2009, Non-thermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in buffered peptone water using a pilot-plant scale supercritical carbon dioxide system with a gas-liquid porous metal contactor, Food Control, 20, 847-851.
- Yuste, J. and Fung, D.Y., 2004, Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon, Journal of Food Protection, 67, 371–377.
- Zaika, L.L., 1988, Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination, Journal of Food Safety, 9, 97-118.
- Zeller A, Rychlik M. 2007, Impact of estragole and other odorants on the flavour of anise and tarragon Flavour Frag Journal, 22, 105–13.
- Zenker, M., Heinz, V. and Knorr, D., 2003, Application of ultrasound assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods, Journal Food Protection, 66, 1642-1649.
- Zhou, F., Ji, B.P., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z.W., Li, J.J., Li, J.H. and Yan, W.J., 2007, The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*, Journal Food Safety, 27, 124–33.