

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDALARDAKİ MİKROORGANİZMALARIN
BASINÇLI KARBONDİOKSİT İLE
İNAKTİVASYONU**

Kemal YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Mahmut ŞEKER

GEBZE
2006

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDALARDAKİ MİKROORGANİZMALARIN
BASINÇLI KARBONDİOKSİT İLE
İNAKTİVASYONU

Kemal YILDIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2006

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Gıdalardaki Mikroorganizmaların Basınçlı Karbondioksit
İle İnaktivasyonu

YAZAR ADI : Kemal YILDIZ

Bu çalışmada ayrıca bozucu etkiye sahip olan mikroorganizmaların basınçlı karbondioksit ile inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. İnaktivasyon çalışmalarında basınç, sıcaklık ve uygulama zamanının etkileri incelenmiştir.

Asidik ve alkali ortamlar ile düşük pH'ya dayanıklı ve alkali mikroorganizmalara karşı basınçlı karbondioksitin etkisi araştırılmıştır. Kontrol numuneleri ve basınçlı karbondioksit maruz bırakılmış numunelerin mikroorganizma sayıları ve pH değerleri ölçülmüştür. Ayran numunelerinde pH değişimi görülmemiş, ilk gün mikrobiyal yük $2,15 \times 10^5$ cfu/ml iken, 12 gün sonra $0,51 \times 10^5$ cfu/ml seviyesine kadar inmiştir. Bununla birlikte kontrol numunelerindeki mikrobiyal yük 12 gün sonra $7,8 \times 10^5$ cfu/ml olmuştur. Peptonlu su numunelerinde ise pH değişimi açıkça görülmüş, mikrobiyal yük $2,16 \times 10^6$ cfu/ml iken, uygulamadan hemen sonra $0,72 \times 10^6$ cfu/ml seviyesine kadar inmiştir.

Yapılan ölçümlerin analizi sonucunda basınçlı karbondioksit uygulamasının alkali sıvı gıdaların ısısal olmayan pastörizasyonunda kullanılabileceği, uzun süreli rafta kalacak asidik sıvı gıdalarda ise zaman geçtikçe mikroorganizmaları inaktive ederek koruyucu bir etki sağlayabileceği tespit edilmiştir.

SUMMARY

TEZ BAŞLIĞI :Inactivation of microorganisms in foods by using high pressure carbon dioxide.

YAZAR ADI :Kemal YILDIZ

In this study, effect of high pressure CO₂ conditions on inactivation of microorganisms spoiling yoghurt has been investigated in. The effects of pressure, temperature and application time as high pressure CO₂ conditions on inactivation of microorganisms spoiling yoghurt has been examined.

By using both acidic and alkali mediums, the effect of CO₂ has been investigated on microorganisms that are alkali and have low pH resistant. The values of pH and number of microorganisms of control samples and high pressure CO₂ applied samples have been determined. In yoghurt samples, pH change has not been detected. When microbial existence was 2.15×10^5 cfu/ml in first day, after 12 days it has been decreased to 0.51×10^5 cfu/ml. Nonetheless, after 12 days microbial existence in test samples has been 7.8×10^5 cfu/ml. On the other hand, in the samples of water with peptone pH change has been clearly detected. While microbial existence was 2.16×10^6 cfu/ml, it has been decreased to 0.72×10^6 cfu/ml level soon after the application.

Literature results show that application of high pressure CO₂ can be used on pasteurization of non-thermal alkali liquid foods. On the other hand this study showed that it can also have a protection effect for acidic liquid foods by inactivating microorganisms during storage.

TEŞEKKÜR

Çalışmada danışmanlığımı üstlenen, çalışma süresince bilgileri ve görüşleriyle yardımcı olan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mahmut ŞEKER'e teşekkür ederim. Ayrıca tüm yüksek lisans eğitim hayatım boyunca bana göstermiş olduğu destek ve anlayıştan dolayı Sayın Doç. Dr. Murat ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarının gerçekleşmesinde emeği olan Gıda Laboratuvarı asistanlarından Arş. Görevlisi Fatih AKYOL'a yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni destekleyen ve karşılaştığım güçlüklerde bana yol gösteren eşime ve arkadaşlarıma da teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Hipotez	2
1.2. Amaç	4
2. KARBONDİOKSİT İLE İNAKTİVASYON TEKNOLOJİLERİ	5
2.1. Karbondioksitin Genel Özellikleri	6
2.2. Gıda Sanayinde Karbondioksitin Kullanılmasının Faydaları	8
2.3. Karbondioksitin Etki Mekanizmaları	8
2.3.1. Hücre İçi pH'nın Hızlıca Düşürülmesi	9
2.3.1.1. Ortam Kompozisyonunun pH Değerine Etkisi	10
2.3.1.2. Karbondioksitin Diğer pH Düşürücülerle Kıyaslanması	10
2.3.2. Hücre Zarından Kolayca Geçiş ve Hücre Zarındaki	
Fosfolipitlerin ve Hidrofobik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	11
2.3.3. Enzim Aktivitesinin Durdurulması	12
2.4. Karbondioksitin Mikrobiyal İnaktivasyonunu Etkileyen Faktörler	12
2.4.1. Sıcaklık	13
2.4.2. Basınç	14
2.4.2.1. Basıncın Aniden Kaldırılmasının İnaktivasyona Etkisi	16
2.4.3. Uygulama Süresi	17
2.4.4. Karbondioksitin Bulunduğu Hal	18
2.4.5. Konsantrasyon	18
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Mikroorganizmalar	20

3.1.2. Deney Düzenegi	20
3.2. Örneklerin Hazirlanmasi	21
3.3. Mikrobiyolojik Sayim	22
3.4. pH Ölçümü	23
3.5. Veri Analizi ve İstatiksel Analiz	23
4. SONUÇLAR	24
4.1. Örneklerin pH Değişimi	24
4.2. Mikrobiyal İnaktivasyona Uygulama Zamanının Etkisi	26
4.3. Mikrobiyal İnaktivasyona Karbondioksit Basıncının Etkisi	29
4.4. Mikrobiyal İnaktivasyona Sıcaklığın Etkisi	31
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

3.1. Basınçlı karbondioksit uygulaması tank ve deney düzeneği

21

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Basınçlı karbondioksit ile doyurulmuş portakal suyundaki çeşitli mikroorganizmaların inaktivasyonu	6
2.2. Karbondioksit gazının fiziksel özellikleri	6
2.3. Portakal suyunda basınçlı karbondioksit uygulamasında zamana göre toplam mikroorganizma sayısı ve yüzdesel azalma	17
3.1. Kaymaksız yoğurdun kompozisyonu	20

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Basınçlı karbondioksit etkisiyle pH değeri düşürülen ortam ile atmosferik basınç altında HCl etkisiyle pH değeri düşürülen ortamdaki mikrobiyal inaktivasyon	11
2.2. <i>Lactobacillus spp.</i> 'nin çeşitli sıcaklık değerlerindeki inaktivasyonu	13
2.3. 58 atm basınçta sıcaklığın yükseltilmesi ile <i>B. megaterium</i> ATCC 12872 sporlarının inaktivasyonu	14
2.4. Nutrient broth içindeki <i>E. coli</i> bakterisinin 30 °C sıcaklıkta çeşitli basınçlardaki inaktivasyonu	14
2.5. 60 °C sıcaklıkta basıncın yükseltilmesi ile <i>B. megaterium</i> ATCC 12872 sporlarının inaktivasyonu	16
2.6. 30 °C sıcaklık ve 50 kg/cm ² basınç ortamındaki Kimchi örneklerinin yüzdesel miktarının <i>Lactobacillus spp.</i> 'nin inaktivasyonuna etkisi	19
4.1. Ayranın 20 ve 37°C sıcaklık ile 40 bar basınçta karbondioksit uygulama zamanının ayranın pH değerine etkisi	24
4.2. <i>E. coli</i> ATCC 8739 ve <i>S. aureus</i> ATCC 29213 içeren peptonlu suda 20 ve 37°C sıcaklık ile 20 ve 40 bar basınçta karbondioksit uygulama zamanının pH değerine etkisi	25
4.3. 20°C sıcaklıkta ve 40 bar basınçta 20, 50 ve 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> içeren ayran örneklerinin muhafaza zamanına göre mikrobiyal yük değişimi	27
4.4. 20°C sıcaklıkta 20 ve 60 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan <i>E. coli</i> ATCC 8739 ve <i>S. aureus</i> ATCC 29213 içeren peptonlu su örneklerinde karbondioksit temas zamanı ve karbondioksit basıncının mikrobiyal yüke etkisi	29
4.5. 20°C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınç altında, 20 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>C. albicans</i> içeren ayranın muhafaza zamanına göre mikrobiyal yük değişimi	30
4.6. 40 bar basınç altında 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> içeren ayran örneklerinin muhafaza zamanına göre mikrobiyal yük değişimi	32

- 4.7. 20 ve 37⁰C sıcaklıkta 20 bar basınç altında karbondioksit gazına maruz bırakma zamanının *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su örneklerinin mikrobiyal yüküne etkisi 33
- 4.8. 20 ve 37⁰C sıcaklıkta 40 bar basınç altında karbondioksit gazına maruz bırakma zamanının *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su örneklerinin mikrobiyal yüküne etkisi 34

1. GİRİŞ

Gıdalar açısından mikroorganizmalar; yararlı, bozucu ve hastalığa neden olanlar olmak üzere üçe ayrılır. Gıda güvenliği denince, mikroorganizmaların bulaşma yolları, gıdaların bozulma prensipleri, mikroorganizmalar tarafından gıdalarda oluşan kimyasal değişiklikler, bakteri, küf, maya ve sporlar ile ilgili fizyolojik etkenler, mikrobiyal gelişmeyi etkileyen faktörler, mikroorganizmaların sebep olduğu bozulma ve hastalıklar gibi konular göz önünde tutulur. Gıdalar tüketiciye ulaşmadan önce seçme, işleme, paketlenme, nakliye ve market gibi uzun süreçler geçirdiğinden dolayı, yaşanan bu uzun sürecin sonunda gıdanın bozulmadan kaliteli ve güvenli olarak tüketiciye sunulması, gıda güvenliğinin sağlanması için gerekli önlemlerin alınmasını gerektirir.

Gıdaları güvenli, bozulmamış ve hastalığa sebep olmayacak şekilde tüketiciye sunma, gıdanın içerdiği zararlı mikroorganizmaların inaktivasyonu ile sağlanmaktadır. Sözkonusu güveni sağlayabilmek için gıdalarda bulunan veya bulaşan mikroorganizmaların tanınması, bunların neden olduğu değişikliklerin bilinmesi ve bu mikroorganizmaların inaktivasyonu için gerekli önlemlerin alınması zorunludur. Mikroorganizmalar gıdalara havadan, yeşil bitkilerden, hayvanlardan, atık maddelerden, sulardan, topraktan, insanlardan ve gıdanın toplanması, taşınması ve işlenmesi sürecinden bulaşabilir. Gıdada mikrobiyal yükün bulunması veya sözkonusu yollardan biriyle bulaşması gerekli önlemler alınmadığı takdirde gıdanın kısa sürede bozulacağı anlamına gelmekte olup, hemen hemen insanlık tarihinin başlangıcından beri mikroorganizmaların inaktivasyonu için geleneksel ısısal yöntemler kullanılmıştır. Son zamanlarda ısısal inaktivasyona alternatif olarak mikrodalga, basınç, elektriksel vuruş, ışık, karbondioksit ve ozon gibi ısısal olmayan birçok inaktivasyon yöntemi geliştirilmiştir.

1.1. Hipotez

Gıdalardaki mikroorganizmaların ısısal olmayan bir yöntem olan karbondioksitle inaktive edilmesi, düşük maliyet, tazelik ve gıdanın besin değerinin korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu yöntem sıvı gıdalar olarak süt endüstrisi, maden suyu endüstrisi, şarap endüstrisi, meyve suyu endüstrisi ve kola endüstrisinde kullanılabilir. Basınçlı karbondioksit uygulamasının gıda endüstrisinde geniş bir şekilde kullanılması için, endüstriyel olarak özel işlem alanları gereklidir (Erkmen, 1997; Haas et al., 1989; Hong et al., 1997; Lin et al., 1994; Pyun, 1999).

Bir gıdanın raf ömrü, gıdanın mikrobiyal yüküne doğrudan bağlıdır. Mikrobiyal yük diğer gıdalarda olduğu gibi sıvı gıdalarda da kaliteyi etkilemektedir. Mikrobiyal yükün fazla miktarda oluşu sıvı gıdanın kalitesinin kötüleşmesine, sonuçta raf ömrünün kısalmasına ve ekonomik kayıpların meydana gelmesine neden olabilmektedir. Bozucu etkenlerin sıvı gıdaların kalitesini düşürmesini engelleyerek veya yavaşlatarak ve tüketicilere sağlıklı ürünler sunmak için gıdalardaki mikrobiyal yük mutlaka azaltılmalıdır. Barındırdığı mikrobiyal yükü uygun inaktivasyon yöntemiyle giderilmeyen gıdalar bozulmakta, hastalığa sebep olmakta ve sonuçta önemli sağlık sorunlarına ve çok büyük ekonomik kayıplara sebep vermektedir. Gıda biliminde de çeşitli gıdaların taşıyabileceği maksimum mikroorganizma sayıları (tolerans aralıkları) tanımlanmıştır. Isısal işlemler alışlageldiği gibi, tüketicinin kabul ettiği baskın bir metod olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Isısal inaktivasyon mikroorganizmaları öldürmekle beraber, gıdanın tat, renk, lezzet ve besin değerinin azalması gibi kalite kayıplarına sebep olabilmektedir. Isısal işleme alternatif olarak ısısal olmayan işlemlerin de yüksek gıda kalitesinin korunmasında kullanılabileceği öngörülmüştür (Mertens and Knorr, 1992).

Aseptik paketlenme ve ultra yüksek sıcaklık uygulamaları mikrobiyal raf ömrü için geliştirilmiş etkili yöntemlerdir. Bu yöntemler pahalı olup, her zaman tercih edilmez. Başka bir yöntem olan yüksek sıcaklık kısa zaman pastörizasyonu kısa zamanda gıdalardaki bozucu mikroorganizmaların sayısını düşürür. Ancak, bu

uygulama vejetatif hücrelere karşı etkili olsa da spor germinasyonu ve büyümesi üzerinde çok düşük etkiye sahiptir (Cromie, 1989).

Sıvı gıdalara karbondioksit uygulaması gıdalardaki mikrobiyal yükün azaltılmasında önemli bir faktör olarak tanımlanmış ısısal olmayan pastörizasyon metodlarından birisidir. Karbondioksit uygulamasıyla hücre içi pH anında düşürülmekte, hücre zarından kolayca geçiş sağlanmakta, hücre zarındaki fosfolipitlerin ve hidrofobik bileşiklerin ekstraksiyonu sağlanmakta ve neticesinde mikroorganizmalar inaktive olmaktadır.

Basınçlı karbondioksit uygulamasının *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* vejetatif hücreleri, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *B. licheniformis* ve *B. megaterium* sporu popülasyonları üzerinde inaktivasyon etkileri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca basınçlı karbondioksitin lipaz, alkalın fosfataz, metilesteraz ve polifenol oksidaz enzimleri üzerinde de etkisi olduğu tespit edilmiştir (Hong et al., 1997; Erkmen and Karaman, 2001; Erkmen and Karaman, 2000; Erkmen, 2000; Watanabe et al., 2003; Enomoto et al., 1996; Erkmen and Fadıloğlu, 2001; Erkmen et al., 2004). Bu uygulamalarda süt ve meyve suları kullanılmıştır (Loss and Hotchkiss, 2002; Erkmen, 1997; Erkmen et al., 2004).

Fakat basınçlı karbondioksitin süt ürünü olan ayranın etkisi araştırılmamıştır. Bu nedenle tez çalışmasında basınçlı karbondioksit gazı uygulamasının yoğurt ve ayranın bozulmaya neden olan düşük pH'ya dayanıklı *Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *Candida* üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bu bilgilerin ışığı altında bu çalışmanın hipotezi şudur: Ayranın basınçlı karbondioksit kullanımıyla mikrobiyal yük azaltılabilir ve böylece besin değeri yüksek ve daha kaliteli ayran elde edilebilir.

1.2. Amaç

Bu çalışmanın ana amacı gıdalarda ısısal olmayan inaktivasyon teknolojilerinden biri olan basınçlı karbondioksit uygulamasının farklı basınç, sıcaklık ve uygulama zamanlarında, ayranın mikrobiyal yüküne etkisinin belirlenmesidir.

Bu çalışmanın diğer amacı karbondioksitin sudaki mikroorganizmalara etkisinin araştırılması ve karbondioksit ile ayrandaki mikrobiyal yükün azaltılması ile sudaki mikrobiyal yükün azaltılmasının karşılaştırılmasıdır.

2. KARBONDİOKSİT İLE İNAKTİVASYON TEKNOLOJİLERİ

Gıdalardaki mikrobiyal yükün azaltılmasının gıdayı korumak, kaliteli ve güvenli oluşunu sağlamak gibi fonksiyonlarını artırmak, gıdanın raf ömrünü uzatmak gibi temel fonksiyonları vardır.

Geleneksel olan ısısal inaktivasyon yerine son yıllarda elektriksel vuruş, mikrodalga, basınç, ses, ozon ve karbondioksit uygulaması gibi ısısal olmayan teknolojiler geliştirilmiştir. Bu teknolojilerin birtakım ekonomik kazançlarının olmasının yanında gıdaların renk, koku, lezzet ve vitamin değerinde azalma olmaması, besin değerinde değişiklik olmaması ve enzim inaktivasyonunun sağlanarak bozulmanın engellenmesi gibi çok önemli avantajları bulunmaktadır. Gıdaların başlangıçta az miktarda mikrobiyal yük taşıması bile mikrobiyal gelişimi hızlandırmakta ve enzim aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Oluşan mikrobiyal gelişim ve artan enzim aktivitesi gıdanın rengini, aromasını, tadını ve besin değerini değiştirebilirken bu faktörlerin yanında en önemlisi gıdanın insanlarda sağlık problemlerine yol açma riski taşımasına da neden olabilmektedir.

Isısal olmayan inaktivasyon işlemi gıdanın raf ömrü boyunca gıdayı dış etkilerden korumakta ve besin değerini muhafaza etmesine rağmen, ısısal inaktivasyon işlemi gıdaları dış etkilerden korumada ve besin değerinin muhafaza edilmesinde yetersiz kalmaktadır. Isısal olmayan inaktivasyon yöntemi ile hem gıdalarda patolojik ve bozucu mikroorganizmalara karşı önemli bir koruma sağlanmakta, hem de gıdanın raf ömrünü artırmak için bozucu reaksiyonlar yavaşlatılmaktadır (Tablo 1.1). Gelişen ortam ve gıdalarda yüksek karbondioksit uygulaması geleneksel ısısal metodlara karşı alternatif olarak geliştirilmekte ve yayılmaktadır (Daniels et al., 1985; Hong and Pyun, 1999; Wei et al., 1991).

Tablo 2.1. Basıncılı karbondioksit ile doyurulmuş portakal suyundaki çeşitli mikroorganizmaların inaktivasyonu (Sims et al., 2002).

Mikroorganizma	Sıvı Gıdadaki M.O. Sayısı	150 Bar		75 Bar	
		Sıcaklık °C	Ölüm	Sıcaklık °C	Ölüm
<i>Escherichia coli</i>	8.0×10^8	25	Tümü	25	Tümü
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.7×10^6	25	Tümü	-	-
<i>S. cerevisiae</i> veg.	1.6×10^{12}	25	Tümü	-	-
<i>S. cerevisiae</i> ascospores	5.8×10^6	40	Kısmi	-	-
<i>S. cerevisiae</i> ascospores	5.8×10^6	45	Tümü	-	-
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> spores	6.5×10^6	-	-	45	Tümü
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.7×10^8	25	Kısmi	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.9×10^8	35	Tümü	35	Tümü

2.1. Karbondioksitin Genel Özellikleri

Karbondioksit su ve yağlarda uygun sıcaklık ve basınçta yüksek çözünürlük gösteren yegane gazdır. Karbondioksit gazı yeraltından doğal olarak veya atık baca gazlarından elde edilir. Karbondioksit gazı $-56,6^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve 4,16 bar basınçta aynı anda katı, sıvı ve gaz halinde bulunur. Karbondioksit sıvı halde yatay veya dikey dışı yalıtım malzemeleri ile yalıtılmış, tek cidarlı içten soğutma sistemli tanklarda depolanabilir. TSE standartlarına göre sıvı/gaz karbondioksitin 1. sınıfının safiyeti minimum %99,9, 2. sınıfının safiyeti ise minimum %99,7 olmalıdır (TSE-TS 2603).

Tablo 2.2. Karbondioksit gazının fiziksel özellikleri.

Molekül Ağırlığı	44,01 g/mol
Yoğunluğu (sıvı, $-56,6^\circ\text{C}$ sıcaklıkta)	$1,1778 \text{ kg/dm}^3$
Yoğunluğu (gaz, 0°C ve 1 atm basınçta)	$1,97 \text{ kg/m}^3$
Kritik sıcaklığı (1 atm basınçta)	$31,1^\circ\text{C}$
Süblimleşme sıcaklığı	$-78,50^\circ\text{C}$ (katı fazdan gaz fazına geçiş)
Özgül Ağırlığı (hava:1)	1,528

Tablo 2.1’de fiziksel özellikleri verilen karbondioksit gazı renksiz, kokusuz, zehirsiz ve havaya oranla daha ağır bir gazdır. Karbondioksit gazı boğucu buhara sahiptir ve havadan 1,53 kat ağırdır. Karbondioksit atmosfer basıncında sıvı halde bulunmaz, 56 barda kapalı bir kaptaki sıvı halde bulunabilir. Gazın katı fazı olan kuru buz deri üzerinde soğuk yanıkları oluşturabilir. Atmosferde yaklaşık %0,035 oranında karbondioksit bulunmaktadır. Bu oran solunumu düzenli tutar, fakat; solunumda karbondioksit oranının artışı soluk alıp verme sayısını artırır ve solunum hızı, normal seviyenin %50 üzerine çıkar. Birkaç saat bu seviyede karbondioksite maruz kalınca, baş ağrısı ve halsizlik hissi ortaya çıkabilir, daha yüksek konsantrasyonlarda karbondioksit boğulmaya yol açabilir ve solunum merkezini felç edebilir. Ortamda %10 veya daha fazla oranda karbondioksit bulunması solunum güçlüğü, ani şuur kayıpları ve ani ölümlere yol açabilir. Boğulma belirtileri hızlı ve zor soluk alma, hızlı yorgunluk, mide bulantısı, kusma ve bilinç kaybının sonrasında muhtemelen ölümdür. Karbondioksit kaynaklı soğuk yanmalarında ise etkilenen kısma 5 dk. boyunca ılık su verilmeli ve daha sonrasında termal yanık olarak tedavi edilmelidir.

Karbondioksit nemli ortamlarda biraz koroziftir. Oda sıcaklığında kuru gaz için normal malzemeler uygundur ve -30°C sıcaklığın altında yalnızca düşük sıcaklık karbon çeliği, östenitik paslanmaz çelik, alüminyum, bakır ve bu ikisinin alaşımlarının kullanılması uygun olur. Eğer karbondioksit yüksek basınçlarda oksijen içeren ortamda su ile çözünürse, asite dayanıklı malzeme kullanılması uygun olur. Hat ve teçhizat üzerindeki karbondioksit kaçağının tespiti için sabunlu su kullanılabilir. Eğer tüpün boşaltılması gerekirse, kapalı alanda ise alan boşaltılmalı veya uygun yer aranmalı ve tekrar girmeden önce atmosfer kontrol edilmelidir. Karbondioksit gazının sıcaklık altında gazlaşmasından dolayı tüp vanaları, eğer herhangi bir ısı kaynağı tüp içerisindeki karbondioksit basıncını maksimum müsaade edilebilir servis basıncının üzerine çıkarırsa, yırtılacak ve gazı tamamen dışarıya çıkaracak şekilde bir patlama/yırtılma diski ile donatılmıştır.

Karbondioksit gazı metal kaynağında inert bir örtü olarak; amonyum bikarbonat, potasyum karbonat, kalsiyum karbonat gibi tuzların çökmesinde, aspirin, parasetamol, penisilin üretiminde, pH ayarlamasında, şeker rafinasyonunda, demir

peletlemede, pota yüzeylerinin sertleştirilmesinde, kurşun karbonat pigment üretiminde, deri tabakalamada, kürk korumada, borularda kireç önlemede, su arıtmada, çimento iyileştirmede, gübre olarak, duman efekti olarak, hava yastıklarında, cankurtaran botlarının şişirilmesinde, torpido itici olarak, madenlerde patlayıcı yerine, patlayıcı maddelerin soğutulmasında, aerosol ve yangın tüplerinde, yangın söndürme sistemlerinde, tehlikeli sıvıların transferinde, petrol çıkarmada, fıçı bira, kola gibi içeceklerde, dondurulmuş gıda, meyve, sebze ve çiçek stoklaması/muhafazasında, çabuk bozulabilen maddelerde paketlenme ve tazeliği korumada, bira, meşrubat, dondurma, süt, tereyağ, şarap, madensuyu ve lastik üretiminde kullanılır.

2.2. Gıda Sanayinde Karbondioksitin Kullanılmasının Faydaları

Karbondioksit, pahalı ve yanıcı değildir, toksik etkisi yoktur, kokusuzdur, çevreyi kirlilemez ve sera etkisine neden olan diğer endüstriyel aktivitelerden elde edilip kullanılabilir. Bu da sera etkisinin azalmasına sebep olur. Basınçlı karbondioksit uygulaması gıdalarda tazeliğin korunması, mikrobik inaktivasyon, enzim aktivasyonunun durdurulması ile çürümeye engel olma işlemlerinde kullanılabilir.

2.3. Karbondioksitin Etki Mekanizmaları

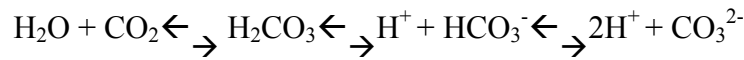
Karbondioksitin antimikrobiyal etkisi, sıvı gıdanın uygun sıcaklık ve basınçta hızlıca karbondioksite doyurulması ile olup, son zamanlarda gıdalardaki çürükçül mikropların yüksek basınçlı karbondioksit altında büyük oranda etkisini kaybettiğine dikkat çekilmiştir (Enomoto and Nakamura, 1996).

Yüksek basınçlı karbondioksit uygulaması biyolojik sistemlerde protein denaturasyonuna, lipid safha değişimlerine, hücre zarlarının ve duvarlarının yırtılmasına neden olarak etkisini gösterir (Ballestra et al. 1996, Daniels et al. 1985).

Yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasında mikrobiyal güvenliğin artması ve mikrobiyal kararlılığın sağlanması için uygulanan basınç, başlangıç mikroorganizma sayısından yeterli bir azalma sağlamalıdır. Karbondioksitin etkisinin tam olarak ne şekilde olduğu bilinmemekle birlikte karbondioksitin hücre içi pH değerini hızlıca düşürdüğü, hücre zarından kolayca geçerek hücre zarındaki fosfolipidleri ve hidrofobik bileşikleri ekstrakte ettiği ve enzim aktivitesini durdurduğu tahmin edilmektedir.

2.3.1. Hücre İçi pH Değerinin Hızlıca Düşürülmesi

Sıvı ortamlardaki karbondioksit uygulaması aşağıdaki kimyasal tepkimeye göre olmaktadır.



Basınçla uygulanan karbondioksit akışkan içerisinde karbonik asit formundadır. HCO_3^- eksi değerlikli olduğu için hücre içerisine girmesi çok kolay olmaktadır. Erimiş karbondioksit solüsyon içerisinde pH değişimine sebep olabilmektedir (Erkmen, 2000).

Mikrobiyal hücre bir lipid bilayer içeren bir plasmik zara sahip olduğundan, karbondioksit hücre zarından geçerek hücre içine akabilir. Basınç altında karbondioksit moleküllerinin hücre zarından geçmesi mümkündür. Hücre zarından geçen karbondioksit sitoplazmik havuzun tamponlama kapasitesini aşacak şekilde hücre içi pH değerini düşürebilir ve hücre inaktivasyonunu sağlayabilir (Erkmen, 2000).

Yüksek basınçta karbondioksit moleküllerinin büyük bir kısmı hücre zarından geçerek hücre içi pH değerini sitoplazmik havuzun tolere edebileceği değerden çok daha aşağı çeker. Hücre içerisindeki düşük pH değeri anahtar enzimleri, glikoz, amino asitler ve peptid transportu ile iyonların aktif taşınımı ve proton yerleşimini bozar (Hutkins and Nannen, 1993).

Karbondioksitin antimikrobiyal aktivitesi henüz tamamen bilinmemesine rağmen, düşük pH değerleri mikroorganizmaların metabolizmasını inhibe eder (Daniels et al., 1985; Dixon and Kell, 1989).

Bununla birlikte basınçlı karbondioksit uygulaması sonucu çevresel asidifikasyonun değişimi ölümcül etki sağlamayabilir (Haas et al., 1989; Lin et al., 1992).

Çünkü laktik asit bakterileri gibi bazı mikroorganizmaların düşük pH değerlerine dayanıklı olduğu bilinmektedir (Padan et al., 1981; McDonald et al., 1990).

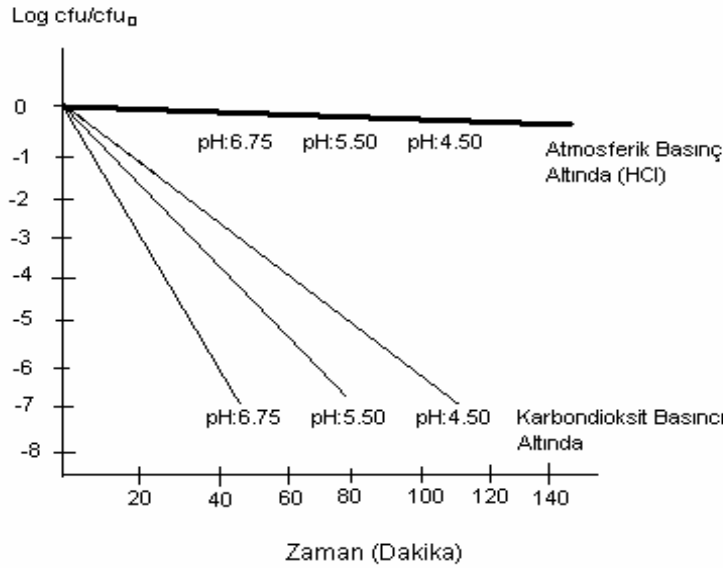
2.3.1.1. Ortam Kompozisyonunun pH Değerine Etkisi

Brain heart infusion broth ve fizyolojik tuzlu su ortamlarında *S. typhimurium*'un basınçlı karbondioksitle inaktivasyonu çalışmasında iki ortama ait D değerinde, sabit basınçta önemli bir fark olduğu görülmüştür (Erkmen, 2000). Mikroorganizmaların basınca karşı olan direnci ortam kompozisyonuna ve mikroorganizma tipine göre değişmektedir (Erkmen, 2000; Haas et al., 1989; Lin et al., 1994).

Basınçlı karbondioksit uygulaması sonrası fizyolojik tuzlu suyun pH değeri 4.62-4.95 brain heart infusion broth'un pH değeri ise 5.63-5.97 olarak ölçülmüştür. Brain heart infusion broth'un bileşimdeki tamponların iyi olması sebebiyle pH değeri yüksek kalmıştır. Fizyolojik tuzlu suda ise tampon etkisi yapabilecek maddelerin olmaması sebebiyle pH düşmüş, inaktivasyon oranı brain heart infusion broth'a göre daha yüksek olmuştur. Bu sonuçlardan asidik pH değerinin mikroorganizmaların ölümü için önemli bir etken olduğu çıkarılabilir. Bununla birlikte basınçlı karbondioksit uygulamasının tek başına uygulanmasının ölümcül etkiyi sağladığı söylenemez. Bu sonuçlar değişik kompozisyona sahip sıvı gıdalardaki basınçlı karbondioksit uygulamasının etkisinin farklı olduğunu göstermektedir (Haas et al., 1989; Isenschmid et al., 1995; Lin et al., 1993).

2.3.1.2. Karbondioksitin Diğer pH Düşürücülerle Kıyaslanması

Grafik 2.1’de görüldüğü üzere ortam pH değeri, atmosferik basınçta HCl uygulaması ve basınçlı karbondioksit uygulanması ile aynı değerlere düşürülmesine rağmen, atmosferik basınç altında HCl uygulamasında mikrobiyal popülasyonda hemen hemen hiç inaktivasyon görülmemiştir. Bunun sebebi, HCl’nin hücre zarından kolayca geçememesi, basınçlı karbondioksitin ise hücre zarından kolayca geçerek hücre içi pH değerini düşürmesidir. Bununla birlikte HCl iyonik yapıda olmasına karşın, karbondioksit moleküler yapıdadır.



Grafik 2.1. Basınçlı karbondioksit etkisiyle pH değeri düşürülen ortam ile atmosferik basınç altında HCl etkisiyle pH değeri düşürülen ortamdaki mikrobiyal inaktivasyon (Qui et al., 1998).

2.3.2. Hücre Zarından Kolayca Geçiş ve Hücre Zarındaki

Fosfolipidlerin ve Hidrofobik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Basınçlı karbondioksit uygulaması, hücre için hayati önem taşıyan fosfolipidler ve hidrofobik bileşikleri ekstrakte ederek mikrobiyolojik inaktivasyonu sağlar (Kamihira et al., 1987; Lin et al., 1992, 1994).

Karbondioksit hücre içine girince hücrelerde öldürücü etki yaparak hücrelerin yapısını ve hücrenin biyolojik sistemlerinin çalışma dengesini bozar. Hücresel zarın fonksiyon ve yapısına zarar vererek enzimatik aktiviteleri inhibe eder ve hücre duvarını parçalayarak hücre inaktivasyonunu sağlar (Lin et al., 1994).

Farklı basınçlarda karbondioksit uygulamasında mikroorganizmalarda, protein denaturasyonu, lipid safha değişiklikleri, enzim inaktivasyonu ile hücrenin morfolojisinin, genetik mekanizmasının ve biyokimyasal reaksiyonların bozulduğu gözlenmiştir (Ballestra et al., 1996; Erkmen, 1997; Haas et al., 1989; Hong et al., 1997).

Bu da yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasının bakteriyal hücrelerin hücre zarını ve hücre duvarını bozduğunu göstermektedir. Yüksek basınçlı karbondioksit hücre zarının aktif taşıma ve pasif geçirgenlik özelliklerini değiştirerek, hücre dengesini bozabilmektedir (Ballestra et al., 1996; Haas et al., 1989; Isenschmid et al., 1995; Lin et al., 1994).

E. coli bakterisi yaklaşık 34 atm basınç altında tahrip olmaktadır. Karbondioksit uygulanmış mikrobiyal hücre kültüründen enzimler, rekombinant-DNA, kodlanmamış protein ve nükleik asitler alınarak karbondioksit gazının mikrobiyal hücreleri delip hücre içinde basınç alanı oluşturduğu ve hücreyi tahrip ettiği belirlenmiştir (Fraser, 1951; Lin et al., 1991).

2.3.3. Enzim Aktivitesinin Durdurulması

Yüksek basınçlı karbondioksit uygulaması, enzim inaktivasyonu için ısısal işleme alternatif olarak kullanılabilir. Süperkritik haldeki karbondioksit kullanımının gıdalardaki enzim aktivitesini kısmi olarak durdurduğu ispatlanmıştır. Basınçlı karbondioksitin portakal suyundaki pektinmetilesteraz ve elma suyundaki polifenoloksidaz enzimini inaktive ettiği spektrofotometrik ve titrimetrik yöntemlerle gösterilmiştir (Corwin, 2000).

2.4. Karbondioksitin Mikrobiyal İnaktivasyonunu Etkileyen Faktörler

Yüksek basınçlı karbondioksitin çeşitli basınçlarda, çeşitli sıcaklıklarda ve çeşitli uygulama zamanlarında mikroorganizmalara öldürücü etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bakterisit etki sıcaklık ve uygulama zamanının arttırılması ile artmıştır. Maksimum inaktivasyon etkisi optimum karbondioksit basınç değerlerinde elde edilmektedir (Enomoto et al., 1996).

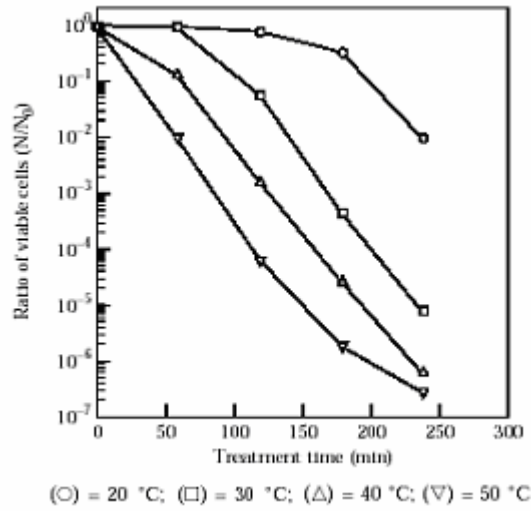
Yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasını etkileyen başlıca faktörler basınç, sıcaklık, çalışma hacmi ve uygulama zamanıdır. Mikrobiyal inaktivasyon oranı bunlardan başka gıdanın tipi, ortamın pH değeri, ortam bileşenleri (protein, aminoasit, şeker, yağ, vitamin miktarı), çevresel şartlar, hücrenin yaşı ve mikroorganizma tipi ile de ilgilidir (Lin et al, 1993; Ballestra et al., 1996; Erkmen 2000; Hong et al., 1997).

2.4.1. Sıcaklık

Mikrobiyal inaktivasyon sabit basınçta sıcaklığa bağlıdır (Erkmen, 2000). Basınçlı karbondioksit uygulamasında sıcaklığın artmasıyla mikrobiyal inaktivasyonun arttığı görülmüştür (Grafik 2.2).

Bu durumun sebebinin yüksek sıcaklığın karbondioksit difüzyonunu arttırması olabileceği rapor edilmiştir. Sıcaklık yükseldikçe hücre zarının karbondioksit geçirgenliği artar ve hücre zarından geçiş yükselir. Fakat bununla birlikte yüksek sıcaklık gıdanın kalitesini azaltabilir (Lin et al.; 1993, 1994).

Aynı zamanda sıcaklık hücre zarındaki akışkanlığı arttırarak karbondioksitin hücre içine girmesini kolaylaştırır. Karbondioksitin en aktif olduğu sıcaklık aralığı 20-45 °C olarak tespit edilmiştir.



Treatment time (min): Uygulama zamanı (dakika)

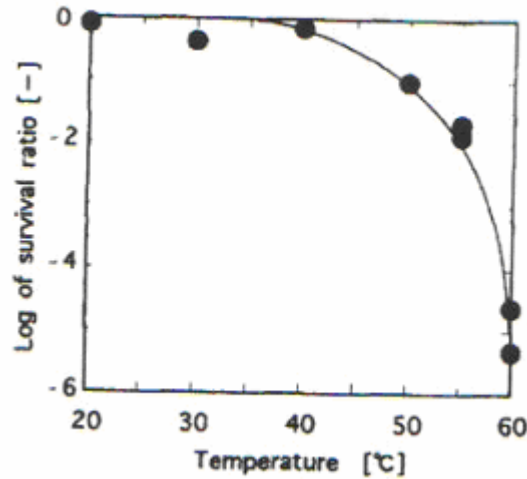
Ratio of viable cells: Hayatta kalan hücrelerin oranı

N: Başlangıç mikroorganizma sayısı

N₀: Uygulamadan sonraki mikroorganizma sayısı

Grafik 2.2. *Lactobacillus spp.*'nin çeşitli sıcaklık değerlerindeki inaktivasyonu (Hong et al., 1997).

Bununla birlikte bazı basınçlı karbondioksit çalışmalarında inaktivasyonun optimum sıcaklık değerinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Basınçlı karbondioksit uygulamalarında genellikle sıcaklığın artmasıyla inaktivasyonun arttığı rapor edilmiştir. Fakat Enomoto ve ark. (1996) *B. megaterium* ATCC 12872 sporlarıyla yapmış olduğu çalışmada bakteriyal sporların hayatta kalma oranının 50-60 °C sıcaklık arasında önemli bir şekilde azalmasına rağmen, 40 °C sıcaklığın altındaki sıcaklık değişimlerinde hücre sporlarının bozulmadan kaldığını gözlemişlerdir (Grafik 2.3).



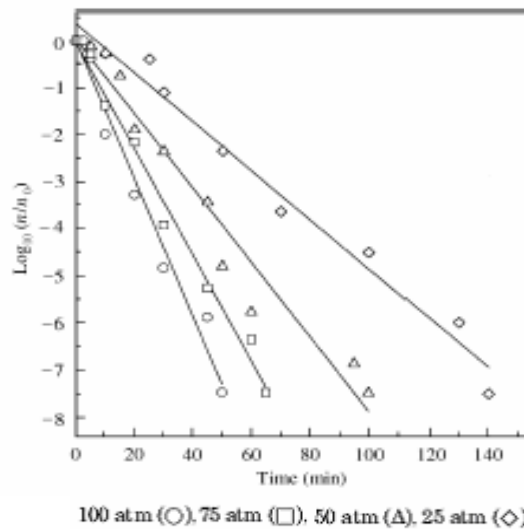
Temperature: Sıcaklık

Log of survival ratio: Hayatta kalan hücrelerin logaritmik oranı

Grafik 2.3. 58 atm basınçta sıcaklığın yükseltilmesi ile *B. megaterium* ATCC 12872 sporlarının inaktivasyonu (Enomoto et al., 1996).

2.4.2. Basınç

Yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasında mikrobiyal güvenliğin artması ve mikrobiyal kararlılığın sağlanması için uygulama basıncı, başlangıç mikroorganizma sayısında yeterli bir azalma sağlamalıdır. Yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasında genellikle basıncın artırılmasıyla inaktivasyon (Grafik 2.4.) artmaktadır (Erkmen, 2000).



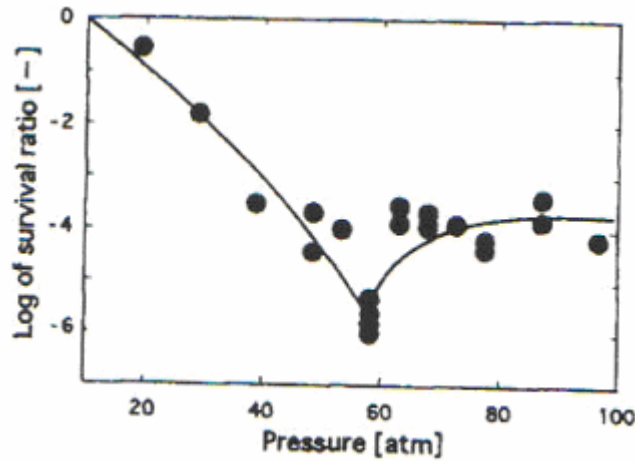
Time (min): Zaman (dakika)

Grafik 2.4. Nutrient broth içindeki *E. coli* bakterisinin 30°C sıcaklıkta çeşitli basınçlardaki inaktivasyonu (Erkmen, 2000).

Hong ve ark. (1997) *Lactobacillus spp.* ile yaptıkları çalışmada karbondioksit basıncını 20 kg/cm² seviyesinden 70 kg/cm² seviyesine çıkardıklarında inaktivasyonun arttığını gözlemişlerdir. 30 kg/cm² basınç altında 240 dakikalık uygulama sonunda sağlanan mikrobiyal azalmanın 70 kg/cm² basınç altında 140 dakikalık uygulama sonunda sağlanan mikrobiyal azalmadan daha az olduğu tespit edilmiştir. Daha yüksek basınçlarda daha kısa uygulama zamanı ile aynı orandaki mikrobiyal inaktivasyon kolayca sağlanmaktadır. Basınç kontrolü hem karbondioksit gazının çözünürlüğünü hem de ortam süspansiyonunun çözünürlüğünü kontrol eder. Bununla birlikte yüksek basınç hem karbondioksit çözünürlüğünü artırır hem de karbondioksitin hücrelerle temas etmesini kolaylaştırır. Bu sonuçlar yüksek basınçlı karbondioksit işleminde iki farklı aşamanın olduğunu göstermektedir. İnaktivasyon oranı ilk başta yavaş olup, işlem ilerledikçe önemli bir şekilde artmaktadır (Hong et al., 1997).

Yukarıdaki çalışmalara ilaveten bazı basınçlı karbondioksit uygulamalarında inaktivasyon için optimum basınç değeri olduğu gösterilmiştir. Basınçlı karbondioksit uygulamalarında genellikle basıncın artmasıyla inaktivasyonun arttığı rapor edilmişse de Enomoto ve ark. (1996) *B. megaterium* ATCC 12872 sporlarıyla yapmış olduğu çalışmada; basıncın 20 atm seviyesinden 60 atm seviyesine yavaş yavaş yükseltilmesi sonucu inaktivasyon etkisinin arttığını fakat bundan sonra basıncın artırılması ile inaktivasyonun azaldığını gözlemişlerdir (Grafik 2.5).

Optimum karbondioksit basıncının yaklaşık 60 atm civarında olduğu belirlenmiş ve spor hücrelerinin yaşamını sürdürme oranı, 58 atm basınç 60°C sıcaklık ve 24 saat uygulama süresinden sonra yaklaşık 6 logaritma seviyesinde azalmıştır (Enomoto et al., 1996).



Pressure: Basınç

Log of survival ratio: Hayatta kalan hücrelerin logaritmik oranı

Grafik 2.5. 60 °C sıcaklıkta basıncın yükseltilmesi ile *B. megaterium* ATCC 12872 sporlarının inaktivasyonu (Enomoto et al., 1996).

Enomoto ve ark. (1996) basınçlı karbondioksit uygulamasında yüksek inaktivasyon için optimum basınç aralığı olduğunu belirtmişlerdir. Ancak bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalarda karbondioksitin daha yüksek basınçlarda daha fazla öldürücü etki gösterdiği bildirilmiştir (Nakamura et al., 1994; Haas et al., 1989). *B. subtilis*'in inaktivasyonunda bu durumun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasının *B. subtilis*'in sudaki spor hücrelerinin toplanmasına neden olduğu ve bunun neticesinde karbondioksit basıncının etkisini engellendiği tahmin edilmektedir (Hata et al., 2000). Yapılan başka bir çalışmada *B. subtilis*'in spor hücreleri 60 °C sıcaklık ve 40 atm basınçta %0.1'lik pepton solüsyonunda bir araya gelmemiş, bundan sonra basıncın 40 atm'den 200 atm'e kadar yavaş yavaş artırılması sonucunda bakterisidal etkinin de arttığı gözlenmiştir (Hata et al., 1996).

2.4.2.1. Basıncın Aniden Kaldırılmasının İnaktivasyona Etkisi

Mikrobiyal ölüm oranı karbondioksit basıncının aniden kaldırılmasıyla gereğinden çok artabilir (Nakamura et al., 1994). Örneğin, ekmek mayası hücrelerinde basıncın 40 atm değerinin altına aniden indirilmesiyle hücrelerde mekanik yırtılma rapor edilmiştir. Karbondioksit basıncının aniden kaldırılmasıyla iç ve dış basınç arasındaki farkın birdenbire ortaya çıkması yırtılmaya sebep

olmaktadır (Lin et al., 1992). İnaktivasyon oranının karbondioksit basıncının basınç tankından yavaş yavaş ve ya aniden kaldırılmasıyla ilgili olduğu rapor edilmiştir. Basıncın aniden kaldırılmasıyla hücrelerin sıvı içerisinde iç basınçtan dolayı aniden şişmesi hücre içi materyallerin parçalanması sonucunu ortaya çıkarılabilmektedir. Buna karşın diğer çalışmalarda buna benzer bir sonuç elde edilememiştir. Bunun sebebi, yeterince karışımın yapılmaması, mikroorganizmalarla etkileşime girecek karbondioksitin çözünürlüğünün ve doygunluğunun yetersiz olmasıdır (Arreola et al., 1991). Bununla birlikte basıncın aniden düşürülmesinin mikrobiyal azalmada etkisi olmadığı da rapor edilmiştir (Hong et al., 1997).

2.4.3. Uygulama Süresi

Desimal inaktivasyon zamanı (D) başlangıçtaki mikroorganizma sayısını %90 azaltmak için gereken zaman olarak tanımlanır ve $D = 2.303/k$ olarak hesaplanır. Buradaki k değeri reaksiyon sabiti olup, inaktivasyon eğrisi eğiminin karşılığından hesaplanır. Model sistemler için en düşük D değeri gereklidir. Basınçlı karbondioksit uygulamalarında, uygulama zamanı arttıkça yaşayan mikroorganizmaların azaldığı görülmüştür (Tablo 2.2). Gıda güvenliği ve kalitesi açısından mikroorganizma sayısını en aza indirmek ana amaçtır.

Tablo 2.3. Portakal suyunda basınçlı karbondioksit uygulamasında zamana göre toplam mikroorganizma sayısı ve yüzdesel azalma (Qui et al., 1998).

Zaman (dakika)	Toplam mikroorganizma sayısı	% Azalma
0	2.0×10^7	-
15	1.8×10^7	10.20
60	1.5×10^7	21.94
120	9.5×10^6	51.79
200	7.8×10^6	60.10
240	9.4×10^5	95.20
300	4.3×10^5	97.82
360	1.3×10^5	99.36

2.4.4. Karbondioksitin Bulunduğu Hal

Gaz: Karbondioksitin sanayide ve gıda sanayinde kullanıldığı genel hal gaz halidir. Karbondioksitin gaz hali en yüksek difüzyon katsayısına sahip olmakla, yoğunluğu sıvı ya da süperkritik karbondioksitten daha düşüktür.

Süperkritik Hal: Gaz ya da sıvı karbondioksit kritik sıcaklığı olan 31⁰C sıcaklığa kadar ısıtılır ve 73 atm basınç altında tutulursa hem sıvı hem gaz özelliği taşır. Süperkritik noktadaki maddeler sıvı haldeki maddelere göre normalde daha iyi çözünebilirlik özelliği gösterirler. Süperkritik noktadaki maddeler gazlara benzer viskozite özelliği taşır fakat yoğunlukları sıvıya daha yakındır. Süperkritik noktadaki sıvıların özellikleri basınç ve sıcaklık değerlerine göre değişebilir. Düşük viskozitesinden dolayı süperkritik maddelerin benzer sıvı çözücülere göre küçük gözenek ve deliklere girmesi daha kolaydır. Ayrıca yüksek difüzyon etkisine sahip oldukları için de hızlı bir şekilde yayılabilirler. Karbondioksit uygulamasının lipidleri ekstrakte ettiği en iyi hal süperkritik hal olarak gözlemlenmiştir (Hong et al., 1997).

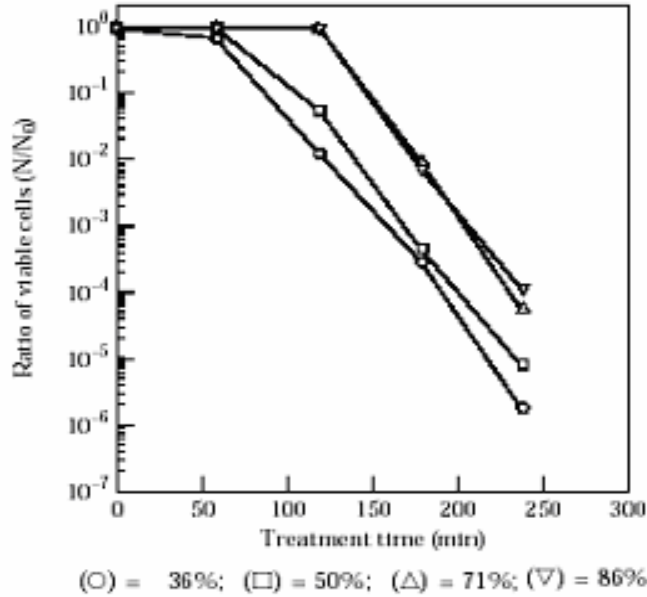
Sıvı: Karbondioksitin sıvı hali oda sıcaklığının altında bir sıcaklık olup, basınç tipik olarak 700-1000 psi arasındadır. Sıvı karbondioksit hali süperkritik noktadaki çözücü özelliklerinin bazılarını sahiptir. Sıvı karbondioksit düşük viskozite, yüksek difüzyon katsayısı ve belirli çözücü gücüne sahiptir.

2.4.5. Konsantrasyon

Erkmen (2000) brain heart infusion broth ve fizyolojik tuzlu su ortamlarda *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium*'un basınçlı karbondioksitle inaktivasyon çalışmalarında iki ortama ait D ve z değerlerinde, sabit basınçta önemli bir fark olduğunu belirlemiştir. Bu sonuç ortam kompozisyonunun *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Örneğin, sabit basınçta *L. monocytogenes* brain heart infusion broth'da %15.9 azalırken, fizyolojik tuzlu sulu ortamda %17.1 azalmıştır. *S. typhimurium*'un fizyolojik tuzlu su

içerisinde basınçlı karbondioksit brain heart infusion broth ortamından daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasında ortamın kompozisyonunun mikrobiyal inaktivasyonu etkilediğini göstermektedir.

Hong (1997) *Lactobacillus spp.*'nin basınçlı karbondioksit ile inaktivasyonunda Kimchi örneklerinin ortamdaki yüzdesel miktarının *Lactobacillus spp.*'nin inaktivasyonunu etkilediğini bulmuştur (Grafik 2.6).



Treatment time (min): Uygulama zamanı (dakika)

Ratio of viable cells: Hayatta kalan hücrelerin oranı

N: Başlangıç mikroorganizma sayısı

N₀: Uygulamadan sonraki mikroorganizma sayısı

Grafik 2.6. 30 °C sıcaklık ve 50 kg/cm² basınç ortamındaki Kimchi örneklerinin yüzdesel miktarının *Lactobacillus spp.*'nin inaktivasyonuna etkisi (Hong, 1997).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Yapılan deneylerde Süttaş A.Ş. (Karacabey, Bursa) tarafından üretilen kaymaksız yoğurt kullanılmış ve kullanılan kaymaksız yoğurdun kompozisyonu Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kaymaksız yoğurdun kompozisyonu (100 g).

Protein	5 g
Karbonhidrat	7 g
Yağ	4 g
Su	83 ml
Kalsiyum	175 mg
Eser Maddeler	1 g
Enerji kcal/kJ	84/352

Deneylerde kullanılacak ayran örneklerinin yapılması için, kaymaksız yoğurt ve distile su 40:60 oranında steril bir kap içerisinde steril şartlarda karıştırılmıştır.

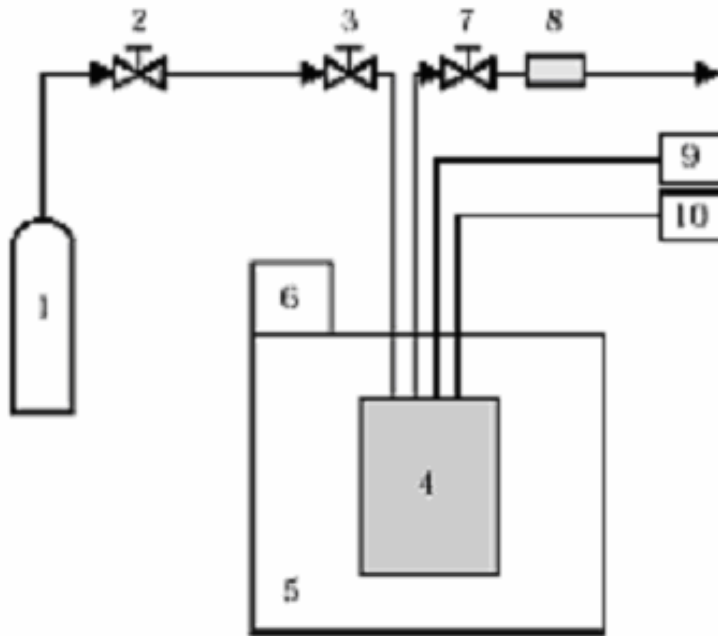
3.1.1. Mikroorganizmalar

Deneylerde kullanılan *B. cereus* 4312, *B. subtilis* 6633, *C. albicans* ATCC 10251, *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE) mikroorganizma kültür merkezinden temin edilmiştir.

3.1.2. Deney Düzenegi

Deneyde kullanılan basınç tankı Aytaç Tüp Sanayi (Karaköy, İstanbul), manometre ve termometre Pakkens (Merkez, Bursa), manometre ve termometreyi tanka bağlayan kısım As Rabak Bakır San. (Kağıthane, İstanbul) şirketinden satın

alınmıştır. Deneylerde ayrıca su banyosu ve karbondioksit tüpü (Yalnız Sınai ve Tıbbi Gazlar Tic. San. Ltd. Şti., Gebze, Kocaeli) kullanılmıştır. Tank ve deney düzeneğinin diğer parçaları yüksek basınca dayanıklı olması için paslanmaz çelikten imal edilmiştir. Her denemeden sonra tank ve deney düzeneği (Şekil 3.1.) %5'lik hipokloritli distile suyla temizlenerek dezenfekte edilmiştir. Sistemin dezenfekte olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, dezenfeksiyon işleminden hemen sonra sisteme sterilize su verilmiş ve bu sudan alınan örneklerde mikroorganizma gelişip gelişmediği gözlemlenmiştir. Dezenfeksiyon kontrolü için sistem çıkışından alınan su örneklerinde mikroorganizma gelişimi görülmemiştir.



Şekil 3.1. 1) Basınçlı karbondioksit gazı tüpü, 2) Basınç regülatörü, 3) Tank içine gaz giriş valfi, 4) Basınç tankı, 5) Su banyosu, 6) Termostatik kontrol, 7) Karbondioksit çıkış valfi, 8) Doğrusal çıkış filtresi, 9) Termometre, 10) Manometre.

3.2. Örneklerin Hazırlanması

Her deneyden önce *B. cereus* 4312, *B. subtilis* 6633 ve *C. albicans* ATCC 10251 stok kültürlerinden izole edilmiş, mikroorganizma sayısı spektrofotometrik yöntemle (McFarland, New Jersey, A.B.D.) ölçülmüştür. Daha sonra McFarland cihazı ile belirlenen mikroorganizmalar takribi $2,15 \times 10^5$ cfu/ml olacak şekilde 300

ml ayran örneği (%60 distile su, %40 yoğurt) içerisine ekilmiştir. Örnekler 40 bar basınçta, 20⁰C ve 37⁰C sıcaklıkta 20, 50 ve 80 dakika süre ile karbondioksit gazına maruz bırakılmışlardır. Kontrol örnekleri ise karbondioksit uygulamasına maruz bırakılmamışlardır. Örnekler vanadan 40 bar değerinde basınçlı karbondioksit uygulandıktan sonra belirtilen sürelerin sonunda basınç hızlıca düşürülmüştür. Sıcaklık kontrolü su banyosu ile yapılmıştır.

Ayranda basınçlı karbondioksit uygulamasına ek olarak gıda simulantı olan peptonlu suya basınçlı karbondioksitin etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla 200 ml hacmindeki peptonlu su örnekleri hazırlanmış daha sonra bu örnekler spektrofotometrik yöntemle (McFarland, New Jersey, A.B.D.) takribi $2,16 \times 10^6$ cfu/ml *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 ekilmiştir. Peptonlu su örnekleri 20⁰C ve 37⁰C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınçta, 20 ve 60 dakika süre ile karbondioksit gazına maruz bırakılmışlardır. Örnekler vanadan 20 ve 40 bar değerlerinde basınçlı karbondioksit uygulandıktan sonra belirtilen sürelerin sonunda basınç hızlıca düşürülmüştür. Sıcaklık kontrolü su banyosu ile yapılmıştır.

3.3. Mikrobiyolojik Sayım

Ayran örnekleri hızlıca tanktan alındıktan sonra 10^{-7} cfu/ml seviyesine kadar seyreltilmiş ve daha sonra plate count agara ekilerek 37⁰C sıcaklıkta 24 saat etüvde (Nüve, EN400, Ankara) inkübe edilmişlerdir. Aynı şekilde mikroorganizma ekilen ve basınçlı karbondioksit uygulanmayan kontrol örnekleri de plate count agara ekilerek 37⁰C sıcaklıkta 24 saat etüvde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon işleminden sonra petrilerdeki koloniler sayılmıştır.

Aynı şekilde peptonlu su örnekleri hızlıca tanktan alındıktan sonra 10^{-7} cfu/ml seviyesine kadar seyreltilmiş ve daha sonra plate count agara ekilerek 37⁰C sıcaklıkta 24 saat etüvde inkübe edilmişlerdir. Aynı şekilde mikroorganizma ekilen ve basınçlı karbondioksit uygulanmayan kontrol örnekleri de plate count agara ekilerek 37⁰C sıcaklıkta 24 saat etüvde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon işleminden

sonra petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Bütün denemeler iki tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçlar bu iki değerin ortalaması olarak verilmiştir.

3.4. pH Ölçümü

Her uygulamanın ardından örneklerin pH değerleri Metrohm 632 (Metrohm, İsviçre) pH metre ile ölçülmüştür. Ölçümler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

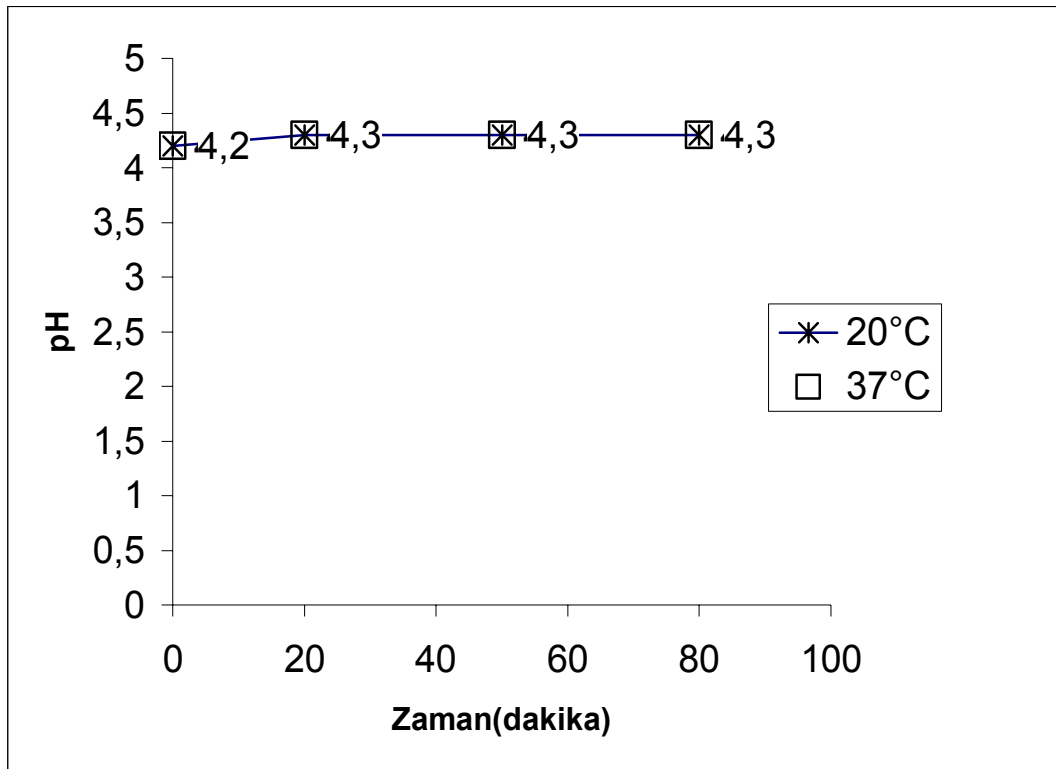
3.5. Veri Analizi ve İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde, Excel (Microsoft Corp., 2002, A.B.D.) ve SPSS (SPSS Inc., Versiyon 10.0.1, 1999, A.B.D.) programları kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak faktörlerin etkili olup olmadığı $p \leq 0.05$ seviyesi referans alınarak belirlenmiştir. Deneyler iki defa tekrarlanmış ve sonuçlar bu iki değerin ortalaması olarak verilmiştir.

4. SONUÇLAR

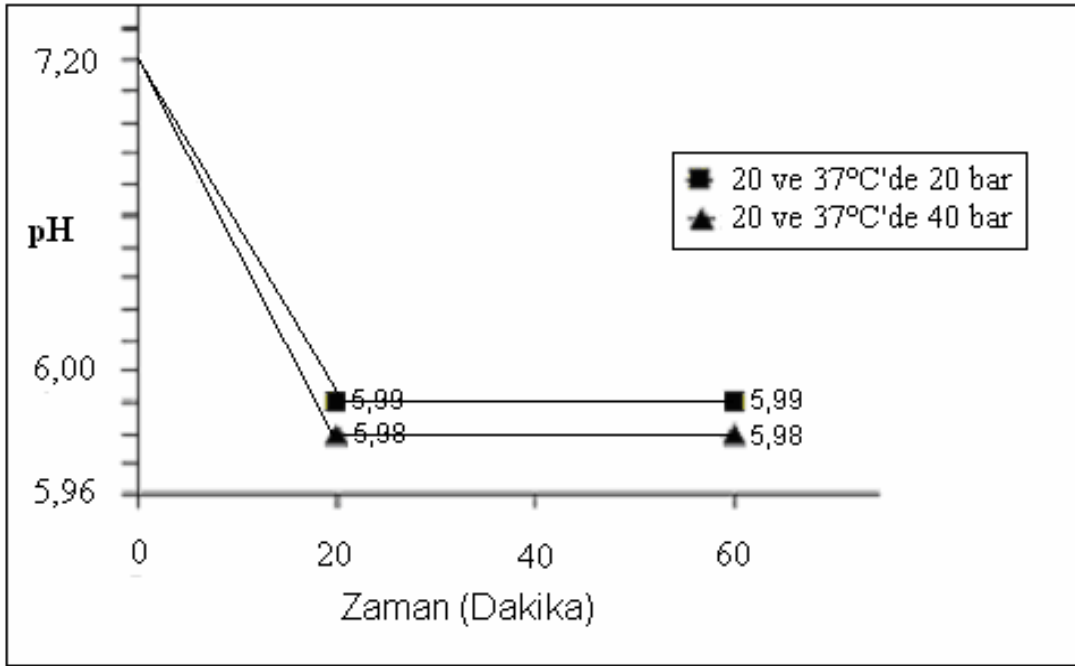
4.1. Örneklerin pH Değişimi

Basıncılı karbondioksit uygulamasından sonra ayranın pH değerinin $p \leq 0.05$ seviyesinde anlamlı bir değişiklik göstermediği gözlemlenmiştir (Grafik 4.1). 5, 7 ve 12 gün sonra yapılan pH ölçümlerinde de örneklerin pH değerleri değişmemiştir.



Grafik 4.1. Ayranda 20 ve 37°C sıcaklık ile 40 bar basınçta karbondioksit uygulama zamanının ayranın pH değerine etkisi.

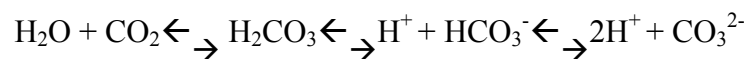
E. coli ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu suya 20 ve 37°C sıcaklık ile 20 ve 40 bar basınç altında 20 ve 60 dakika süre ile karbondioksit uygulamasından sonra peptonlu suyun pH değerinin ilk aşamada aniden düştüğü görülmüştür. Basıncılı karbondioksit uygulamasından sonra peptonlu suyun pH değerinin başlangıç pH değerine göre $p \leq 0.05$ seviyesinde anlamlı bir değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir. Fakat farklı sıcaklık ve farklı basınç altında karbondioksit gazına maruz bırakılan örneklerin 20 ve 60 dakika sonundaki pH değerlerinde ise $p \leq 0.05$ seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Grafik 4.2.).



Grafik 4.2. *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu suda 20 ve 37°C sıcaklık ile 20 ve 40 bar basınçta karbondioksit uygulama zamanının pH değerine etkisi.

Ayran örneklerinde pH değerinin ilk aşamada düşmemesine rağmen, peptonlu su örneklerinde pH değeri basınçlı karbondioksit uygulaması sonunda aniden düşmüştür. Basınçlı karbondioksit uygulaması sonrası ayranın pH değerinin düşmemesinin sebebi olarak ayran içinde tampon etkisi yapabilecek maddelerin varlığının olduğu tahmin edilmektedir. Bilindiği üzere ayranın yapıldığı yoğurdun 100 gramında 175 mg kalsiyum bulunmaktadır. Kalsiyumla birlikte yoğurtta fosfor, iyot ve flor gibi tampon etkisi yapabilecek maddeler de bulunmaktadır. Suya kolaylıkla geçen karbondioksit, kalsiyum iyonu ile kolayca bikarbonat yapar. Bunun sonucunda birinci derecede etkili bir tampon sistemi kurulur (Erbengi, 1990).

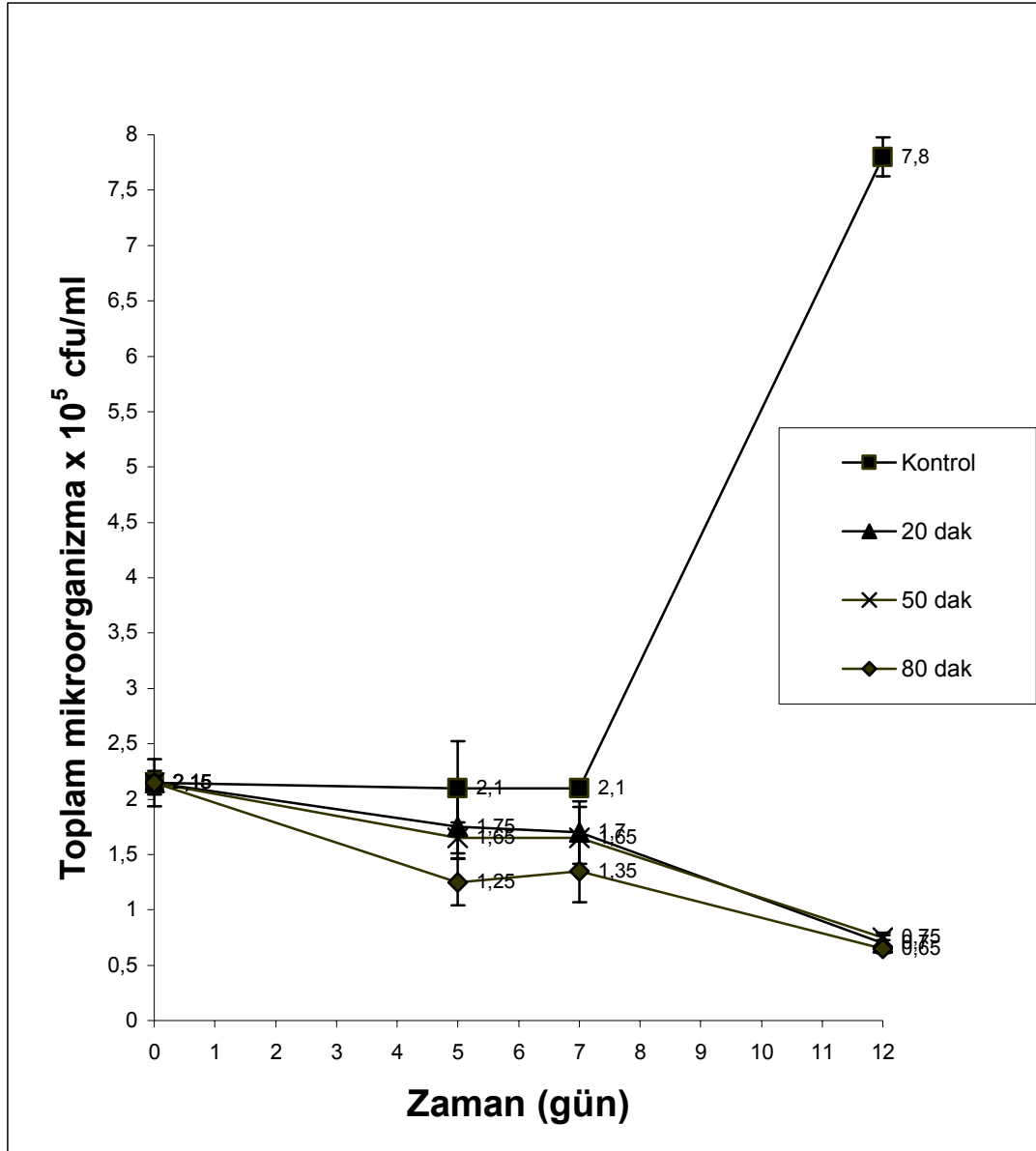
Bununla birlikte yoğurtun fermentasyonunda, laktattan fermentasyon sonucu laktik asit ve H^+ iyonu oluştuğu bilinmektedir. Karbondioksit uygulanan sıvı ortamlardaki kimyasal tepkimenin genel denkleminin aşağıda gösterildiği şekilde olduğu göz önüne alınırsa;



Fermantasyon sonucu ortaya çıkan H^+ iyonunun, karbondioksitli basınçla gelen H^+ iyonuyla iyice artarak tepkimenin geriye doğru işleyebilme ihtimali de mevcuttur. Ayranın pH değerinin düşmemesinin bir sebebinin de bu olduğu tahmin edilmektedir. Sonuç itibarıyla ayrana uygulanan basınçlı karbondioksit ortamın pH değerini düşürmemiş ve böylece düşük pH'ya dayanıklı *B. cereus*, *B. subtilis* ve *Candida* sayısında ilk aşamada herhangi bir inaktivasyon görülmemiştir. Fakat düşük pH'ya dirençli olmadığı bilinen *E. coli* ve *S. aureus* ile yapılan denemelerde basınçlı karbondioksit uygulamasından hemen sonra belirli bir inaktivasyon görülmüştür. Ayran ve gıda simulantı olarak kullanılan peptonlu su ile yapılan çalışmalar asidik ve alkali ortamların basınçlı karbondioksit uygulamasından sonraki pH değerinin belirlenmesi ile bu ortamlarda bulunan mikroorganizmaların basınçlı karbondioksit uygulamasından sonra olan inaktivasyonun kıyaslanmasına olanak tanımıştır.

4.2. Mikrobiyal İnaktivasyona Uygulama Zamanının Etkisi

Basınçlı karbondioksit uygulanan ayran örneklerinin uygulamalardan hemen sonra yapılan toplam mikroorganizma (*B. cereus*, *B. subtilis* ve *C. albicans*) sayımlarında örneklerdeki toplam mikroorganizma sayılarında herhangi bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. $+4^{\circ}C$ sıcaklıktaki soğuk odada bekletilen örneklerin 5, 7 ve 12 gün sonra yapılan toplam mikroorganizma sayımlarında örneklerdeki mikroorganizma sayısında azalma olduğu belirlenmiştir (Grafik 4.3).

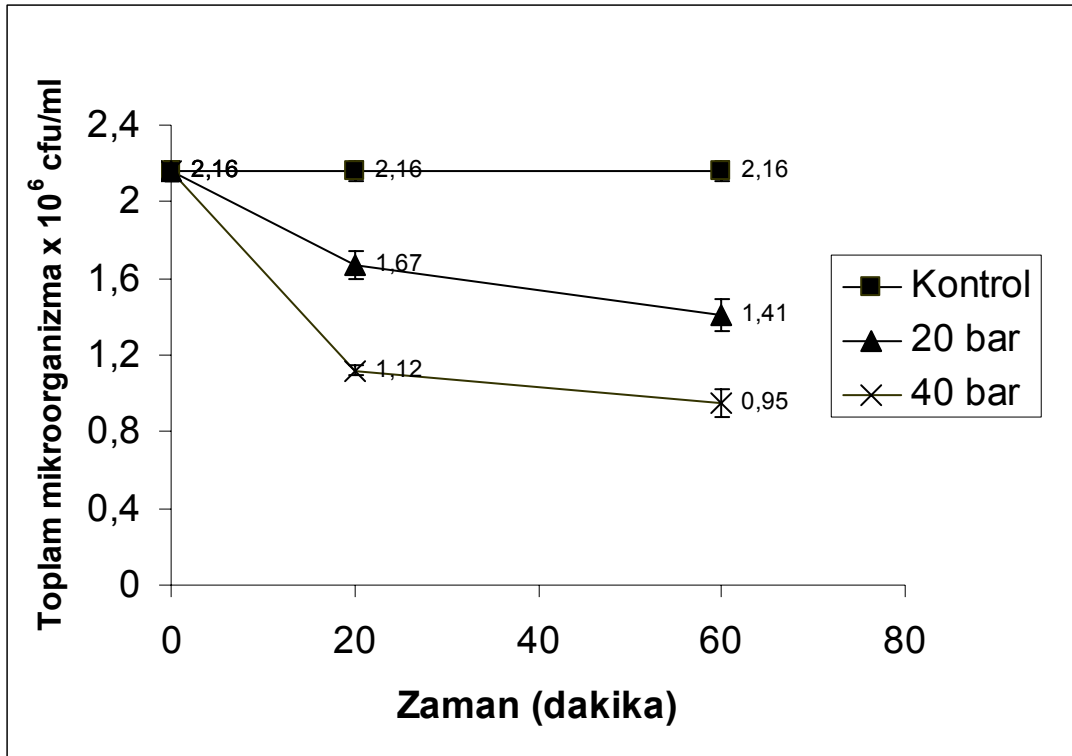


Grafik 4.3. 20⁰C sıcaklıkta ve 40 bar basınçta 20, 50 ve 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. albicans* içeren ayran örneklerinin muhafaza zamanına göre mikrobiyal yük değişimi.

Kontrol örneklerinin mikrobiyal yükü ilk günde $2,15 \times 10^5$ cfu/ml, 5. günde $2,10 \times 10^5$ cfu/ml, 7. günde $2,10 \times 10^5$ cfu/ml ve 12. günde $7,80 \times 10^5$ cfu/ml olmasına karşın, 20⁰C sıcaklık ve 40 bar basınç altında, 20 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde $2,15 \times 10^5$ cfu/ml, 5. günde $1,75 \times 10^5$ cfu/ml, 7. günde $1,70 \times 10^5$ cfu/ml ve 12. günde $7,00 \times 10^4$ cfu/ml olmuştur. Kontrol örneği ile 40 bar basınç altında 20 dakika tutulan ayran örneklerinin 5, 7 ve 12. günler arasındaki inaktivasyon değerlerinde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bir

değişiklik olduğu bulunmuştur. 20⁰C sıcaklık ve 40 bar basınç altında, 50 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde 2,15x10⁵ cfu/ml, 5. günde 1,65x10⁵ cfu/ml, 7. günde 1,65x10⁵ cfu/ml ve 12. günde 7,50x10⁴ cfu/ml olmuştur. Kontrol örneği ile 40 bar basınç altında 50 dakika tutulan ayran örneklerinin 5, 7 ve 12. günler arasındaki inaktivasyon değerlerinde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bir değişiklik olduğu tespit edilmiştir. 20⁰C sıcaklık ve 40 bar basınç altında, 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde 2,15x10⁵ cfu/ml, 5. günde 1,25x10⁵ cfu/ml, 7. günde 1,35x10⁵ cfu/ml ve 12. günde 6,50x10⁴ cfu/ml olmuştur. Kontrol örneği ile 40 bar basınç altında 80 dakika tutulan ayran örneklerinin 5, 7 ve 12. günler arasındaki inaktivasyon değerlerinde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bir değişiklik olduğu belirlenmiştir (Grafik 4.3). İnaktivasyon oranının uygulama süresine bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. 40 bar basınçta 20, 50 ve 80 dakika karbondioksit uygulanan ayranın mikrobiyal yükü 7. günden sonra belirgin bir şekilde azalmıştır. Karbondioksit uygulanan ayranın mikrobiyal yükünün karbondioksit uygulanmayan ayranın mikrobiyal yükünden 12. günde 12 kat daha düşük olduğu görülmüştür.

E. coli ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su ile yapılan denemelerde 20⁰C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınç altında 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin başlangıç mikrobiyal yükü 2,16x10⁶ cfu/ml seviyesinden 60 dakika sonunda 20 bar basınç uygulandığında 1,41x10⁶ cfu/ml seviyesine, 40 bar basınç uygulandığında ise 0,95x10⁶ cfu/ml seviyesine inmiştir. 20⁰C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınç altında 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin farklı uygulama zamanları arasındaki mikrobiyal yükünde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Grafik 4.4).



Grafik 4.4. 20⁰C sıcaklıkta 20 ve 60 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su örneklerinde karbondioksit temas zamanı ve karbondioksit basıncının mikrobiyal yüke etkisi.

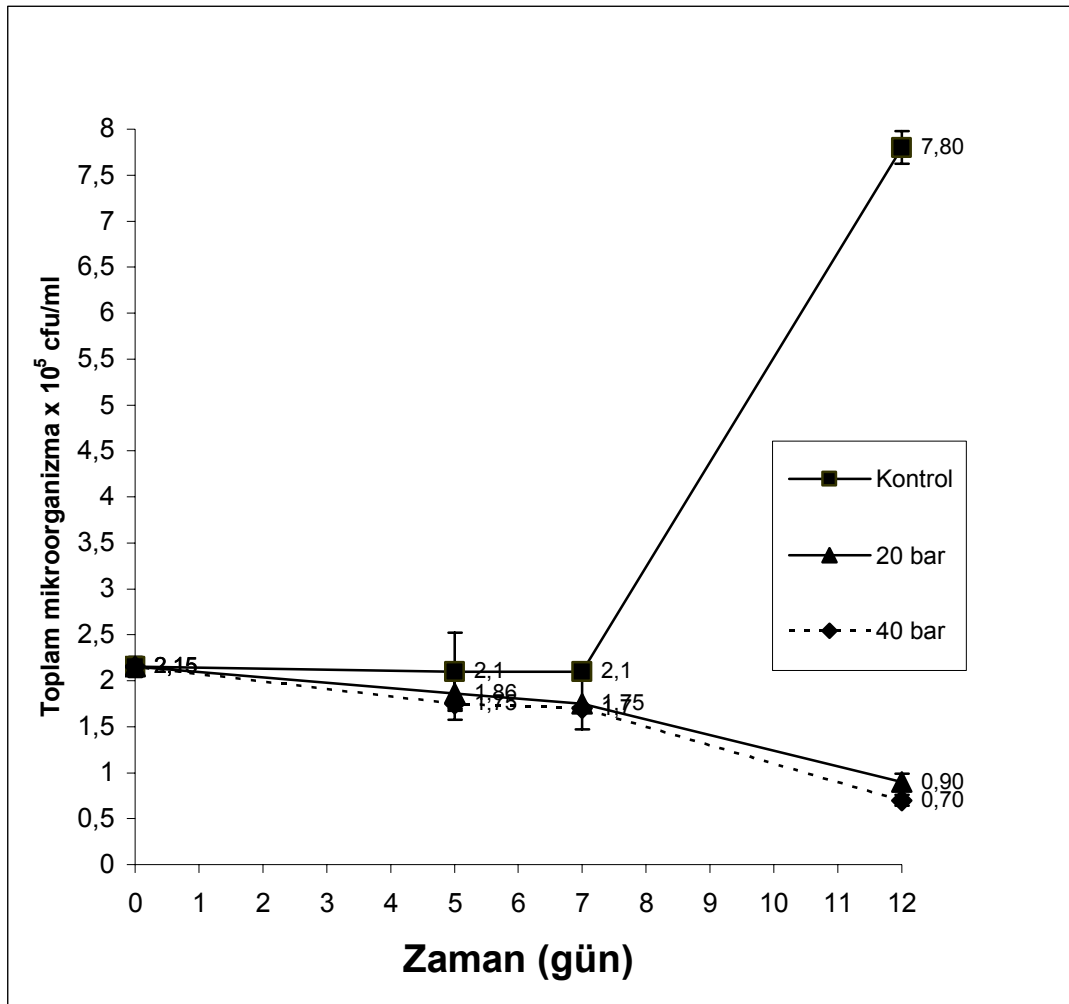
E. coli ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu suya basınçlı karbondioksit uygulamasında mikrobiyal azalmanın basınç ve uygulama zamanına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (Grafik 4.4). Erkmen (1996; 2000) basınçlı karbondioksit ile yaptığı inaktivasyon çalışmalarında uygulama zamanı arttıkça *E. coli* ve *L. monocytogenes*'in mikrobiyal inaktivasyonunun arttığı gözlemiştir. Yapılan bu tez çalışmasında 20⁰C sıcaklıkta, 20 ve 40 bar basınçlarda uygulama zamanı 20 dakikadan 60 dakikaya çıkarıldığında mikrobiyal inaktivasyonun yaklaşık 1,2 kat arttığını tespit edilmiştir. Tez çalışmasındaki bulgular da Erkmen (1996, 2000) tarafından bulunan sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

4.3. Mikrobiyal İnaktivasyona Karbondioksit

Basıncının Etkisi

Kontrol örneklerinin mikrobiyal yükü ilk günde $2,15 \times 10^5$ cfu/ml, 5. günde $2,10 \times 10^5$ cfu/ml, 7. günde $2,10 \times 10^5$ cfu/ml ve 12. günde $7,80 \times 10^5$ cfu/ml olmasına

karşın, 20⁰C sıcaklık ve 20 bar basınç altında, 20 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde 2,15x10⁵ cfu/ml, 5. günde 1,86x10⁵ cfu/ml, 7. günde 1,75x10⁵ cfu/ml ve 12. günde 9,00x10⁴ cfu/ml olmuştur (Grafik 4.5). Kontrol örneği ile 20 bar basınç altında 20 dakika tutulan ayran örneklerinin 5, 7 ve 12. günler arasındaki inaktivasyon değerlerinde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bir değişiklik olduğu bulunmuştur. 20⁰C sıcaklık ve 40 bar basınç altında, 20 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde 2,15x10⁵ cfu/ml, 5. günde 1,75x10⁵ cfu/ml, 7. günde 1,70x10⁵ cfu/ml ve 12. günde 7,00x10⁴ cfu/ml olmuştur. Kontrol örneği ile 40 bar basınç altında 20 dakika tutulan ayran örneklerinin 5, 7 ve 12. günler arasındaki inaktivasyon değerlerinde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bir değişiklik olduğu bulunmuştur.



Grafik 4.5. 20⁰C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınç altında, 20 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan *B. cereus*, *B. subtilis* ve *C. albicans* içeren ayranın muhafaza zamanına göre mikrobiyal yük değişimi.

E. coli ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su ile yapılan denemelerde 20°C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınç altında 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin başlangıç mikrobiyal yükü $2,16 \times 10^6$ cfu/ml seviyesinden 60 dakika sonunda 20 bar basınç uygulandığında $1,41 \times 10^6$ cfu/ml seviyesine 40 bar basınç uygulandığında ise $0,95 \times 10^6$ cfu/ml seviyesine inmiştir. 20°C sıcaklıkta 20 ve 40 bar basınç altında 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin farklı basınçlardaki mikrobiyal yükünde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Grafik 4.4).

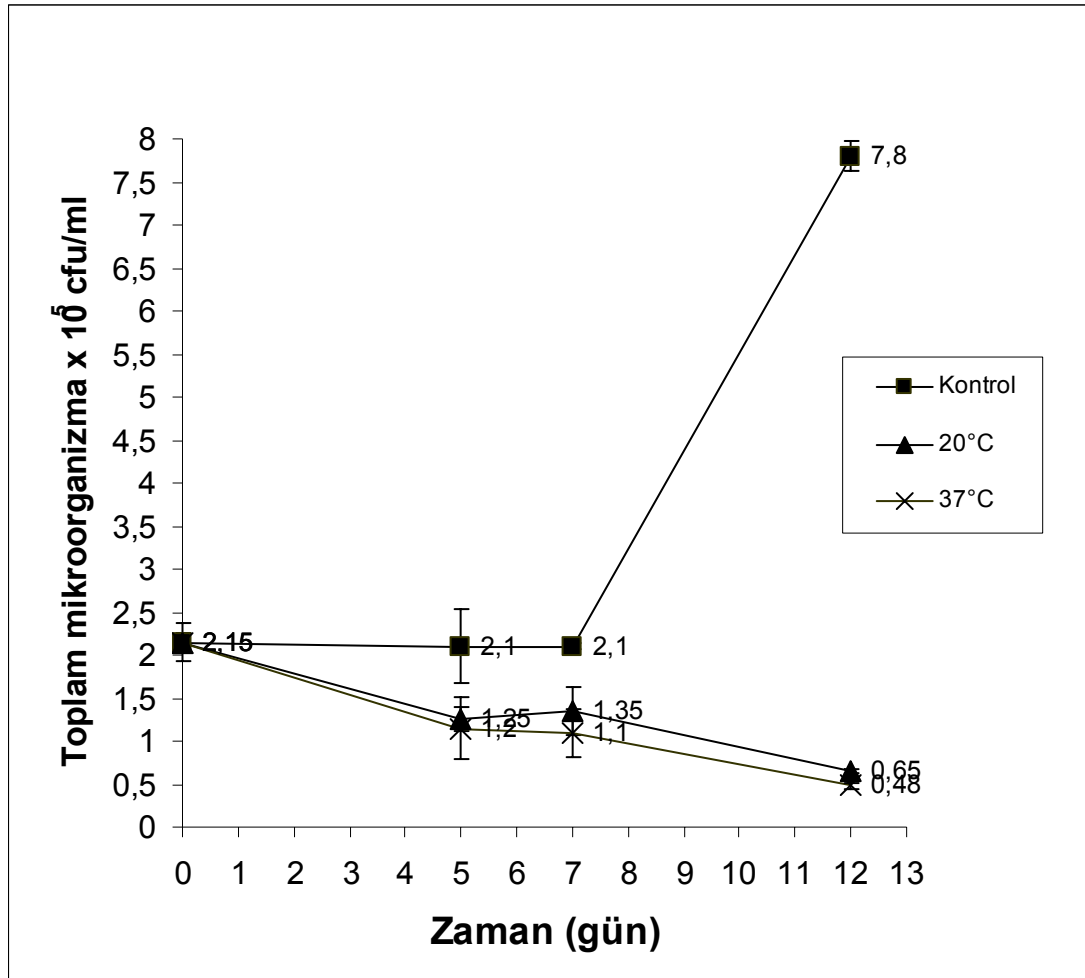
Erkmen (2000) brain heart infusion broth ortam içindeki *L. monocytogenes*'in 1.51 MPa basınçlı karbondioksit altında 55 dakika uygulanmasında azalmanın %15.9, 3.02 MPa basınçla 35 dakika tutulduğunda azalmanın %19.6 ve 6.05 MPa basınçta 25 dakika tutulduğunda ise azalmanın %21.9 olduğunu belirlemiştir. Aynı mikroorganizma fizyolojik tuzlu su ortam içinde 1.51 MPa basınçta 35 dakika tutulduğunda azalmanın %17.1, 3.02 MPa basınçta 25 dakika tutulduğunda azalmanın %20.5 ve 6.05 MPa basınçta 6 dakika tutulduğunda ise azalmanın %24.2 olduğu tespit edilmiştir (Erkmen, 2000).

Hong ve ark. (1997) yaptıkları basınçlı karbondioksit çalışmasında basıncı 20 kg/cm²'den 70 kg/cm²'e çıkardıklarında mikrobiyal inaktivasyonun arttığını tespit etmişlerdir. 30 kg/cm²'lik basınçlı karbondioksit uygulamasında 240 dakikada yaklaşık 3 log seviyesinde bir azalma tespit etmişler ki bu değer 70 kg/cm²'lik basınçlı karbondioksitin 140 dakika uygulamasından daha az bir mikrobiyal inaktivasyon sağlamıştır. Tüm bu çalışmalar aynı oranda mikrobiyal inaktivasyonun sağlanması için yüksek basınç kısa süre uygulamasının düşük basınç uzun süre uygulamasından daha etkili olduğunu göstermektedir. Basıncın artırılması karbondioksit ve ortam süspansiyonunun çözünürlüğünü artırarak karbondioksitin hücrelerle temas kurmasını kolaylaştırmakta ve sonuçta mikrobiyal inaktivasyon artmaktadır.

4.4. Mikrobiyal İnaktivasyona Sıcaklığın Etkisi

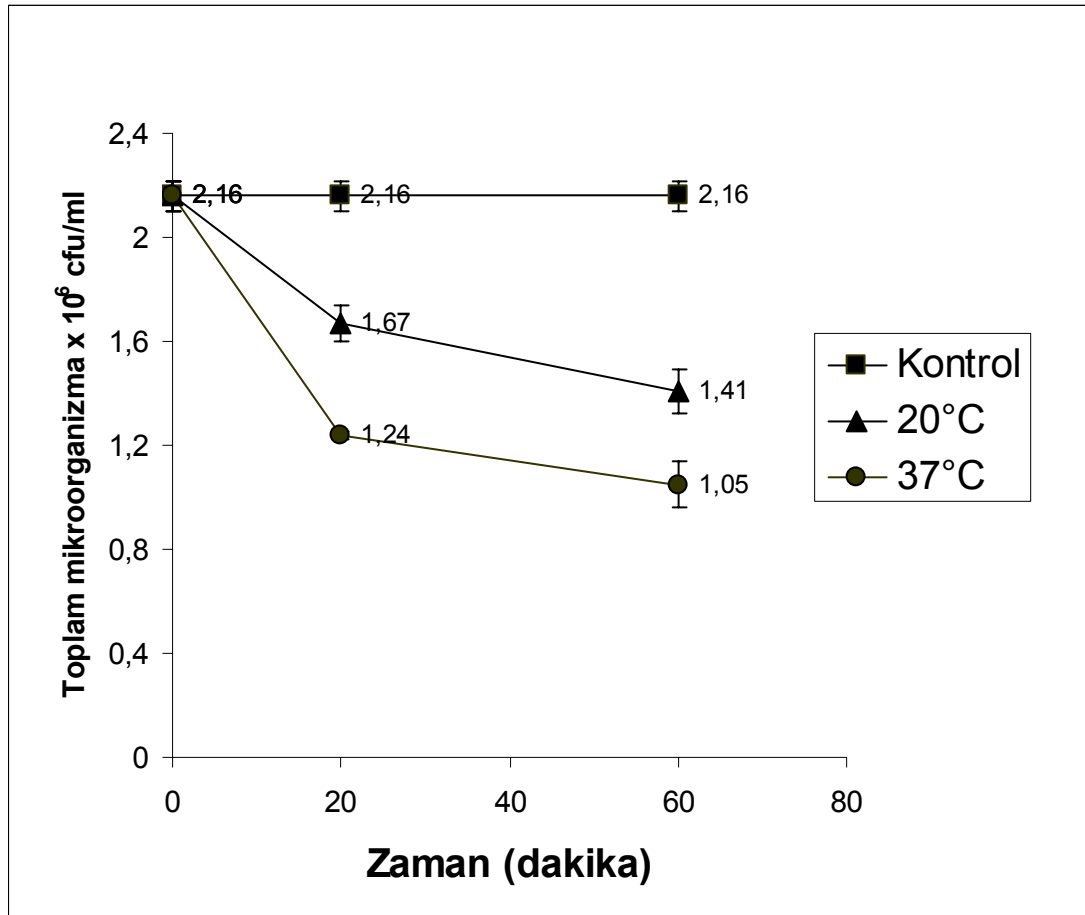
40 bar karbondioksit basıncı altında 80 dakika tutulan ayran örneklerinde ortam sıcaklığının artırılması ile mikrobiyal inaktivasyon da artmıştır (Grafik 4.6,

4.7, 4.8). Kontrol örneklerinin mikrobiyal yükü ilk günde $2,15 \times 10^5$ cfu/ml, 5. günde $2,10 \times 10^5$ cfu/ml, 7. günde $2,10 \times 10^5$ cfu/ml ve 12. günde $7,80 \times 10^5$ cfu/ml olmasına karşın, 20°C sıcaklık ve 40 bar basınç altında, 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde $2,15 \times 10^5$ cfu/ml, 5. günde $1,25 \times 10^5$ cfu/ml, 7. günde $1,35 \times 10^5$ cfu/ml ve 12. günde $6,50 \times 10^4$ cfu/ml olmuştur. 37°C sıcaklık ve 40 bar basınç altında, 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan ayranın mikrobiyal yükü ilk günde $2,15 \times 10^5$ cfu/ml, 5. günde $1,20 \times 10^5$ cfu/ml, 7. günde $1,10 \times 10^5$ cfu/ml ve 12. günde $4,80 \times 10^4$ cfu/ml olmuştur. 20°C ve 37°C sıcaklıkta 40 bar basınç altında 80 dakika tutulan ayran örneklerinin 5, 7 ve 12. günler arasındaki inaktivasyon değerlerinde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bir değişiklik olduğu bulunmuştur (Grafik 4.6).

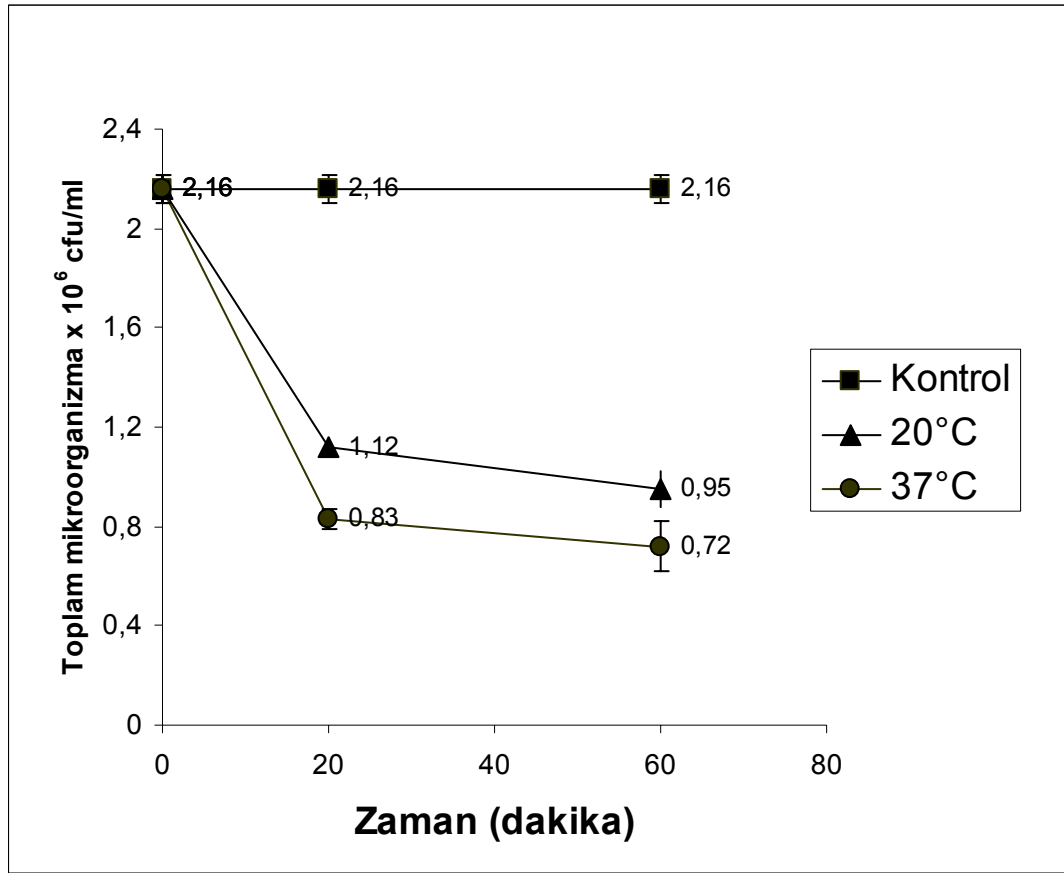


Grafik 4.6. 40 bar basınç altında 80 dakika karbondioksit gazına maruz bırakılan *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. albicans* içeren ayran örneklerinin muhafaza zamanına göre mikrobiyal yük değişimi.

E. coli ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su ile yapılan denemelerde 20°C ve 37°C sıcaklıkta 20 bar basınç altında 20 ve 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin başlangıç mikrobiyal yükü $2,16 \times 10^6$ cfu/ml seviyesinden 20 dakika sonunda $1,67 \times 10^6$ cfu/ml 60 dakika sonunda ise $1,41 \times 10^6$ cfu/ml seviyesine inmiştir. 20°C ve 37°C sıcaklıkta 40 bar basınç altında 20 ve 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin başlangıç mikrobiyal yükü $2,16 \times 10^6$ cfu/ml seviyesinden 20 dakika sonunda $1,24 \times 10^6$ cfu/ml 60 dakika sonunda ise $1,05 \times 10^6$ cfu/ml seviyesine inmiştir. 20 ve 40 bar basınç altında 20 ve 60 dakika süre ile karbondioksit uygulanan örneklerin 20°C ve 37°C sıcaklık değerlerindeki mikrobiyal yükünde $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Grafik 4.7 ve 4.8).



Grafik 4.7. 20 ve 37°C sıcaklıkta 20 bar basınç altında karbondioksit gazına maruz bırakma zamanının *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su örneklerinin mikrobiyal yüküne etkisi.



Grafik 4.8. 20 ve 37°C sıcaklıkta 40 bar basınç altında karbondioksit gazına maruz bırakma zamanının *E. coli* ATCC 8739 ve *S. aureus* ATCC 29213 içeren peptonlu su örneklerinin mikrobiyal yüküne etkisi.

Yapılan bu tez çalışmasında, sabit basınçta sıcaklık arttıkça mikrobiyal inaktivasyonun da arttığı tespit edilmiştir. Erkmen (2000) sabit basınç altında yaptığı inaktivasyon çalışmasında sıcaklığın artırılmasıyla *E. coli* inaktivasyonunun arttığı gözlenmiştir. 100 atm sabit basınçlı karbondioksit uygulamasında sıcaklığın 20°C'den 40°C'ye çıkarılmasıyla D değeri 8.08'den 4.90'a düşmüştür. Sıcaklığın karbondioksitin kütle transferini ve hücre zarındaki akışkanlığı artırarak karbondioksitin hücre içine girmesini kolaylaştırması mikrobiyal inaktivasyonu arttırmıştır. Hong ve ark. (1997) *Lactobacillus spp.*'nin basınçlı karbondioksit ile inaktivasyonunda sıcaklığın 20°C'den 50°C'ye çıkarılmasıyla mikrobiyal yükte önemli azalmalar olduğunu belirlemişlerdir.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında düşük pH değerine dayanıklı mikroorganizma içeren ve düşük pH değerine sahip ayran örneklerinde basınçlı karbondioksit uygulaması sonrası hızlı bir mikrobiyal inaktivasyon görülmemiştir. Bunun aksine düşük pH değerine dayanamayan mikroorganizma içeren ve yüksek pH değerine sahip peptonlu su örneklerinde basınçlı karbondioksit uygulaması sonrası hızlı bir mikrobiyal inaktivasyon görülmüştür. Ayran örneklerinde pH değerinin düşmemesi, peptonlu su örneklerinde ise pH değerinin basınçlı karbondioksit uygulaması sonunda aniden düşmesinin sebebi ayran içinde tampon etkisi yapabilecek maddelerin olması, peptonlu suyun ise alkali olması ve herhangi bir tampon madde içermemesi olduğu tahmin edilmektedir. Ayran içerisinde tampon etkisi yapabilecek yüksek miktarda kalsiyum bulunmaktadır. Suyu kolaylıkla geçen karbondioksit, kalsiyum iyonu ile kolayca bikarbonat yapmakta ve sonuçta birinci derecede etkili bir tampon sistemi kurulmaktadır (Erbengi, 1990). pH değerinin düşmemesinin bir diğer sebebi yoğurdun fermantasyonunda, laktattan fermantasyon sonucu laktik asit ve H^+ iyonu oluşması ve karbondioksit uygulanan sıvı ortamlardaki kimyasal tepkimenin, fermantasyon sonucu ortaya çıkan H^+ iyonunun, basınçlı karbondioksit ile oluşan H^+ iyonu ile iyice artarak tepkimenin geriye doğru işleyebileceği ihtimalidir. Ayranın pH değerinin düşmemesinin bir sebebinin de bu olduğu tahmin edilmektedir.

Basınçlı karbondioksit uygulamasında ortam pH değerinin düşürülmesi alkali mikroorganizmalar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ayran örneklerinde basınçlı karbondioksit uygulaması sonrası ani bir inaktivasyonun görülmemesi, 5, 7 ve 12 gün sonra inaktivasyonun görülmesi, uygulamanın bakterilerin biyolojik ve enzimatik yapısını bozduğunu, bu etkinin hemen mikroorganizmaları öldürmediği, biyolojik ve enzimatik yapısı bozulan mikroorganizmaların zamanla yaşamına devam edemediğini göstermektedir. Karbondioksit konsantrasyonunun hücre içine girince, hücrelerde öldürücü etki yaptığı, hücrelerin yapısını ve hücrenin biyolojik sistemlerinin dengesini bozduğu, hücre zarının fonksiyon ve yapısına zarar vererek enzimatik aktiviteleri inhibe etmesi sonucu inaktivasyonu sağladığı rapor edilmiştir (Lin et al., 1994). Ortamın fiziksel ve kimyasal özellikleri, pH ve peptidler, amino

asitler, şeker ve vitamin içeriği mikrobiyal inaktivasyonda etkilidir. Mikroorganizmaların basınca karşı olan direnci ortam bileşimine ve mikroorganizma tipine bağlıdır (Erkmen 1997; Haas et al., 1989; Lin et al., 1994). Yapılan bu çalışmada da ortam bileşiminin ve mikroorganizma tipinin mikrobiyal inaktivasyonda etkili olduğu belirlenmiştir.

Özetle düşük pH değerine sahip sıvı gıdalarda ve düşük pH değerine dayanıklı mikroorganizmalar üzerinde basınçlı karbondioksit uygulamasının hızlıca inaktivasyon etkisi gösteremediği, sistemin mikroorganizmaların biyolojik ve enzimatik yapısını bozarak ileriki süreçlerde bir inaktivasyon sağladığı, bunun aksine alkali ortam ve mikroorganizmaların basınçlı karbondioksit etkisiyle hızlıca inaktive olduğu görülmüştür.

Farklı sıcaklık, basınç ve uygulama zamanlarında yapılan bu tez çalışmasında sıcaklık, basınç ve uygulama zamanı arttıkça mikrobiyal inaktivasyonun da arttığı görülmüştür. Sabit basınç ve uygulama zamanında sıcaklığın 20°C sıcaklıktan 37°C sıcaklığa çıkarılmasıyla mikrobiyal yükte yaklaşık 1,5 kat kadar bir azalma görülmüştür. Hong ve ark. (1997) yüksek basınçlı karbondioksit uygulamasında genellikle basıncın artırılmasıyla inaktivasyonun arttığını belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada, Erkmen (2000) basınçlı karbondioksit uygulamasında, uygulama zamanı ve sıcaklığın artmasıyla mikrobiyal inaktivasyonun arttığını rapor etmiştir.

Gıda sanayinde pastörizasyon ve sterilizasyon amacıyla ısısal inaktivasyon, radyasyon ve kimyasal koruyucular sıklıkla kullanılmaktadır (Russell, 2001). Bu metodlardan en çok kullanılanı ısısal inaktivasyon veya ısıl işlem uygulamasıdır (Walker and LaGrange, 1991). Yüksek sıcaklık uygulamasıyla yapılan sterilizasyon gıdanın doğallığına, rengine ve tadına zarar vermektedir (Joslyn, 2001). Basınçlı karbondioksit uygulaması ise yüksek sıcaklığa ihtiyaç duymadığı için gıdanın doğallığına ve besin değerine zarar vermez.

Yapılan bu tez çalışmasında, basınçlı karbondioksit uygulamasının alkali sıvı gıdaların ısısal olmayan pastörizasyonunda kullanılabileceği belirlenmiştir. Basınçlı karbondioksit uygulamasının uzun süreli rafta kalacak asidik sıvı gıdalarda, zaman geçtikçe mikroorganizmaları inaktive ederek koruyucu etki oluşturduğu görülmüştür.

Bu sebeple, ısısal olmayan inaktivasyon yöntemlerinden birisi olan basınçlı karbondioksit uygulamasının özellikle sıvı gıdalarda zamanla gıda sanayinde halihazırda kullanılan pastörizasyon ve sterilizasyon uygulamalarının yerini alacağı tahmin edilmektedir.

Daha yüksek basınç değerlerinde daha iyi inaktivasyon neticeleri alınacağı açık olduğundan, işlemin daha yüksek basınçla yapılması tavsiye edilir. Ayrıca suda yapılan deneylerdeki inaktivasyonun daha yüksek olması sonucundan karbondioksit uygulanacak örneklerin su miktarının artırılması önerilebilir. Çünkü bu yolla örnekler içerisindeki katı parçacıkların mikroorganizmaların etrafını sararak koruyucu bir etki göstermesinin önüne geçilmiş olacaktır. Bu tez çalışmasında kullanılan basıncın düşük olması sebebiyle çok fazla bir mikrobiyal inaktivasyon sağlanamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Arreola, A. G., Balabana, M. O., Wei, C. I., Peplow, A., Marshall, M. And Cornell, J., 1991. Effect of supercritical carbon dioxide on microbial populations in single strength orange juice. *Journal of Food Quality*, 14, 275–284.
2. Ballestra, P., Silva, A. A. D. and Cuq, J. L., 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. *Journal of Food Science*, 61, 829-836.
3. Corwin, H., 2000. Department of Food Science and Technology, The Ohio State University.
4. Daniels, J. A., Krishnamurthi, R. and Rizvi, S. S. A., 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48, 532-537.
5. Dixon, N. M. and Kell, D. B., 1998. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 109–136.
6. Enomoto, A. et al., 1996. Lethal Effect of High-Pressure carbon dioxide on a Bacterial Spore, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 83, No. 3, 305-307.
7. Erbeni, T., 1990. *Biyoloji Ders Notları*, Güneş Kitabevi Yayınları, 4. Baskı, Ankara, S. 238.
8. Erkmen, O. Karaman, H., 2001. Kinetic studies on the high pressure carbon dioxide inactivation of *Salmonella typhimurium*, *Journal of Food Engineering* 50 25-28
9. Erkmen, O., 1996. *A Laboratory Manual in General Microbiology*. pp. 17-22, 56, 73. Gaziantep University of Gaziantep Press.
10. Erkmen, O., 1997. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Staphylococcus aureus* in broth and milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30, 826-829.
11. Erkmen, O., 2000. Antimicrobial effect of carbon dioxide on *Brochothrix thermosphacta* in broth and foods. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1365-1370.
12. Erkmen, O., 2000. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide. *Food Microbiology*, 17(2), 225-232.

13. Erkmen, O., 2001. Kinetic analysis of *Listeria monocytogenes* inactivation by high pressure carbon dioxide, *Journal of Food Engineering* 47, 7-10.
14. Fraser, D., 1951, Bursting bacteria by release of gas pressure. *Nature*, 167, 33-34.
15. Haas, G. J., Prescott, H. E., Dudley Jr, E., Dik, R., Hintlian, C. and Keane, L., 1989. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *Journal of Food Safety*, 9, 253-265.
16. Hata, C., Kumagai, H., and Nakamura, K., 1996. Rate analysis of the sterilization for microbial cells in high pressure carbon dioxide. *Food Science Technology Intitue*, 2.
17. Hitchins, A. D., Hartman, P. A. and Todd, E. C. D., 1992. Coliforms & *Escherichia coli* and its toxins. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd edn (Eds C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser), pp. 325-369. Washington, American Public Health Association, D.C.
18. Hong, S. I. and Pyun, Y. R., 1999. Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. *Journal of Food Science* 64, 728-733.
19. Hong, S. I., Park, W. S. and Pyun, Y. R., 1997. Inactivation of *Lactobacillus* sp. from Kimchi by high pressure carbon dioxide. *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie Food science technology* 30, 681-685.
20. Hutkins, R. W. and Nannen, N. L., 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 76, 2354-2365.
21. Isenschmid, A., Marison, I.W. and von Stockar, U., 1995. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells. *Journal of Biotechnology* 39, 229-237.
22. Joslyn, L. J., 2001. Sterilization by heat, p.695 -728. In S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*. Lea & Febiger, London, United Kingdom.
23. Kamihira, M., Taniguchi, M. And Kobayashi, T., 1987. Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 407-412.
24. Karaman H. and Erkmen O., 2001. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. *Food Microbiology*, 18, 11-16.
25. Lin, H. M., Yang, Z. And Chen, L. F., 1993. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *Chemical Engineering Journal*, 52, B29-B34.

26. Lin, H. M., Yang, Z. and Chen, L. F., 1992. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide. *Biotechnology Progress*, 8, 458–461.
27. Lin, H.-M., Cao, N. and Chen, L. F., 1994. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science* 59, 657-659.
28. Lin, H.-M., Chan, E.-C., Chen, C. And Chen, L.F., 1991. Disintegration of yeast cells by pressurized carbon dioxide. *Biotechnology Progress*, 7, 201-204.
29. Loss, C.-R. and Hotchkiss, J.-H., 2002. Effect of Dissolved Carbon Dioxide On Thermal Inactivation of Microorganisms in Milk. *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 12, Pages 1924-1929.
30. Louka et al., 1999. Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability, *Applied and Environmental Microbiology*. (65)2: 626-631; 20 ref.
31. McDonald, L. C., Fleming, H. P. And Hassan, H. M., 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2120–2124.
32. Mertens, B. and Knorr, D., 1992. Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technology*, 46, 124–133.
33. Nakamura, K., A. Enomoto, H. Fukuhisa, K. Nagai, and M. Hakoda., 1994. Disruption of microbial cells by the flash discharge of high-pressure carbon dioxide. *Bioscience Biological Sciences/Technology Biochemistry* 58:1297-1301.
34. Padan, E., Zilberstein, D. and Schuldiner, S., 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 650, 151–166.
35. Qui, X., Jia, M., Sharma, S., Tuhela, L. And Zhang, Q. H., 1998. An integrated PEF pilot for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice. *American Society of Agricultural Engineers*. 41(4):1069-1074
36. Russell, A. D., 2001. Principles of antimicrobial activity, p. 31-55. In S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*. Lea & Febiger, London, United Kingdom.
37. S. Fadiloğlu, Erkmen O., Şekeroğlu, G., 2004. Inactivation of Alkaline Phosphatase in Milk, *Food Technology. Biotechnology*. 42 (1) 27–32.
38. Sims, M., 2002. Continuous Sterilization of aqueous pumpable food using high pressure carbon dioxide, California, USA.
39. SPSS, 1999. Versiyon 10.0.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.

40. Walker, H. W., and W. S. LaGrange., 1991. Sanitation in food manufacturing operations, p.791 -801. In S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation. Lea & Febiger, London, United Kingdom.
41. Watanabe et al., 2003. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High Pressure Carbon Dioxide Treatment. Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa-shi, Kanagawa 252-8510, Japan.
42. Wei, C. I., Balaban, M. O., Fernando, S. Y. and Peplow, A. J., 1991. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. *Journal of Food Protection* 54, 189-193.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İskenderun'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İskenderun'da tamamladı. Üniversite eğitimine 1998 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı. 2002 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2003 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Şu anda Türkiye İş Kurumu İstanbul İl Müdürlüğü'nde görev yapmaktadır.