

***L. monocytogenes*' in SONİKASYONLA
İNAKTİVASYONUNA FARKLI AMPLİTÜD,
pH ve SICAKLIĞIN ETKİSİ**

Burçin DELİKARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat, 2006

**INFLUENCE of DIFFERENT AMPLITUDES,
pH and TEMPERATURES for INACTIVATION of
L. monocytogenes by SONICATION**

Burçin DELİKARA

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

Şubat, 2006

L. monocytogenes' in SONİKASYONLA
İNAKTİVASYONUNA FARKLI AMPLİTÜD,
pH ve SICAKLIĞIN ETKİSİ

Burçin DELİKARA

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

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Şubat, 2006

ÖZET

Artan tüketici talebi nedeniyle, pastörizasyon ve sterilizasyona alternatif olabilecek, gıda içeriği ve toplam gıda kalitesine etkisi az olan, yeni gıda üretim yöntemleri önem kazanmaktadır. Ultrasound yöntemi yada sonikasyon gıda endüstrisinde alternatif teknolojilerden birisidir. Ultrasound prosesi henüz başlangıç aşamasını yaşamaktadır, endüstriyel çapta teknoloji geliştirmek ve ultrasoundun gıda özellikleri üzerindeki etkisini tam olarak açıklamak için, pek çok çalışma yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *L. monocytogenes*' in sonikasyon uygulaması ile inaktivasyonu (20 kHz, dalga şiddeti 49.6 μm , 84.4 μm ve 99.2 μm), 20, 30, 40, 50 °C' de, sitrat tamponunda pH 3.0, 4.0, 5.0 ve 7.0' de çalışılmıştır.

Desimal redüksüyon zamanı (D değeri) verilen sıcaklık, pH ve amplitüdde canlı hücrelerin sayısını bir logaritmik birim azaltan yada populasyonun % 90 ını öldürebilmek için gerekli olan süre olarak hesaplanmıştır.

D değerleri arasındaki, değişkenlerden (sıcaklık, pH ve amplitüd) kaynaklanan farklılıkların önemliliğini belirlemek için Varyans Analizi yapılmıştır. D değerlerinin üzerine sıcaklık, pH ve amplitüd gibi faktörlerin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p= 0.00).

Ultrasonik dalga şiddeti arttıkça *L. monocytogenes* hücrelerinin dirençliliği azalmıştır. Ultrasonik dalga şiddeti 49.6 μm ve 99.2 μm (50 °C, pH 7.0) olduğunda D değerleri sırasıyla 0.63 ve 0.47 olmuştur.

Çalışılan sıcaklık aralığında, sıcaklıktaki düşüş *L. monocytogenes*' in duyarlılığını etkilemiştir. 30, 40 ve 50 °C' deki (pH 7.0, 99.2 μm) D değerleri sırasıyla 4.76, 2.83 ve 0.47 olarak belirlenmiştir.

pH 4.0, 5.0 ve 7.0 de (30 °C, 99.2 μm) yapılan denemelerde elde edilen D değerleri ise sırasıyla sırasıyla 1.90, 2.15 ve 4.76 olmuştur.

ABSTRACT

Alternative methods for pasteurization and sterilization are gaining importance, due to increased consumer demand for new methods of food processing that have a reduced impact on content and overall food quality. Ultrasound processing or sonication is one of the alternative technologies in the food industry. Ultrasonic processing is still in its infancy and requires a great deal of future research in order to develop the technology on industrial scale, and to more fully elucidate the effect of ultrasound on the properties of foods.

In this study, resistance of *L. monocytogenes* cells to action of ultrasound (20 kHz, wave amplitude 49.6 μm , 84.4 μm and 99.2 μm) was analyzed at 20, 30, 40, 50 °C in citrate buffer at pH 3.0, 4.0, 5.0 and 7.0.

Decimal reduction time (D) value was calculated as the time required to reduce the number of viable cells by one log cycle or the kill 90% of population at a given temperature, pH and sonic wave amplitude.

Variance analysis was performed to determine significance differences among D values due to the variables (temperature, pH value and amplitude). Affect of factors like temperature, pH and amplitude toward D values was statistically significant ($p=0.00$).

Resistance of *L. monocytogenes* cells decreased as ultrasonic wave amplitude increased. D values of cells were respectively 0.63 and 0.47 min. when ultrasonic wave amplitude used 49.6 μm and 99.2 μm (50 °C, pH 7.0).

In the temperature range investigated, the reduction of temperature affected sensitivity of bacteria. D values were for 30, 40 and 50 °C (pH 7.0, 99.2 μm) 4.76, 2.83 and 0.47 respectively .

D values obtained from experiments performed at pH 4.0, 5.0 and 7.0 were (30 °C, 99.2 μm) 1.90, 2.15 and 4.76 respectively.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince, deęerli yardımları ile alıőmamı yűnlendiren, her konuda yakın ilgi ve desteęini gűrdűđűm danıőman hocam Yrd. Do. Dr. Buket KUNDUHOĐLU ve yine çalıőmam sűresince yardımlarını esirgemeyen, bilgilerinden faydalandıęım Prof. Dr. Nafi OKSűYLER' e en içten teőekkűrlerimi sunarım.

Laboratuar alıőmalarımdaki katkılarından dolayı Dr. Sevil PİLATİN ve Dr. Ahmet ÇABUK' a çok teőekkűr ederim. Tez çalıőmamda bana yardımcı olan Senem İL, őahin YAŐAR ve Hasan VERGİLİ' ye teőekkűr ederim.

Eęitim ve űđretim hayatımın her dűneminde, bana emek veren, her an maddi ve manevi desteklerini hissettięim aileme gűnűlden teőekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Ultrasound	3
1.1.1. Ultrasound Uygulamalarını Etkileyen Faktörler	4
1.1.2. Mikrobiyal İnaktivasyon Mekanizması	5
1.2. Ultrasound Diğer Yöntemlerle Kombine Edildiğinde, Uygulamayı Etkileyen Faktörler	7
1.3. Betimleyici Mikrobiyoloji Ve Önemi	14
1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.4.1. Morfolojik, Kültürel Özellikleri ve Doğal Olarak Bulunduğu Yerler	19
1.4.2. Neden Olduğu Hastalıklar ve Enfeksiyon Dozu	20
1.4.3. Epidemiler ve Aracı Gıdalar	20
1.5. Beklenen Yararlar / Uygulamaya Aktarma / Ekonomiye Katkı	21
2. MATERYAL VE METOD	22
2.1. MATERYAL	22
2.1.1. Besiyerleri	22
2.1.2. Çözeltiler	23
2.1.3. Mc Farland No: 0.5 Bulanıklık Standardı	24

İÇİNDEKİLER (devam)

2.2. METODLAR	25
2.2.1. Test Organizması	25
2.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> Stok Kültürünün hazırlanması	25
2.2.3. Sonikasyon Denemeleri İçin <i>Listeria monocytogenes</i> Kültürü Hazırlığı	25
2.2.4. Çalışmada Kullanılan Sayım Yöntemi	26
2.2.5. İnaktivasyon denemelerinde Kullanılan Ultrasonic Processor' ün Özellikleri	26
2.2.6. Farklı Sonikasyon ve Sıcaklık Derecelerinde <i>Listeria</i> <i>monocytogenes'</i> in İnaktivasyonu	27
2.2.7. Farklı Sıcaklık Derecelerinde ve Farklı pH' larda <i>Listeria</i> <i>monocytogenes'</i> in İnaktivasyonu ve var/yok testi	29
2.2.8. Ultrasound, Farklı Sıcaklık Dereceleri ve Farklı pH kombinasyonunda <i>L. monocytogenes'</i> e ait İnaktivasyon Eğrileri Oluşturulması	30
2.2.9. İstatistiksel metodlar	31
3. BULGULAR	33
3.1. Sonikasyon işlemine sıcaklığının etkisi	33
3.2. Sonikasyonda kullanılan başlığın etkisi	34
3.3. Sonikasyon işlemi üzerine pH' ın etkisini belirlemek amacıyla yapılan ön çalışma	36
3.4. Sonikasyon Süresinin Etkisi	37
3.5. Farklı ortam koşullarının sonikasyon işlemi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan var/yok çalışmaları	38
3.6. Yapılan var/yok çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre seçilen sıcaklık, pH ve sonikasyon kombinasyonlarında yapılan inaktivasyon çalışmaları	41

İÇİNDEKİLER (devam)

3.6.1. Sonikasyon uygulanmaksızın, farklı sıcaklık ve pH' da yapılan inaktivasyon çalışması	41
3.6.2. % 40 amplitüdde, farklı sıcaklık ve pH' da yapılan sonikasyon çalışmaları	44
3.6.3. % 80 amplitüdde, farklı sıcaklık ve pH' da yapılan sonikasyon çalışmaları	46
4.TARTIŞMA	55
4.1. 100 ml' lik sonikasyon haznesinde 6 farklı sıcaklık kullanılarak, % 40 amplitüdde gerçekleştirilen sonikasyon işleminden elde edilen sonuçlar	55
4.2. Sonikasyon uygulamalarında kullanılan başlık tipinin <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu üzerindeki etkisi	55
4.3. İnaktivasyon çalışmalarında kullanılan farklı pH değerlerinin <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan ön çalışma	56
4.4. Kullanılan farklı sonikasyon şiddetinin (amplitüd) ve diğer ortam koşulları ile kombine edildiği çalışmaların <i>L. monocytogenes</i> ' in <i>D</i> değerleri üzerine etkisi	57
4.5. Farklı ortam koşulları ile birlikte uygulanan sonikasyon işlemleri arasında gözlenen benzerliklerin istatistiksel yorumu	58
5.SONUÇ	59
6.KAYNAKÇA	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1: Kullanılan problemlerin özellikleri	26
Çizelge 2: Denenen pH, sıcaklık ve sonikasyon kombinasyonları	30
Çizelge 3: Farklı sıcaklık derecelerinde, % 40 amplitüd kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrilerinin değerleri	34
Çizelge 4: Farklı iki sıcaklık derecesinde, % 40 amplitüde, iki farklı prob kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrilerinin değerleri	35
Çizelge 5: İki farklı sıcaklıkta, pH=4 ve pH=7' de % 40 sonikasyonun etkisi sonucu oluşan inaktivasyon eğrilerine ait değerler	37
Çizelge 6: Sonikasyon kullanılmadan, farklı sıcaklık ve pH' larda yapılan var/yok denemelerinin sonuçları.....	39
Çizelge 7: % 40 sonikasyon kullanılarak, farklı sıcaklık ve pH' larda yapılan var/yok denemelerinin sonuçları	40
Çizelge 8: % 80 sonikasyon kullanılarak, farklı sıcaklık ve pH' larda yapılan var/yok denemelerinin sonuçları	40
Çizelge 9: Farklı sonikasyon, farklı sıcaklık ve farklı pH kombinasyonlarından elde edilen regresyon denklemleri, determinasyon katsayıları ile bu denklemlerden hesaplanan D değerleri	49
Çizelge 10: Sıcaklık, pH ve sonikasyonun D değerleri ve bunların logaritmik çevrimleri üzerine kombine etkisinde kullanılan faktörler ve düzeyleri.....	50
Çizelge 11: D Değerlerine Ait Varyans Analizi	51
Çizelge 12: D Değerlerinin Logaritmik Çevrimlerinin Varyans Analizi	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Sonikasyon işleminin gerçekleştirilmiş olduğu düzenek	28
Şekil 2. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid prob	28
Şekil 3. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid prob'un uç kısmının yakından görünüşü	29
Şekil 4. Sonikasyon işleminde kullanılan stepped microtip	29
Şekil 5: Farklı sıcaklık derecelerinde, % 40 amplitüd kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrileri	33
Şekil 6. Farklı iki sıcaklık derecesinde, % 40 amplitüdde, iki farklı prob kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrileri	35
Şekil 7: İki farklı sıcaklıkta, pH=4, pH=7' de, 13 mm' lik prob kullanılarak yapılan % 40 sonikasyonun etkisi	36
Şekil 8: 20 °C' de ve pH=3' de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması	42
Şekil 9: 20 ve 30 °C' de ve pH=4' de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması	42
Şekil 10: 20, 30 ve 40 °C' de ve pH=5' de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması	43
Şekil 11: 20, 30, 40 ve 50 °C de ve pH=7 de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması	43
Şekil 12: 20 °C' de ve pH=3 'de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması	44
Şekil 13: 20 ve 30 °C' de ve pH= 4' de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması	44
Şekil 14: 20, 30 ve 40 °C' de ve pH= 5' de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması	45

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

- Şekil 15:** 20, 30, 40, 50 °C' de ve pH=7' de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması45
- Şekil 16:** 20 °C' de ve pH= 3' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması46
- Şekil 17:** 20 ve 30 °C' de ve pH= 4' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması46
- Şekil 18:** 20, 30 ve 40 °C' de ve pH= 5' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması47
- Şekil 19:** 20, 30, 40 ve 50 °C' de ve pH= 7' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması47
- Şekil 20:** Sonikasyonsuz ortamda farklı sıcaklık ve pH'nın *L. monocytogenes*' in *D* değerleri üzerine etkisi52
- Şekil 21:** %40 yoğunlukta sonikasyon uygulandığı ortamda farklı sıcaklık ve pH'nın *L. monocytogenes*' in *D* değerleri üzerine etkisi52
- Şekil 22:** %80 yoğunlukta sonikasyon uygulandığı ortamda farklı sıcaklık ve pH'nın *L. monocytogenes*' in *D* değerleri üzerine etkisi.....53
- Şekil 23:** pH 7' de *D* değerleri üzerine sıcaklık ve sonikasyonun birlikte etkisi53
- Şekil 24:** pH=5' de *D* değerleri üzerine sıcaklık ve sonikasyonun birlikte etkisi54

1. GİRİŞ

Günümüzde tüketiciler daha taze, besleyici değeri yüksek ve güvenli gıdalar kullanmak istemektedirler. Bu durum, gıdalardaki mikroorganizmaların ve enzimlerin inaktivasyonu için termal proseslere alternatif olabilecek, nontermal gıda koruma yöntemleri üzerinde çalışılması gereksinimini gündeme getirmiştir (Piyasena, et al., 2003).

Gıdaları sağlıklı ve güvenli kılmak, kayıpları en aza indirmek, dayanıklılığını artırmak üzere korumak gerekmektedir. Gıda koruma ve işlemede temel kavram; gıdanın ilk günlük tazeliğini bozmadan veya buna en yakın özelliklerle saklanabildiği süre olan raf ömrünü uzatmaktır. Bu da gıdanın bileşim ve karakter özelliklerinde istenmeyen yönde meydana gelebilecek bozulmaların önlenmesi ile gerçekleşebilir. Fiziksel ve kimyasal faktörlerle bozulmalar meydana gelmesine karşın mikrobiyal faktörlerle oluşan bozulmalar önemli bir yer tutmaktadır. Gıda maddelerinde mikrobiyal gelişimlerin baskılanması veya önlenmesi, bozulmaların engellenmesinde temel yaklaşımdır. Bozulma faktörlerini iç ve dış faktörler olarak özetlemek mümkündür. İç ve dış faktörleri mikrobiyal gelişme, çoğalma ve azalma için engel parametreler olarak tanımlayıp hedeflenen ürün eldesi için gerekli önlemleri almak temeldir (Özhan, 2000).

Mikroorganizmaların büyümelerine etki yapan en önemli faktörlerden birisi sıcaklıktır. Sıcaklık yaşayan organizmaları iki karşıt yönde etkileyebilir. Sıcaklık arttıkça hücredeki kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar artar ve hızlanır. Fakat belli bir sıcaklığın üzerinde proteinler, nükleik asitler ve diğer hücresel komponentler geri dönüşsüz bir hasara uğrayabilirler. Bu sebepten her mikroorganizma için gelişmenin görülmediği bir minimum sıcaklık, gelişmenin çok hızlı olduğu optimum sıcaklık ve gelişmenin mümkün olmadığı bir maksimum sıcaklık vardır. Mikroorganizmalar, sıcaklık istekleri göz önüne alınarak psikrofiller (0-20 °C arasında iyi büyüyenler), mezofiller (20-45 °C arasında iyi büyüyenler), ve termofiller (45-60 °C arasında iyi büyüyenler) olarak 3 grupta toplanırlar (Madigan ve ark., 1997 ; Öner, 1992).

Mikroorganizmalar kendi enzimatik faaliyetlerini, dolayısıyla yaşamsal faaliyetlerini normal olarak sürdürebilmek için buldukları ortam pH' sının da kendi

isteklerine uygun olmasını isterler. Ayrıca mikroorganizmanın faaliyeti sonucu ortam pH'sı değişir. Bu değişimi mikroorganizmalar hoşgörü ile karşılayamadıklarında faaliyetleri yavaşlar veya durur(Öner, 1992).

Gıdaların pH'sını düşüren ve organik asitler meydana getiren gıda imalat yöntemleri, gıdalarda mikrobik gelişimin önlenerek gıda güvenliğinin sağlanması açısından yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, bazı patojen mikroorganizmaların düşük pH'ya toleransları, düşük pH'lı gıdalarda canlı kalışları ve çok düşük pH'ın öldürücü etkisine dirençleri ortaya konmuştur. Bu yüzden, farklı gıdalardaki riskleri ve onların gelişimlerini geriletme veya kontrol altında tutmak için gereken çevre koşullarını mümkün olduğu kadar doğru belirlemek için mikroorganizmaların pH tepkilerini anlamak ve önceden bilebilmek önemlidir (Presser, et al., 1997).

Bazı mikroorganizmalar gıdalarda bozulmalara neden olarak onları tüketilemez hale getirmeleri nedeniyle ve bazı mikroorganizmalar da bozulmaya neden olsun veya olmasın patojen olmaları nedeniyle gıdalarda bulunmaları istenmez. Sonradan ortaya çıkan patojen gelişimi, gıda kaynaklı hastalık riskinin artmasına neden olmaktadır. Patojen mikroorganizmaların gıdalarda varlıkları çeşitli ayırma yöntemleri, ısı işlem, koruyucular, pH ve su aktivitesi gibi iç faktörlerin yardımı ile kontrol altında tutulmaya ve gıda güvenliği sağlanmaya çalışılır. Gıdalardaki mikroorganizmaları inaktive etmek için en çok kullanılan fiziksel yöntemler pastörizasyon ve sterilizasyondur. Termal proseslere alternatif olacağı düşünülen yöntemlerin, enerji gereksinimi az, dolayısıyla daha ekonomik ve çevreyle barışık, temiz enerji kaynakları olması gerekmektedir (Piyasena, et al., 2003). Gıda endüstrisinde nontermal işleme yaygın için bu teknolojilerin, geleneksel ya da şu anda kullanılan gıda koruma teknikleri ile bileşimi üzerinde çalışılmaktadır. "Hurdle technology" olarak bilinen bu yaklaşım gıda korumasındaki geleneksel tekniklerin kullanılmasında başarıyla uygulanmaktadır (Leistner and Gorris 1995). Gıda korumada termal proseslere alternatif olarak kullanılan nontermal proseslerden bazıları; pulse-electric field, pulse-light, mikrofiltrasyon, yüksek basınç ve ultrasonikasyondur. Son yıllarda gıda endüstrisi, ultrasonik dalgaların gıda işlemenin değişik aşamalarında kullanılabileceğini

keşfetmiştir. Ultrasonik dalgalar gıda endüstrisinde giderek artan sayıda uygulama alanları bulmuştur. Isıl işlemlerle birlikte uygulanarak, ısıl işlem süresi ve sıcaklığını düşürerek gıdaların sterilizasyon prosesini hızlandırmaktadır (Piyasena, et al., 2003).

Ultrasoundun pastörizasyona olan avantajı; lezzet kaybını (özellikle tatlı meyve sularında) minimuma indirmesi ve dikkate değer bir enerji tasarrufu sağlamasıdır. Ultrasound bir gıda muhafaza yöntemi olarak kullanılacaksa, sıcaklık (termal işlemde kullanılan düzeyin altında) gibi diğer fiziksel yöntemlerle kombine olarak uygulanması işlemin verimliliğini artırmaktadır. Ayrıca ısıtma, ekstrem pH ve klorlama gibi diğer dekontaminasyon teknikleriyle birlikte kullanıldığında mikroorganizma inaktivasyonu daha verimli olmaktadır (Piyasena et al., 2003).

Ultrasonik uygulamalarda, mikrobiyal inaktivasyon verimliliğini; mikroorganizma türü, gıdanın kompozisyonu gibi pek çok faktör etkilemektedir. Son yıllarda ultrasonik uygulamalar üzerinde bu faktörlerin etkisi üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır, ancak bunların betimleyici matematiksel modeller ile tanımlanması üzerinde fazla çalışma yoktur. FDA(Food and Drug Administration), ultrasonik uygulamaların gıdalar için ümit vadeden bir muhafaza yöntemi olduğunu, ancak uygulanabilirliği açısından araştırmaların artırılması gerektiğini bildirmektedir (Anonymus, 2000).

Bu çalışmada ultrasonik titreşimlerin *Listeria monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisi, çeşitli sıcaklık dereceleri ve pH değerleri ile kombine edilerek incelenecektir. Kullanılan inaktivasyon yöntemlerinden elde edilen sonuçlar betimleyici matematiksel modellerle açıklanacaktır. Elde edilen bu temel verilerin gıda güvenliği, betimleyici mikrobiyoloji, ürün geliştirme gibi alanlarda çok yararlı olacağı düşünülmektedir.

1.1. Ultrasound

Ders kitapları ultrasound'u saniyede 20.000 ve daha üzerinde titreşim veren ses dalgalarıyla oluşan enerji olarak tanımlamaktadır. En basit tanımlama ile "frekansı 20 kHz yada daha fazla olan ses dalgalarıdır" (Butz and Tauscher, 2002). Genellikle ultrasound cihazları 20 kHz-10 MHz lik frekanslarda kullanılmaktadır. Gıda

proseslerinin mikroorganizma inaktivasyonu amacıyla kullandığı kavitasyon yapan “Power Ultrasound” (20-100 kHz) dur (Piyasena et al., 2003).

Ultrasonik dalgalar anne karnındaki fetüsün gelişiminin görüntülenmesine benzer şekilde sebzelerin ve meyvelerin gizli çürüklerinin ve iç kalitelerinin ürüne zarar vermeden test edilebilmesi amacıyla da kullanılmaktadır(Mizrach, et al., 1994). Floros and Liang (1994) gıda üretimi ve işlenmesinde düşük şiddetli ve yüksek frekanslı ultrasoundun kullanılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu endüstriyel beklentiler; tekstür, viskozite ve bir çok katı yada sıvı gıdaların konsantrasyon ölçümlerini; sebze-meyve, et, yumurta, süt ve diğer gıdaların bileşimlerinin belirlenmesini, akış düzeyi ve sıcaklık ölçümlerini, ambalajlanmış gıdalara ve yumurta kabuklarına zarar vermeden kontrol edilebilmesini kapsamaktadır.

Floros ve Liang (1994) aynı zamanda yüzeylerin temizlenmesi, kurutma ve filtrasyon, mikroorganizmaların ve enzimlerin inaktivasyonu, hücre tahribatı, sıvılardan gazların ayrıştırılması, ısı transferi ve ekstraksiyon proseslerinin hızlandırılması ve difüzyona bağlı herhangi bir prosesin geliştirilmesi gibi gelişimleri de listelemiştir.

Tüm bunlar açıkça göstermektedir ki; ultrasound teknolojisinin, gıda endüstrisindeki uygulamaları bugün ve gelecekte oldukça büyük bir çeşitlilik göstermektedir.

1.1.1. Ultrasound Uygulamalarını Etkileyen Faktörler

- Ultrasonik dalgaların büyüklüğü (amplitüdü)
- Mikroorganizma ile temas/etki süresi
- Mikroorganizma türü
- Gıdanın kompozisyonu
- Uygulama sıcaklığı

Eğer ultrasound diğer yöntemler ile birlikte uygulanacaksa bu metodlarla ilgili diğer faktörler de hesaba katılmalıdır.

1.1.2. Mikrobiyal İnaktivasyon Mekanizması

Genel olarak, mikrobiyal inaktivasyon amacıyla ultrasound kullanımı üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Vejetatif bakterilerin inaktivasyonunun mekanizması hücreler arası boşlukların olması ile meydana çıkmaktadır. Maksimum etki hücrelerin parçalanmasıyla sonuçlanır. Sporlar için mekanizma açıkça belli değildir. Kaviteasyon (boşluk oluşumu) belki rol oynayabilir, ama bir yardımcı gerekmektedir, çünkü ultrasound'un tek başına sporlar üzerine bir etkisi yoktur. Diğer uygulamaların sporların inaktivasyonu üzerine temel bir etkisi vardır. Diğer teknikler ile birlikte ultrasound kullanıldığı zaman inaktivasyon mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Aynı zamanda ultrasoundun zarara neden olup olmadığı ve diğer inaktivasyon metotları ile kombinasyon halindeki ultrasound ile kullanımda olan depolama yöntemlerinin kullanılıp kullanılmayacağı ve üretim çeşitliliği üzerine etkisi olup olmayacağı da açıklığa tam olarak kavuşmamıştır (Anonymus, 2000).

Ultrasound halihazırda kullanılan gıda muhafaza yöntemlerinin etkinliğinin artırılması açısından bir potansiyele sahiptir. Ancak, mikroorganizmaların ultrasonik metotlarla inaktivasyonu konusunda hiçbir matematiksel metot formüle edilmemiştir (Anonymus, 2000).

Gıda üreticileri, son ürünlerdeki bakteriyel yükü minimize edebilmek için hammaddedeki kontaminasyonu minimuma indirmek, gıdada bulunabilecek tüm mikroorganizmaları inaktive etmek ve inaktive olmayan mikrobiyal populasyonların gelişmesini önleyecek tedbirler almak zorundadırlar. Bakteriyel inaktivasyon için kullanılan klasik uygulamalar ısı işlemlerdir (ör: pastörizasyon, ultra high temperature-UHT). Ancak bu tür işlemler, ısı işlem süresi ve sıcaklığına bağlı olarak, gıdanın besin değeri ve genel özelliklerinde istenmeyen değişimler meydana getirebilmektedir (Piyasena et al., 2003).

Ultrasoundun bakterisidal etkisi intasellüler kaviteasyon ile ilgilidir (Huges and Nyborg, 1962). Ultrasonikasyon sırasında mikroskopik baloncukların oluşumu ve patlamasıyla oluşan mekanik şok ile, hücredeki yapısal ve fonksiyonel komponentler

parçalanmakta ve hücrenin lizisine neden olmaktadır. Mikroorganizma hücrelerinden hücrel materyal ekstraksiyonu için, ultrasoundla hücre lizisi iyi bilinen bir laboratuvar metodudur (Skauen, 1976). Stumpf ve ark. (1946), ultrasonik yöntemle bir çok bakteriden verimli ve aseptik hücresiz enzim ekstraktları elde etmiştir.

Ultrasound ile yapılan inaktivasyon, vejetatif hücre lizisleri için oldukça verimlidir, ancak aynı durum sporlar için söz konusu değildir. Ultrasound tek başına sporlar üzerine çok etkili değildir. Spor inaktivasyonunda ultrasoundla birlikte kullanılacak diğer fiziksel yöntemler, inaktivasyondaki başarı oranını arttıracaktır. Laboratuvarda lizis çalışmaları genel olarak şu şekilde yapılır; mikroorganizma küçük hacimli bir tamponda süspansiyon edilir, süspansiyonun içine konduğu reaksiyon kabı bir buz kutusuna yerleştirilerek sıcaklık kontrol altında tutulur ve sonikatörün probu mikroorganizma süspansiyonunun içine daldırılarak sonikasyon işlemi yapılır. Bu şekilde yapılan lizis uygulamalarında, süspansiyondaki lizis verimi %100'ye yaklaşmaktadır (Anonymus, 2000).

Endüstriyel çapta gıda işlemede ultrasonifikasyonun mikrobiyal inaktivasyon amaçlı kullanımında ise, mikrobiyal lizisin verimini düşüren çeşitli kritik faktörlerin kontrolü tam olarak sağlanamadığı için, bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Ayrıca gıda içindeki bakteri hücreleri yada sporları, ultrasonik inaktivasyona, süspansiyon halde olduklarından daha dirençlidirler. Gıdaların pek çoğunun heterojen yapıda olması, çok farklı bileşimlerde olabilmeleri nedeniyle, ultrasonik dalgaların mikroorganizmaları inaktive etmede bir koruma yöntemi olarak tek başına kullanımını ciddi bir şekilde kısıtlamaktadır. Bu kısıtlamalara rağmen ultrasoundun diğer koruma yöntemleri ile birlikte kullanımı (sıcaklık, yüksek basınç), endüstriyel uygulamalar için büyük bir potansiyel oluşturmaktadır (Anonymus, 2000).

Yapılan incelemeler sonucunda, gıdalarda ultrasound kullanılarak yapılan mikrobiyal inaktivasyon çalışmalarının büyük bir bölümü tampon çözeltiler ve besiyerlerinde denenmiştir. Gıdalarda yapılan benzer çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. Aynı eksiklik kinetik veriler oluşturma konusunda da mevcuttur.

1.2. Ultrasound Diğer Yöntemlerle Kombine Edildiğinde, Uygulamayı Etkileyen Faktörler

McClements (1995) ultrasound ile mikroorganizma inaktivasyonunda klorlama, ekstrem pH kullanımı ve kaynatma gibi diğer dekontaminasyon tekniklerinin birlikte kullanılmasının da inaktivasyon verimini arttırdığını ileri sürmüştür.

Daha önce de belirtildiği gibi ultrasonikasyonla bakteri inaktivasyonundaki başarı türe göre değişmektedir. *L. monocytogenes*, çeşitli *Salmonella* şuşları, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* gibi bakterilerle ultrasonifikasyon denemeleri yapılmıştır.

L. monocytogenes' in ultrasoundla kombine edilen yöntemlerle (sıcaklık ve basınç uygulaması) inaktive edilebildiğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Ultrasonikasyon (20 kHz, 117 µm amplitud) değişik sıcaklıklarla (62-68 °C) birlikte uygulandığında, farklı sıcaklık uygulamasının, daha önce sıcaklık şoku uygulanmış (180 dk, 45°C'de) *L. monocytogenes*' in inaktivasyonunda etkili sinerjistik bir etki görülmüştür (Pagan et al., 1999a). *L. monocytogenes* için desimal redüksüyon süresini (belirli bir sıcaklıkta bakterileri populasyonunun % 90' ını inaktive etmek yada öldürmek için gerekli süre = *D* değeri) 4.3 dakika olarak belirlemişlerdir. Sonikasyon uygulaması 200 kPa' lık bir basınç ile birlikte uygulandığında *D* değeri 1.5. dakikaya inmiştir. Basınç 400 kPa' a yükseldiğinde ise *D* değeri 1.0 dakika olmuştur. 50 °C' ye kadar olan sıcaklıklarda belirgin bir etki artışı gözlenmezken, 50 °C' nin üzerinde dikkate değer bir artış elde etmişlerdir. Yapılan denemede, 20 kHz, 117 µm amplitud 64 °C, 200 kPa' lık bir basınç uygulandığında *L. monocytogenes* için *D* değeri 0.34 dakika olmuştur (Pagan et al., 1999b).

Literatür incelemeleri sonucunda, ultrasound kullanılarak, kümes hayvanlarının etleri ve süt gibi hayvansal kaynaklı çabuk bozulan besinlerdeki gram-negatif patojenlerin inaktivasyonunun hedef alındığı gözlenmiştir (Lilliard 1994). Bu tür çalışmalarda uygulama çoğunlukla sıvı besin ortamlarında olmuştur. Örneğin Lee ve ark. (1989) peptonlu su içindeki *Salmonella* populasyonunu, 10 dakika süreyle ultrasound ile muamele etmişler ve yaklaşık olarak 4 logaritmik devirlik bir inaktivasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bununla beraber çikolatalı süt içindeki

Salmonella sayısı 30 dakikalık bir muamele ile yalnızca 0,8 logaritmik devir düşürülebilmektedir, bu durumda çikolatalı sütün mikrobiyal inaktivasyona karşı önemli bir koruma gösterdiği kabul edilir.

Bir başka araştırmada tavuk eti derisindeki mikrobiyal popülasyon azalışı, sonikasyon ve klorlama yöntemi bir arada ve tek tek uygulanarak test edilmiştir. Çalışma sonunda, sonikasyonun klorlu suda yapıldığı denemelerde bakteriyal popülasyondaki azalma daha dikkate değer bulunmuştur (Lillard, 1993; Lillard, 1994). 0.5 ppm klor içeren solüsyonda ultrasonik dalgalara maruz bırakılan tavuk örneklerindeki bakteriyal popülasyon, sonikasyona maruz bırakılmamış örneklere göre daha fazla azalmıştır. Benzer sonuçlar, pH = 2 - 4 ve 0.5 için %1 laktik asit ile birlikte ultrasonik enerjinin 2-3.5 dakika uygulamasından önce ve sonra tavuk bageçleri fırına sokulup çıkarıldığı zamanda elde edilmiştir. 0.7 ve 15 dakika sonra aerobik plaklardaki sayımlar, ultrasonifikasyonun çok önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir (Sams and Fera 1991).

Marulda power ultrasoundla yapılan bir çalışmada (32-40 kHz), klorun *S. typhimurium*' un inaktivasyonu arttırdığı belirlenmiştir (Seymour et al., 2002).

Wrigley ve Llorca (1992) Brain Heart Infusion Broth, Skim Milk ve sıvı yumurtada ultrasonikasyon ile *S. typhimurium*' un inaktivasyonunu çalışmışlardır. Brain Heart Infusion Broth' da, *S. typhimurium*' u 30 dakika süreyle farklı sıcaklıklarda sonikasyona bırakmışlar ve hücre sayısındaki azalma 40 °C' de 3 logaritmik birim, 20 °C' de ise 1 logaritmik birim olmuştur. Skim Milkte 30 dakikalık sonikasyon 50 ve 40 °C' de uygulanmış ve hücre sayısındaki azalma sırasıyla 3.0 ve 2.5 logaritmik birim olmuştur. Sıvı yumurtada ise hücreler bu uygulamaya daha dirençli olmuş ve 30 dakikalık sonikasyon 50 °C' de uygulandığında maksimum bakteri inaktivasyonu <1 logaritmik birim olmuştur. Araştırmacılar, yüksek viskozitenin mikroorganizmayı kaviteasyonun inhibitör etkisinden koruyan bir etki yarattığını belirtmişlerdir. Hülsen' de (1999), sıvı yumurtanın oldukça yüksek olan viskozitesinin kaviteasyonu azalttığını belirtmiştir.

Ordonez ve ark. (1984) *Streptococcus faecium* ve *S. durans*'ın inaktive edilmesi için 5-62 °C' ye kadar geniş bir sıcaklık aralığında, 20 kHz/160 W ultrasound'u kombine bir şekilde kullanmıştır. Sıcaklık ile birlikte ultrasound kullanıldığında, iki

yöntemin ayrı ayrı kullanımından daha fazla etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yalnızca sıcaklık uygulaması ile yapılan denemeye karşılaştırıldığında, sıcaklık ve ultrasound'un birlikte kullanılması, termodurik enterokokların popülasyonunu yaklaşık 1 logaritmik devir daha fazla azaltmıştır. Araştırmacılar bu çalışmayı; 0,1 M dimetilglutarik asit tamponunda (pH= 6.6) gerçekleştirmişlerdir. Yöntem gıda içinde test edilmemiş olsa da, ultrasound kullanımı ile süt pastörizasyonu yapıldığında sıcaklık ve zamandan tasarruf sağlanacağını bildirmişlerdir.

Ultrasound uygulamasının su ortamındaki *E. coli* üzerine etkisi (24 kHz ve değişik amplitudlerde) Scherba ve ark. (1991) tarafından araştırılmıştır. Uygulama süresinin artmasına paralel olarak bakteriyal popülasyondaki azalmada artış olmuştur. Ultrasonikasyon şiddetinin ise popülasyon sayısını etkilemediğini bildirmişlerdir.

Ultrasonikasyonla süspansiyon haldeki *E. coli*' nin, süspansiyondan ayrılarak konsantre edilebildiği de keşfedilmiştir (Miles et al., 1995). *E. coli* hücreleri (6×10^7 cfu/ml) %1' lik süt içeren küvette süspansiyon edilmiş ve 2.05 MHz ve 360 kPa' da 3 dakika sonikasyona maruz bırakılmıştır. Bakterilerin süspansiyondan ayrılışı küvette gri renkli bantların oluşması ile gözlenmiştir. Hücrelerin bu şekilde süspansiyondan ayrılması konusunda birbiriyle çelişen farklı teoriler ortaya konulmuştur.

Limaye ve Coakley (1998), *E. coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*' yi 1 ve 3 MHz' lik sonikasyona tabi tutmuşlar ve hücrelerin % 95.5'i sırasıyla 4.5 ve 11.5 dakikada süspansiyondan ayrılmıştır.

Diğer bir çalışmada *E. coli*' ye uygulanan, 700 kHz lik sonikasyon işlemi üzerine, sıcaklık ve pH'nın etkisi araştırılmıştır. *E. coli*, başlangıç sıcaklığı 32 °C olan tuzlu suda süspansiyon edildiğinde 10 ve 30 dakika için canlı kalan hücrelerin oranı sırasıyla, % 0.83 ve % 0.2 olmuştur. Başlangıç sıcaklığı 17 °C olan tuzlu suda süspansiyon edildiğinde ise 10 ve 30 dakika için canlı kalan hücrelerin oranı sırasıyla % 37.86 ve % 8.1 olmuştur. Aynı uygulama sütte yapıldığında hiç inaktivasyon gözlenmemiştir. Süte % 10 oranında portakal suyu eklenerek, pH ları 2.6 ve 5.6 ya ayarlanmış ve canlı kalan hücrelerin oranı sırasıyla % 0.3 ve % 100 olmuştur (Piyasana et al., 2003).

Biyofilmlerdeki *E. coli*' nin inaktivasyonu için ultrasound kullanımının da gıda ve su endüstrileri için yararlı olabileceği düşünülmektedir. Johnson ve ark. (1998), 70 kHz'lik ultrasonikasyon işlemi ile birlikte gentamicin sulfatı kullanıldığında,

biyofilmdeki *E. coli* sayısının iki saat içinde % 97' ye varan oranlarda azaldığını rapor etmiştir.

Bacillus subtilis ile yapılan inaktivasyon çalışmalarında da oldukça verimli antimikrobiyal aktiviteler belirlenmiştir. Sıcaklık ve ultrasonikasyonun *B. subtilis* sporları (niger-40 ve ATCC 6051 suşları) üzerindeki inaktivasyonu üç farklı ortamda (distile su, süt ve gliserolde) test edilmiştir. Termosonikasyon uygulaması 100 °C' de yapıldığında, her iki suşun süt ve gliseroldeki *D* değerlerindeki azalma; gliserolde % 63 (niger-40) ve % 74 (ATCC 6051), sütte % 79 (niger-40) ve % 40 (ATCC 6051) olmuştur. Sudaki termosonikasyon işlemi sonunda sporların ısıya dirençlerindeki azalma 70 ve 95 °C' lerde, % 70-% 99.9 arasında olmuştur(Garcia et al., 1989).

Sıcaklık, amplitud ve basıncın *Yersinia enterocolitica* üzerindeki etkisi Raso ve ark. (1998) tarafından çalışılmıştır. Amplitüdün 150 µm ' ye yükseltilmesiyle (30 °C' de ve 200kPa) *D* değerinin 4 dakikadan 0.37 dakikaya düştüğü belirlenmiştir. Basıncın 0' dan 600 kPa' a yükseltilmesiyle (30 °C' de ve 150 µm) *D* değeri 1.52' den 0.2 dakikaya düşmüştür. 58 °C' den yüksek sıcaklıklarda yapılan denemelerde ise sıcaklık ve ultrasonikasyon uygulamaları sonucunda *D* değerleri birbirine eşit bulunmuştur.

Ultrasonik uygulamalar sürekli sistemlerde, sütteki toplam bakteri inaktivasyonu ve Tryptic Soy Broth' daki *Pseudomonas fluorescens* ve *Streptococcus thermophilus*' un inaktivasyonunda denenmiştir. Çalışmada gram-negatif bakterilerin (*P. fluorescens*) ultrasonik işlemlere gram-pozitiflerden (*S. thermophilus*) daha hassas olduğu belirlenmiştir (Villamiel and de Jong, 2000). Bu bulgu diğer bir araştırma ile uyum içindedir (Hülsen, 1999). Sherba ve ark. (1991) ise gram negatif bakteriler ile (*P. aeruginosa* ve *E. coli*) gram pozitifler (*Listeria monocytogenes* ve *B. subtilis*) arasında ultrasonik işlemlere dayanıklılık açısından hiçbir farklılığın olmadığını belirlemişlerdir. Oysa Gram-pozitif bakteriler, gram-negatif bakterilerden daha kalın ve daha sıkı bir peptidoglikan tabakaya sahiptir. Sherba ve ark. (1991) bu morfolojik farklılığın, ultrasonik uygulama sonucunda hücre ölümünü belirleyen bir faktör olmayabileceğini, ultrasonik dalgaların hücre iç membranın lipoprotein çift tabakasında harabiyet meydana getirmiş olabileceği tezini ileri sürmüşlerdir.

Lopez-Malo ve ark. (2001), termosonikasyonun *Penicillium digitatum*' u etkili bir şekilde inaktive ettiğini bildirmişlerdir. Termal ve termosonikasyon işlemlerini bir

arada ve ayrı ayrı kullanarak inaktivasyon için, pH, su aktivitesi (a_w) ve ultrasonik amplitüdün optimum değerlerini belirlemişlerdir. Su aktivitesi değeri 0.99 olduğunda, yüksek ultrasonik amplitüd ve düşük pH' da, *D* değerlerinin azaldığını belirlemişlerdir. pH değeri sabit tutularak yüksek a_w değeri kullandıklarında da *D* değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar, termosonikasyonla elde edilen *D* değerlerinin sonikasyon yapılmadan uygulanan ısı işleminden elde edilen değerlere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Jimenez-Munguia ve ark. (2001), *P. digitatum* ve *Aspergillus niger* sporlarının ultrasonik inaktivasyonunu test ortamına (Sabouraud Broth) kaynama taşı atarak ve hava kabarcıkları oluşturarak bunların inaktivasyona etkisini araştırmışlar. Ultrasonikasyona maruz bırakılmış (45 °C' de) *A. niger*' den, *P. digitatum*' a oranla daha küçük *D*-değeri elde edilmiştir. Kaynama taşı ve hava kabarcıklarının sonikasyonun kaviteasyon etkisini arttırdığını ve böylelikle *D* değerlerinin daha da azaldığını belirtmişlerdir.

Oulahal-Lagsir ve ark. (2000) ultrasoundu (40 kHz, 10 saniye), et işleme tesislerinde kullanılan çelik ekipman yüzeyindeki spor oluşturan bir tür olan *B. stearothermophilus*' dan hazırlanmış biyofilmin uzaklaştırılmasındaki etkinliğini belirlemek amacıyla kullanmışlardır. Biyofilm uzaklaştırılmasında kullanılan ultrasonikasyon yönteminin, swab yönteminden, 4 kat daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Guerrero ve ark. (2001), *S. cerevisiae*' nin ultrasounda olan direncini (20 kHz, dalga büyüklüğü 71-110 μm) 35, 45 ve 55 °C' de, pH' sı 5.6 ve 3.0 olan Sabouraud Broth' da denemişlerdir. *D* değerleri sıcaklık yükseldikçe azalmış ve 0.5 ile 31 dakika arasında değişmiştir. Ultrasonik dalga büyüklüğü attıkça *S. cerevisiae*' nin direnci azalmıştır. Dalga büyüklüğünün 71.4 μm ve sıcaklığın 45 °C olarak kullanıldığı deneme hariç olmak üzere, düşük pH (3.6) mayanın direncinde bir değişiklik yaratmamıştır. *D* değerini düşürmede ultrasonik dalgalar 55 °C' de önemli bir avantaj sağlamazken, denenen diğer sıcaklıklarda *D* değerlerini önemli ölçüde azaltmıştır.

Burada değerlendirilen çalışmalar göstermektedir ki, ultrasound besinlerin korunması ve güvenliği açısından mikroorganizmaların inaktive edilmesi için yeterli ve güçlü bir metottur, bununla beraber besinlerde mikrobiyal inaktivasyon amacıyla

ultrasound diğer koruma teknikleri ile kombinasyon halinde kullanıldığı zaman değeri ve gücü daha da artmaktadır. Böyle beklentiler bir gıda koruma yöntemi olarak endüstriyel çapta kullanımı için daha ileri düzeyde araştırmalar gerektirmektedir. Sonuç olarak ultrasound teknolojisi gıdaların korunması açısından gelecek için bir potansiyel oluşturmaktadır. Günümüzde ve büyük ihtimalle önümüzdeki birkaç yıl içinde ultrasoundun bu alanda kullanımı ticari olarak mümkün olmayacaktır. Yinede çalışmaların önemli bir yanı besinlerin kalitesinin belirlenmesi üzerine ultrasoundun kullanılma ihtimalinin olduğunun göstermesidir.

Gıda endüstrisinin geleceğinde ultrasonik teknolojinin önemli bir yer alacağı kuvvetle muhtemeldir. Ultrasoundun bakteriyal inaktivasyon amacıyla gıda endüstrisinde tek başına kullanımı ise halihazırda uygulanabilir görünmemektedir. Gıda endüstrisinde bakteriyal inaktivasyon amacıyla ultrasoundun geleceği termosonikasyon, manosonikasyon ve manotermosonikasyonla mümkün olacak gibi görünmektedir. Bu yöntemler klasik ısı işlem süreçleri ile birlikte kullanıldığında mikroorganizmaların *D* değerleri daha az enerji harcanarak düşürülebilecektir.

Ultrasound gıda endüstrisinde gıdaların bazı fiziksel analizleri için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (gıda bileşiminin, partikül büyüklüğünün, metal ve cam gibi kontaminantların, belirlenmesi vb.). Ancak ultrasoundun bir gıda muhafaza yöntemi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Yukarıda verilen ve konuyla ilgili yapılan çalışmalardan da anlaşıldığı gibi, ultrasonikasyonla mikroorganizma inaktivasyonu üzerine etkili olan bir çok faktör bulunmaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmalarda, ultrasoundun diğer gıda muhafaza yöntemleriyle birlikte kullanılabilirliği ve pratikte uygulanabilirliği üzerine olmasına gereksinim duyulmaktadır. Hoover (2000) bu teknolojinin geliştirilmesi için aşağıda belirtilen türde araştırmaların yapılmasına gereksinim olduğunu bildirmiştir:

- 1- Ultrasound, yüksek basınç ve sıcaklık gibi yöntemlerle birlikte kullanıldığında mikrobiyal inaktivasyon verimliliği üzerindeki etkisinin belirlenmesi,
- 2- Ultrasonikasyon diğer koruma teknolojileri birlikte kullanıldığında, mikrobiyal inaktivasyon mekanizmalarının belirlenmesi,

3- Ultrasound, Hurdle Teknolojisinde kullanıldığında prosesi etkileyen önemli faktörlerinin belirlenmesi,

4- Viskozite, partikül büyüklüğü gibi gıdaya ait özelliklerin mikrobiyal inaktivasyon üzerine etkisi,

5- Antibakteriyal ajanların, (doğal ve sentetik), hava kabarcığı oluşturan ajanların ve aktive edilmiş adsorbsiyon yüzeylerinin ultrasonikasyon işlemi üzerine etkisi,

araştırılması gereken konulardır. Bununla birlikte, endüstriyel çapta proses geliştirmeye geçilmeden önce, ultrasound kullanımıyla gıdalardaki mikroorganizma inaktivasyonunun koşullarını belirleyecek çalışmalara da gereksinim vardır.

Bu nedenle, yapılacak araştırmada, ultrasonik dalgalar, yüksek basınç ve yüksek sıcaklık kombinasyonlarının, gıdalar ve insan sağlığı için önemli olan belli mikroorganizmalara etkilerinin, gıdalarda rastlanan sıcaklık, pH ve diğer bileşim özellikleri aralığında nasıl değiştiğinin incelenmesine çalışılacaktır. Elde edilen bu temel verilerin gıda güvenliği, betimleyici mikrobiyoloji, ürün geliştirme gibi alanlarda çok yararlı olacağı düşünülmektedir.

1.3. Betimleyici Mikrobiyoloji Ve Önemi

Gıdaların kalitesi ve raf ömürleri çoğunlukla mikroorganizmaların gelişimleriyle belirlenir. Mikrobiyal gelişme, su aktivitesi ve asitlik gibi içsel faktörlere, sıcaklık ve ortamda bulunan oksijen gibi dış faktörlere bağlıdır. Son yıllarda kontrol faktörlerinin fonksiyonu gibi mikroorganizmaların gelişimini anlatan matematiksel modellerin oluşumuna olan ilgi de artmıştır. Gıdalarda mikroorganizmaların gelişimini tahmin etmeye dayalı matematiksel modellerin gelişimi ve uygulanması için teknikteki ilerlemeler, betimleyici mikrobiyoloji olarak adlandırılan yeni bir disiplinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Wijtzes et al., 1995; Bellara et al., 2000)

Betimleyici mikrobiyoloji, mikroorganizmaların gıda içerisindeki çevresel koşullara göstermiş oldukları tepkileri tanımlayan ve özetleyen sistematik matematiksel modellerin gelişimi ile ilgilidir (Presser et al., 1998).

Bakteriyel gelişim üzerine birçok kontrol edici faktörün birlikte etkisiyle ilgili pek çok çalışma yayınlanmıştır. Matematiksel modeller çoğu zaman, bir gıdanın kalitesindeki değişikliklerin tahmininde ve dolayısıyla gıdaların raf ömürlerini tahmin etmede kullanılabilmektedir (Wijtzes et al., 1995).

Betimleyici modelleme, gıda mikrobiyolojisinin ümit veren bir alanıdır. Son yıllarda özellikle gıda bilimi ve tıp alanında, mikroorganizmaların su aktivitesi (a_w), pH, sıcaklık, oksijen miktarı gibi, farklı fiziksel ve kimyasal koşullardaki davranışlarını açıklamak için geliştirilen matematiksel modeller kullanılmaktadır. Bu modeller, farklı çevre koşullarının büyüme kinetikleri üzerindeki etkilerini incelemek, ürünlerin mikrobiyolojik güvenilirliğini veya raf ömürlerini tahmin etmek, süreçteki kritik noktaları belirlemek, üretim ve dağıtım zincirlerini optimize etmek gibi amaçlarla kullanılır. Betimleyici büyüme modelleri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* ve *E. coli O157:H7* gibi patojenler için, örnek ortamlarda geliştirilmiştir (Zwietering et al., 1990; Giffel and Zwietering, 1999; Rosso et al., 1995; Zwietering et al., 1991).

Ertuğrul ve ark.'nın (2003) yaptığı çalışmada, Nutrient Broth' da *E. coli*' sayısının değişimi 15-60 °C arasında değişen sıcaklıklarda modifiye Gompertz Modeli

ile izlenmiştir. İnaktivasyonun gözlemlendiği 55 °C ve 60 °C' de ise farklı modeller kullanılarak spesifik inaktivasyon hızı (μ) katsayıları hesaplanmıştır.

Patojen mikroorganizmalar tarafından gıdaların mikrobiyal bozulması ve bulaşması tüketiciler, satıcılar ve üreticileri büyük oranda ilgilendirir. Patojenik ve/veya çürükçül mikroorganizmaların inaktivasyonu, güvenli ve sakin bir yaşam için, yüksek nitelikli besin üretmek için önemlidir. Gıda maddesinin üretimi, taşınması ve depolanması sırasında, mikrobiyal bulaşma ve gelişim için çok sayıda olanak sağlanır. Geleneksel olarak, besin mikrobiyal stabilitesi uygulanan testler ile veya depolama takipleri kullanılarak belirlenir. Bu metotlar pahalıdır ve zaman harcanmasına yol açar. Betimleyici mikrobiyoloji, üretim ve depolama sırasında gıdalarda bulunabilecek spesifik mikroorganizmaların gelişimi veya inaktivasyonunu belirlemek için, matematiksel denklemler kullanır (Bozkurt ve Erkmen, 2001).

Betimleyici modeller sıcaklık, pH, su aktivitesi, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve ortama çeşitli konsantrasyonlarda ilave edilen NaCl, asitik asit, laktik asit, HCl, sodyum laktat vb.'nin farklı koşullar altında mikroorganizmaların davranışını tanımlamak için kullanılır. Bu modeller kullanılarak, özellikle optimum depolama şartları ile mikrobiyal güvenlik ve nitelik sağlamak için çeşitli yollar geliştirilir (Bozkurt ve Erkmen, 2001).

Özhan ve Çoksöyler'in (2005), 4 farklı pH (3.0, 3.5, 4.0 ve 4.5) ve 5, 20, 30 ve 35 °C olmak üzere farklı sıcaklıklarda depolanan şalgam suyunda, *E. coli* inaktivasyonunda, birinci dereceden reaksiyon kinetiği kullanılmıştır. Bu çalışmada 5 °C de pH 4.5 ve 3.5' da, 20 °C de pH 3.54' de *E. coli* sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlemediklerini bildirmişlerdir. Denedikleri diğer pH ve sıcaklık kombinasyonlarında D değerleri 11.98- 225.23 dak. olarak belirlemiş ve bu değerlerin sıcaklıkla birlikte arttığını, pH la birlikte yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak *E. coli*' nin, oda sıcaklığında saklanan ve pH' ı <4 olan şalgam suyunda risk oluşturmayacağını bildirmişlerdir.

Betimleyici mikrobiyolojinin gıda endüstrisine potansiyel faydalarına çeşitli örnekler verilebilir. Örneğin, bakterilerin gelişimini matematiksel olarak modelleyerek balık ürünlerinin, süt ürünlerinin raf ömrünün makul derecede iyi bir tahminini elde etmenin mümkün olduğu gösterilmektedir. Farklı çevresel koşullar ve farklı gıda özelliklerine sahip olmaları nedeniyle, çeşitli gıda maddelerinde mikroorganizmanın

gelişimi ve varlığını tahmin edebilmek oldukça önemlidir (Chorin et al., 1997; Bellara et al., 2000).

Betimleyici mikrobiyoloji, matematiksel modelleri kullanarak besinlerdeki mikrobiyal gelişimin kantitatif olarak hesaplanmasını sağlar. Ürünün oluşum noktası ve ürünün tüketim noktası arasında, gıdaların mikrobiyal populasyonlarındaki değişiklikleri betimleyici model değişkenleri kullanılarak (sıcaklık, tuz, su aktivitesi, pH vb.) hesaplamak mümkündür. Yapılan tahminlerin, gıda maddelerindeki mikrobiyal gelişimi iyi bir şekilde tanımlayıp tanımlamadığını belirlemek için bu bilgileri değerlendirmek gerekmektedir. Modellerin doğruluğu, bir modelin tahminleri ile ilgili olarak gözlenen değerler karşısında fikir yürüterek grafikte göstermekle mümkün olabilir (Giffel and Zwietering, 1999; Rosso et al., 2000).

Tipik olarak betimleyici modellemede iki adımlı bir yaklaşım kullanılmaktadır. Birincisinde, eğriler deneysel olarak türetilmiş verilere uygulanmaktadır. Oysa ikincisinde, eğri uyarılama sürecinden türetilen kinetik parametreler test edilen farklı çevresel değişkenlere göre (pH, a_w , sıcaklık gibi) modellenmektedir. Deneysel verilerin modelleme ile uyuşmadığı anlar, bakterilerin fizyolojik olarak adapte olabilmeleri için sıcaklık değişikliklerinin çok hızlı veya büyüklük olarak çok fazla olduğu zamanlardır (Bellara et al., 2000).

Geçmiş birkaç yıl içerisinde, betimleyici gıda mikrobiyolojisindeki araştırmalar gıdada gelişen patojenik bakterilerin gelişimi üzerine çeşitli içsel ve dışsal parametrelerin sahip olduğu etki üzerinde zengin bir nicel veri sağlamıştır. Su aktivitesi (a_w), sıcaklık ve pH, pek çok gıdada mikrobiyal gelişimi kontrol eden üç temel faktör olarak tanımlanmaktadır (Buchanan et al., 1997).

Sıcaklık ve pH, pratikte uygulanabilirlikleri ve temel araştırmalardaki önemlerinden dolayı, yapılan pek çok çalışmada gelişimi etkileyen en önemli çevresel faktör olarak belirlenmişlerdir. Modeller de, mikroorganizmaların sıcaklık, pH ve su aktivitesi gibi farklı fiziksel ve kimyasal şartlar altındaki davranışlarını anlatmak için kullanılmaktadır. Genellikle mikrobiyal gelişim modelleri, metabolik bir gösterge olan maksimum spesifik gelişim oranındaki (μ_{max}) değişimi tanımlamaktadır. Pek çok araştırmacı μ_{max} üzerine sıcaklık ve pH'nın kombine etkilerini tanımlamak için modeller önermişlerdir (Rosso et al., 1995; Zwietering et al., 1990).

Betimleyici mikrobiyoloji, gıdada bozulmaya neden olan bakterilerin ve patojenlerin miktarının populasyon dinamikleri modelini kullanmaktadır. Bu durum çevresel faktörlere cevap veren mikroorganizmaların üreyebilen doğasından dolayı mümkündür. Dolayısıyla sıcaklık, pH ve su aktivitesi gibi dominant çevresel parametrelere cevap veren gelişim oranının detaylı bilgisiyle mikrobiyal çoğalmanın gelişmesini tahmin etmek mümkündür. Sonuçlar, gıdanın raf ömrünün belirlenmesinde ve gıda güvenliğinin değerlendirilmesinde bir matematiksel model ile birleştirilir (Miles et al., 1997).

Betimleyici mikrobiyal modellerin oluşumunun sınırı tartışmalıdır. Bu sınırlar ve onların sonuçları tanımlanmalı, belirgin yöntemlerle ortaya çıkarılmalıdır. Ayrıca karakterlerin birleştirilmesine ihtiyaç vardır. Mikrobiyal gelişim için modellerin düzenlenmesiyle ürünlerdeki mikroorganizmaların canlılığı ve inaktivasyonu önceden belirlenebilir (Ross et al., 2000).

Betimleyici mikrobiyoloji, gıda kaynaklı bakterilerin gelişimi, canlılığı ve inaktivasyonu üzerine interaktif etkileşimlerin ve çevresel faktörlerin etkisini tanımlamada kullanılır. Bu gibi durumlarda gözlenen verilerden sapmanın başlıca nedenleri;

- 1) Pek çok bakteriyel inaktivasyon eğrilerinin lineer olmadığını belirlenmesi,
- 2) Oluşturulan modellerin gıda maddelerinden değil sadece sıvı besiyerlerinden elde edilen sonuçlar olması,
- 3) Onaylamaların sadece literatür verilerine,

dayanmasıdır. Gerçekte bir mikroorganizma için laboratuvar ortamlarında oluşturulan gelişme modelleri aynı mikroorganizma için bir gıda maddesinden alınan sonuçlarla farklılık gösterebilir. Bunun nedeni gıda maddesinin yapısında bulunabilecek esansiyel yağlar, bazı doğal antimikrobiyaller vb.'nin inhibitör etkisidir (Skandamis and Nychas, 2000).

Betimleyici mikrobiyoloji, gelişimi önceden tahmin edebilmek için farklı şartlar altında bakteriyel gelişme tepkilerinin bilgisini matematiksel modellemeyle birleştirmektedir. Bu tekniğin kullanımıyla mikrobiyal gıda bozulması ve gıda

güvenliği hakkındaki sorular bilimsel bilgiye dayanan objektif analizle cevaplanabilir (Presser et al., 1997).

1.4. *Listeria monocytogenes*

Listeria türlerinin dahil edildiği familyalar yıllar ilerledikçe değişiklik göstermektedir. 1957 yılında *Erysipelotrix* cinsi ile birlikte *Corynebacteriaceae* familyasında kabul edilen *Listeria*'nın, korinebakterlerden daha fazla *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Bacillus* cinslerine özellikle de *Brochotrix* cinsine yakın olduğu belirlenmiştir. 1974' de yayınlanan Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology' de "yakınlık ilişkileri kesin olmayan bakteri cinsler" başlığı altında yer alan *Listeria* birçok biyokimyasal test yanında peptidoglukan yapılarının ve G+C oranlarının belirlenmesinden sonra, yukarıda belirtilen aynı kitabın 1986 yılındaki baskısında, kendisine yakın cinsler olan Gram pozitif özellikteki *Brochotrix*, *Erysipelotrix* ve *Kurthia* cinsleriyle kıyaslanmıştır.

G+C oranına göre; % 55' in altındaki G+C oranıyla *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Bacillus* cinslerine yakın bulunurken, 16 S rRNA analizlerine göre *Brochotrix* cinsine yakın bulunmuştur. Bu cinsin taksonomideki yerini hala kesin olarak söylemek olanaklı değildir.

Listeria cinsi içinde bulunan türler bugün artık kesinlik kazanmıştır. Bu türler; *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri*' dir. *L. murrayi* ve *L. denitrificans* cinsin dışına çıkarılmıştır. İnsanlar için dominant patojen suş, *L. monocytogenes*' dir ve insanlarda görülen listerioz olarak adlandırılan enfeksiyöz hastalığın etmenidir. Ayrıca hayvan listeriozlarına da neden olmaktadır. *Listeria* türleri içerisinde yalnızca *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* kırmızı kan hücrelerini (eritrositleri) parçalayan bir hemolisin üretirler. β -hemolitik olan bu türlerin CAMP testinde verdikleri pozitif ve negatif sonuç ile tanılanmaları mümkündür. İnsanlar için patojen olan tür *L. monocytogenes* olmakla birlikte, *Listeria*' ların neden oldukları hastalıklarda seyrek de olsa *L. ivanovii*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri*' nin varlığı saptanmıştır. Bununla birlikte dominant patojen suşun *L. monocytogenes* olduğu

kabul edilir. *L. monocytogenes*' in bütün suşları patojen değildir. Ancak patojen olanlar hemolisin üretilirler. *L. ivanovii*' nin hayvan listeriozlarının etmeni olduğu yüzyılın başlarından beri bilinmektedir.

Listeria ile çalışması zor ve tehlikelidir. Laboratuvarında *L. monocytogenes* ve *L. innocua* şahit olarak denemelerde kullanılmalıdır. En azından bu kullanım dahi laboratuvarında çok fazla sayılarda *L. monocytogenes* bulunmasına neden olur. Çocuk düşürmeye yol açabilmesi nedeni ile gebelerin ve gebelik şüphesi olanların *Listeria* analizlerine katılmaması çeşitli kaynaklarda uyarılmıştır. Aynı kaynaklar ancak deneyimli bakteriyologların ve laboratuvarların *Listeria* ile çalışmasını önermektedir.

1.4.1 Morfolojik, Kültürel Özellikleri ve Doğal Olarak Bulunduğu Yerler

Listeria'lar Gram pozitif, kokobasil olarak tanımlanan kısa çubuk bakterilerdir. Sporsuz ve kapsülsüz, fakültatif anaerobtur. Yaşlı kültürlerde hücreler arda ardına dizilerek uzun iplikler oluştururlar. Hücreler 25 °C' de hareketli olmalarına karşın 37 °C' de hareketsizdirler. Katalaz pozitif olan *Listeria*' larda oksidaz negatiftir. 10-25 °C' de gelişen bakterilerin flagella sayısı fazla ve peritrik formudur. 37 °C' de gelişenlerde flagella birkaç adetle sınırlı olup polar pozisyonadadır. Buna bağlı olarak çok yavaş hareket ederler veya flagellasız olanlarına da rastlanmaktadır. Optimum gelişme sıcaklıkları 30-37 °C' dir. Minimum 1-3 °C' lerde (süt içinde 0.1-0.4 °C' lerde), maksimum 45 °C' de gelişebilirler. Bakteri psikrotrof karakterli olduğundan, yaklaşık 50 yıl önce Gray, *Listeria*' ların bu özelliğinden faydalanarak bu bakteriyi soğukta zenginleştirmeyi başarmış ve izole edebilmiştir. *L. monocytogenes*' in vakum altında ve modifiye atmosferdeki gelişimi incelenmiş; vakumlu ortamın ve modifiye atmosferdeki % 40 oranında bulunan CO₂' in gelişmeyi etkilemediği, hatta % 70 oranındaki CO₂' in de, ortamda % 5 oksijen bulunması halinde, gelişmeyi inhibe etmediği gösterilmiştir. Süt içerisinde +4 °C' de gelişen bakterinin generasyon süresi 1.2-1.7 gün olarak belirlenmiştir. 8 °C' de generasyon süresi kısalarak 8.7-14.6 saate düşmüştür. Optimum olarak pH 7.0-7.3' de gelişen *L. monocytogenes*' in minimum pH isteği 4.4-4.6' dır. Minimum a_w değeri de 0.92 (mutfak tuzunda) olarak belirlenmiştir. Organik asitlerde 1 saatte saptanan D değerleri farklı bileşiklerde farklı şekillerde gerçekleşmiştir. Bu değerler ise Asetik asit; % 0.3' de D= 132, % 0.5' de D= 104,

Laktik asit; % 0.3' de D= 187, % 0.5' de D= 129, Sitrik asit; % 0.3' de D= 206, % 0.5' de D= 142 şeklinde gerçekleşmiştir.

Ayrıca Potasyum sorbat (%0.2) ve sodyum benzoat (% 0.1), 13 °C de ve pH 5.0'de bakterinin gelişimini inhibe etmektedir.

1.4.2 Neden Olduğu Hastalıklar ve Enfeksiyon Dozu

Hastalık çok çeşitli şekillerde ortaya çıkmaktadır. *L. monocytogenes* insanlarda endokarditis, meningoensafalitis, menenjit, septisemi, mukozada lezyonlar, konjunktivit, cilt rahatsızlıkları, lenf düğümlerinde şişme gibi ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Listerioz özellikle hamile bayanlarda, anne karnındaki ve yeni doğmuş bebeklerde ve de bağışıklık sistemi zayıf olan insanlarda daha fazla ortaya çıkmaktadır. Hamile bayanlarda düşük yapma ve ölü bebek doğumları görülmektedir. İnkübasyon süresi 2 gün ile 6 hafta arasındadır. *Listeria'* nın minimal enfeksiyon dozu bilinmemektedir. Ancak epidemiyeye neden olan peynirde *Listeria'* nın 10^3 - 10^4 /g düzeyinde bulunması bir fikir vermektedir.

1.4.3. Epidemiler ve Aracı Gıdalar

Listerioza neden olan septik vakalar her zaman görülmekle birlikte, 1980 yıllarından başlayarak özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş süt, yumuşak peynir (Meksika tipi), lahana salatası, az pişmiş tavuk, sosis, çiğ et ürünleri, balık ve kabuklu deniz ürünleri gibi gıdaların toplu tüketimleri sonucu büyük epidemiler ortaya çıkmış ve % 30' lara varan ölümler görülmüştür. Hastalığa neden olan gıdalar arasında; lahana salatası, startersiz üretilen taze peynirler, yumuşak peynirler, kanatlı etleri, hindi etleri, tüketime hazır yiyecekler, ısı işlem görmüş jambon, çeşitli sosis ve salamlar sayılabilir.

Türkiye' de epidemiler şeklinde insan listeriozları görülmemiştir. Buna karşılık yapılan araştırmalar çiğ süt ve tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes'* in bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Anadolu' nun değişik yörelerindeki çiğ sütlerin % 18.2 'inde *L. monocytogenes* varlığı belirlenmiştir. Tüketime hazır gıdalar arasında; özellikle ızgara tavuk, kokoreç, ızgara balık, midye tava, donmuş çiğ İnegöl köfte *L.*

monocytogenes, *L. innocua* ve *L. welshimeri* içermeleri nedeniyle riskli gıdalar arasında bulunmuştur.

1.5. Beklenen Yararlar / Uygulamaya Aktarma / Ekonomiye Katkı

Bu çalışma ultrasonikasyon ile diğer metotlar birlikte kullanıldığı zaman besin sistemlerindeki mikrobiyal inaktivasyonun üzerine daha fazla araştırma yapılmasına duyulan ihtiyaca yönelik veriler oluşturmak üzere planlanmıştır. Bu amaçla, ultrasonik dalgaların *L. monocytogenes* inaktivasyon kinetiği üzerine ısı işlem ve pH'nın etkisi incelenecektir. Ayrıca bu ortam koşullarında, ultrasonik dalgaların şiddeti (amplitüd, W/cm²) ve sonikasyona maruz kalacak sıvı hacminin, bakteri inaktivasyonuna etkisi yine birer ortam faktörü olarak değerlendirilecektir.

Yeni gıda ürünleri dizaynında, gıda güvenliği de artık hesaplanabilen öğeler içine girmektedir. Bu çalışma ile elde edilecek bulgular ve katsayılar kullanılarak sonikasyonun kullanıldığı üretim dizaynlarında bu işlemlerin düzeyleri, bu çalışmada elde edilen bulgulara göre belirlenebilecektir

2. MATERİYAL ve METODLAR

2.1. MATERİYAL

2.1.1. Besiyerleri

Besiyeri 1: Palcam Agar(Merck)

500 ml distile su içinde 35,9 g hazır besiyeri çözününceye kadar kaynatılmıştır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklav çıkışı 50 °C' ye soğutulup üzerine 1 ml steril distile su içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı palcam *Listeria* selective supplement ilave edilmiştir. Son olarak 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Besiyeri 2: Tryptic Soy Broth(Merck)

Casein peptone	17 g
Soya peptone	3 g
Sodium chloride	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g
Glucose	2,5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri 3: Tryptone Soya Broth Yeast Extract(Merck)

Tryptic Soy Broth	30 g
Yeast Extract	6 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri 4: TSYEA (Tryptone Soya Yeast Extract Agar)

Tryptic Soy Broth	30 g
Yeast Extract	6 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

2.1.2. Çözeltiler

Citrate tamponunun hazırlanması:

Çözelti 1: 0,1 M Citric Acid

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

21 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ tartılarak bir litre distile suya ilave edilmiş ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Çözelti 2: 0,2 M Disodium Hydrogen Phosphate

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

35.6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ tartılarak bir litre distile suya ilave edilmiş ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

İstenen pH değerlerini elde etmek için çözelti 1 ve 2 den gerekli miktarlarda alınıp karıştırılmıştır. Çalışmada kullanılan pH ları oluşturmak için aşağıda verilen miktarlar kullanılmıştır.

	0,1 M Citric Acid	0,2 M Disodium Hydrogen Phosphate
pH= 2.2	98 ml	2 ml
pH= 3.0	79.45	20.55
pH= 4.0	61.45	38.55
pH= 5.0	48.50	51.50
pH= 7.0	18.15	81.85

Çözelti 3: Fizyolojik Tuzlu Su(FTS)

NaCl	8.5 g
Distile su	1000 ml

8.5 g NaCl 1 litre suda çözülmüş ve otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

2.1.3. Mc Farland No: 0.5 Bulanıklık Standardı

BaCl ₂ (%1.175)	0.5 ml
H ₂ SO ₄ (0.36N)	99.5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırılarak 10 ml’lik kapaklı tüpe doldurulmuş ve kapağı parafilm ile sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.2. METODLAR

2.2.1. Test Organizması

Bu çalışmada test mikroorganizması olarak *Listeria monocytogenes* kültürü kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *L. monocytogenes*, LMG 13305 Serovar 46' dır. Peynirden izole edilmiş kontrol ve bioassay straini olup Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms(BCMM)' den elde edilmiştir.

2.2.2. *Listeria monocytogenes* Stok Kültürünün hazırlanması

L. monocytogenes, LMG 13305 Serovar 46 numaralı kültürden aseptik şartlar altında yatık TSYEA(tryptone soya yeast extract agar) besiyerlerine aktarılmış ve 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonucunda bu kültürden bir öze dolusu alınarak içinde 5 ml TSBYE (tryptone soya broth yeast extract) bulunan tüplere ekilmiş ve 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu kültürden, içinde 50' şer ml' lik steril TSBYE bulunan 250 ml' lik erlenlere inoküle edilmiştir. 37 °C' de 18 saat çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kültürler 50 ml' lik santrifüj tüplerine doldurularak 4900 rpm' de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kültür steril fizyolojik tuzlu su ile yıkanmış ve aynı işlem tekrar edilmiştir. Bu işlem kültür berrak bir hal alıncaya kadar devam ettirilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış olan stok kültür + 4 °C' de muhafaza edilmiştir (Eaton, et al., 1995; Pagan et al., 1998).

2.2.3. Sonikasyon Denemeleri İçin *Listeria monocytogenes* Kültürü Hazırlığı

Çalışmalarda kullanılacak başlangıç hücre yoğunluğunun olabildiğince eşit tutulması amacıyla, başlangıç kültür yoğunluğunu ayarlama Mc Farland yöntemi kullanılmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990). Bunun için stok kültürden belirli miktarda alınarak FTS içine konmuş ve bulanıklığı McFarland No: 0.5 tüpü ile karşılaştırılmış gerektiğinde yine FTS ile seyreltilmiştir. Yapılan sayımlar ve tekrarlanan denemelerin

sonucunda stok kültürden alınan 0.05 ml *L. monocytogenes* kültürünün 6 ml fizyolojik tuzlu su ile seyreltilmesinin Mc Farland No: 0.5 Bulanıklık Standardı'nı verdiği gözlenmiştir.

2.2.4. Çalışmada Kullanılan Sayım Yöntemi

Çalışmada yapılan tüm sayımlarda damlatma yöntemi kullanılmıştır. Herbir çalışma için başlangıç anından itibaren belirlenen aralıklarda örnekler alınmış ve bunların FTS içinde desimal(1/10) dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan iki paralel halinde Palcam Agar yüzeylerine 0.02' şer ml ekilmiştir. Palcam Agar plaklarında *L. monocytogenes* sayımı 37 °C' de 24 saat inkübe edildikten sonra yapılmıştır.

2.2.5. İnaktivasyon denemelerinde Kullanılan Ultrasonic Processor' ün Özellikleri

Deneylerde sonikasyon uygulamada, 750 Watt' lık Ultrasonic Processor (Sonics and Materials Inc. Vibra Cell VCX 750, U.S.A) kullanılmıştır. Sıcaklık ölçen paslanmaz çelik probu bulunmaktadır. Ultrasonic Processor' ün converter' in (CV 33, piezoelectric lead zirconate titanate crystals-PZT) çapı 21/2'' (65.5 mm), uzunluğu 71/4'' tir (183 mm).

Titanyum alaşımından yapılmış (TI-6AL-4V), 13 mm ve 3 mm çapa sahip otoklavlanabilir iki tip prob kullanılmıştır ve bunlar sırasıyla solid prob ve stepped microtiplerdir. Problara ait detaylar çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge 1: Kullanılan problemin özellikleri.

	<u>solid prob</u>	<u>stepped mikrotip</u>
Order no:	630-0219	630-0422
Prob çapı:	13 mm (1/2'')	3 mm (1/8'')
prob uzunluğu:	136 mm	136 mm
İntensity:	yüksek	çok yüksek
Amplitüd: (mμ)	124	211
(inches)	.0049	.0083
Hacim:	10-250 ml	250 μl-10 ml

Üretici firmanın katalog bilgilerine göre stepped microtip, maksimum % 40 amplitüdde kullanılabilir.

2.2.6. Farklı Sonikasyon ve Sıcaklık Derecelerinde *Listeria monocytogenes*' in İnaktivasyonu:

Bu çalışmada, farklı sonikasyon düzeylerinde farklı sıcaklıkların kullanımıyla, iki etkenin birlikte etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Sonikasyonlarda 13 mm' lik solid prob ve stepped microtip kullanılmış, ultrasound cihazının 100 ml' lik haznesi ile çalışılmıştır.

Ultrasound ve farklı sıcaklık derecelerinin *L. monocytogenes* inaktivasyonundaki etkisini belirlemede % 40 amplitüt ve 4, 20, 30, 40, 45, 50 °C olmak üzere 6 farklı sıcaklık derecesi kullanılmıştır.

Bunun için ultrasound cihazının 100 ml'lik su ceketli sonikasyon haznesi kullanılmıştır. Bu şekilde sonikasyon haznesinin sıcaklığı istenen sıcaklık değerinde sabit tutulabilmiştir. Sonikasyon haznesinin, sonikasyon öncesi ve sonrası sıcaklığı ölçülmüştür.

Sonikasyon haznesine uygun yoğunlukta (bölüm 2.2.3, yaklaşık 10^6 kob/ml) *L. monocytogenes* kültürü konulmuş ve ortamının sıcaklığı istenen değere ulaştığında sonikasyon işlemine başlanmıştır. Her sıcaklık ve amplitüt ikili kombinasyonlar halinde ayrı ayrı denenmiştir. Tüm sıcaklıklar ve amplitütler için 0 anları dahil olmak üzere belirlenen zaman aralıklarında 0.5' er ml örnekler alınmıştır. Alınan örnekler FTS içeren dilüsyon tüplerine 1:9 oranı sağlayacak hacimde inoküle edilmiştir. Uygun dilüsyonlardan Palcam Agar katı besiyerine damlatma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılmıştır.

Aşağıda şekil 1, 2, 3 ve 4' de sonikasyon işleminin gerçekleştirildiği düzenek ve kullanılan problemlerin dış görünüşleri verilmiştir.



Şekil 1. Sonikasyon işleminin gerçekleştirilmiş olduğu düzenek



Şekil 2. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid pob



Şekil 3. Sonikasyon işleminde kullanılan 13 mm'lik solid prob'un uç kısmının yakından görünüşü



Şekil 4. Sonikasyon işleminde kullanılan stepped microtip

2.2.7. Farklı Sıcaklık Derecelerinde ve Farklı pH' larda *Listeria monocytogenes*' in İnaktivasyonu ve var/yok testi

Bu amaçla 20, 30, 40, 50 °C olmak üzere 4 farklı sıcaklık derecesi ve pH=2.2, pH=3, pH=4, pH=5, pH=7 olmak üzere 5 farklı pH kullanılmıştır. Öncelikle var/yok testi ile bir ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmanın yapılması ile göze çarpan bir inaktivasyon elde etmek için gereken süreler belirlenebilmiştir. Çalışmada ultrasound cihazının 10 ml'lik haznesi kullanılmıştır. Sonikasyonlarda 13 mm' lik solid prob kullanılmıştır.

Var/yok testleri için öncelikle istenen pH' larda sonikasyon ortamları hazırlanmış, *L. monocytogenes* kültürü bu ortama ilave edilmiş ve homojen bir karışım haline gelmesi sağlanmıştır. Bu ortamlar (istenen pH' da ve *L. monocytogenes* kültürü içeren) yukarıda verilen sıcaklık derecelerine getirildikten sonra ilk örnekleme yapılmış (0.02 ml, damla yöntemi ile ekim) ve bu 0 anı olarak kayıt edilmiş, daha sonra belirli aralıklarda örnekler alınmıştır. Alınan bu örneklerden direkt ekim yapılarak inaktivasyonun hangi zaman aralıklarında gerçekleştiği gözlenmiş, bu veriler asıl çalışmanın sürelerini ve örnek alma periyotlarını belirlemede kaynak oluşturmuştur.

Yukarıda anlatılan ön çalışma sonrasında, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde *L. monocytogenes* inaktivasyonunun belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. İstenen pH' larda sonikasyon ortamları hazırlanmış ve *L. monocytogenes* kültürü bu ortama ilave edilmiş ve homojen bir karışım haline gelmesi sağlanmıştır. Bu ortamlar istenen sıcaklık derecelerine getirildikten sonra ilk örnekleme yapılmış (0.5 ml) ve bu 0 anı olarak kayıt edilmiş, daha sonra belirli aralıklarda örnekler alınmıştır. Alınan bu örnekler FTS içeren dilüsyon tüplerine 1:9 oranı sağlayacak hacimde inoküle edilmiş ve homojen bir karışım sağlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan Palcam Agar katı besiyerine damlatma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37 °C' de 24 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılmıştır.

2.2.8. Ultrasound, Farklı Sıcaklık Dereceleri ve Farklı pH Kombinasyonunda *L. monocytogenes*' e ait İnaktivasyon Eğrilerinin Oluşturulması

Bu aşamada ise ultrasound, sıcaklık ve pH olmak üzere üç farklı etkenin çeşitli kombinasyonlarının birlikte etkisi belirlenmiştir.

Bu amaçla %40 ve % 80 amplitüt olmak üzere iki farklı amplitüt, 20, 30, 40, 50 °C olmak üzere 4 farklı sıcaklık derecesi ve pH=3, pH=4, pH=5, pH=7 olmak üzere 4 farklı pH kullanılmıştır.

Bu aşamada denenen pH, sıcaklık ve sonikasyon kombinasyonları, daha açık bir şekilde aşağıdaki Çizelge 2' de verilmiştir.

Çizelge 2: Denenen pH, sıcaklık ve sonikasyon kombinasyonları.

	S%0	S%40	S%80
20 °C	4 pH (3,4,5, ve 7)	4 pH (3,4,5, ve 7)	4 pH (3,4,5, ve 7)
30 °C	3 pH (4,5 ve 7)	3 pH (4,5 ve 7)	3 pH (4,5 ve 7)
40 °C	2 pH (5 ve 7)	2 pH (5 ve 7)	2 pH (5 ve 7)
50 °C	pH (7)	pH (7)	pH (7)

Sonikasyonlarda 13 mm' lik solid prob ve ultrasound cihazının 10 ml' lik haznesi kullanılmıştır.

İstenen pH' larda sonikasyon ortamları hazırlanmış ve *L. monocytogenes* kültürü bu ortama ilave edilmiş ve homojen bir karışım haline gelmesi sağlanmıştır. Bu ortamlar yukarıda verilen sıcaklık derecelerine getirildikten sonra ilk örnekleme yapılmış (0.5 ml) ve bu 0 anı olarak kayıt edilmiş, daha sonra belirli aralıklarda örnekler alınmıştır.

0 anları dahil olmak üzere belirli aralıklarda yine örnekleme yapılarak alınan örnekler FTS içeren dilüsyon tüplerine 1:9 oranı sağlayacak hacimde inoküle edilmiş ve homojen bir dağılım sağlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan Palcam Agar katı besiyerine damlatma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılmıştır.

2.2.9. İstatistiksel metodlar:

Bu çalışmada bakterilerin inaktivasyonunun değerlendirilmesinde veya modellenmesinde yaygın olarak kullanılan bir model olan birinci derece reaksiyon kinetiği modeli kullanılmıştır. Birinci derece reaksiyon kinetiği modeli daha önce yapılan bir çalışmada da kullanılmıştır (Ertuğrul ve ark., 2003).

Buna göre inaktivasyonu gerçekleştiren şartlar altında var olan hücre sayısının her birim zamanda belli bir oranı inaktif hale gelir.

Model;

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

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

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

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

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

Denklemlerde;

No= inaktivasyon işlemine tabi tutulan kültürdeki hücre miktarı (kob/ml)

t = inaktivasyon ortamında örnek alına 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)

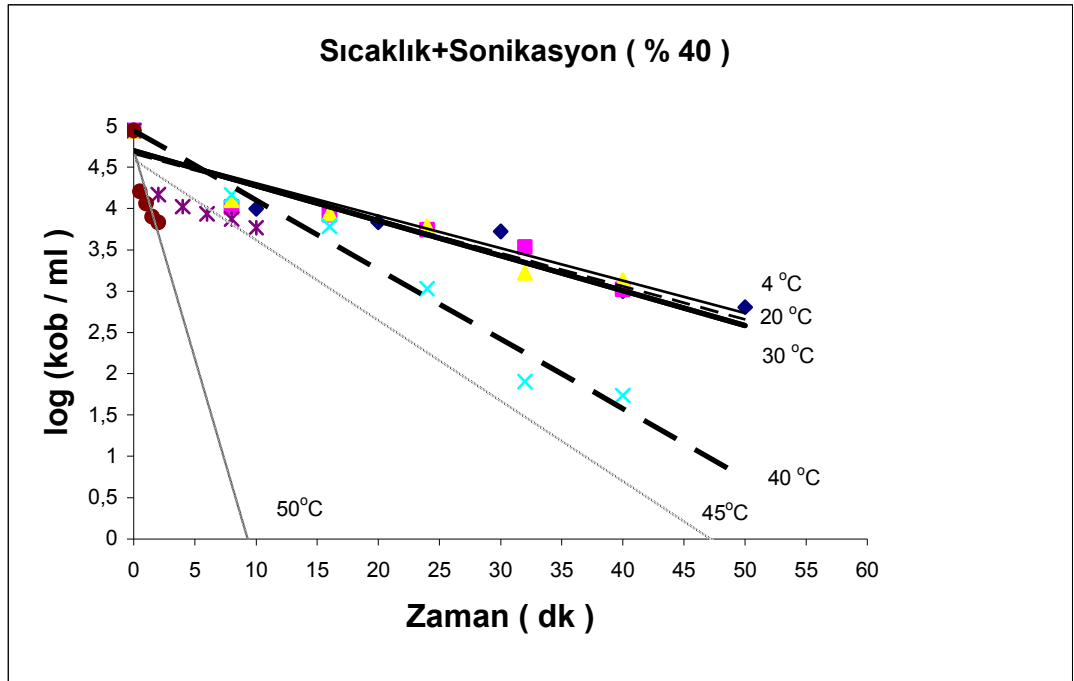
Verilerin bu modele uygulanması doğrusal regresyonla yapılmış ve bu amaçla Microsoft, Excel programı kullanılmıştır.

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

3. BULGULAR

3.1. Sonikasyon işlemine sıcaklığının etkisi :

Bu çalışma, FTS içeren 100 ml'lik hacimde, 4, 20, 30, 40, 45 ve 50 °C olmak üzere 6 farklı sıcaklık derecesi ve % 40 amplitüdde 13 mm solid prob kullanılarak denenmiştir. Bunlara ait inaktivasyon eğrileri Şekil 5' de görülmektedir.



Şekil 5: Farklı sıcaklık derecelerinde, % 40 amplitüd kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrileri.

Şekildeki eğrilerde de görüleceği üzere 4 °C' den 30 °C' ye kadar *D* değerlerinde çok az bir azalma olmuştur. *D* değerlerindeki önemli miktarda azalma ise 40-50 °C arasında görülmüştür. Buna göre 4-30 °C arasında gördüğümüz azalmanın esas olarak sonikasyondan dolayı olduğunu; 40-50 °C' lerde ise inaktivasyonda sıcaklığında önemli derecede etkilediğini söylemek mümkündür.

Bu eğrilerden (bu eğrilere ait regresyon denklemlerinden) elde edilen D değerleri Çizelge 3' de verilmiştir.

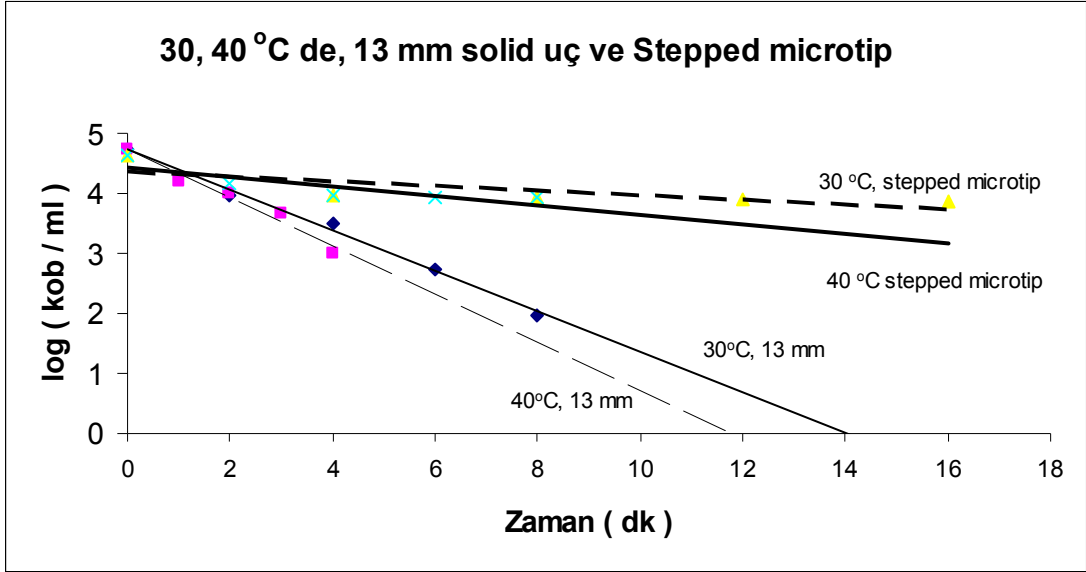
Çizelge 3: Farklı sıcaklık derecelerinde, % 40 amplitüd kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrilerinin değerleri.

Sıcaklık	Süre(dk)	R^2	Denklemler	D (dk)
4 ° C	0,10,20,30,40,50	0,9242	$y = -0,0394x + 4,7009$	25,38071
20 ° C	0,8,16,24,32,40	0,8909	$y = -0,0401x + 4,6645$	24,93766
30 ° C	0,8,16,24,32,40	0,9208	$y = -0,0423x + 4,6996$	23,64066
40 ° C	0,8,16,24,32,40	0,9754	$y = -0,0841x + 4,9423$	11,89061
45 ° C	0,2,4,6,8,10	0,7375	$y = -0,0978x + 4,6064$	10,22495
50 ° C	0/0,5/1/1,5/2	0,8031	$y = -0,5051x + 4,6936$	1,979806

Çizelge 3'de de görüldüğü gibi 4-20 °C arasında D değerleri 23.6-25.3 dk. arasında değişirken 40-45 °C de bu değerler 10.2 dk ve 50 °C de ise yaklaşık 1.98 dk olmuştur.

3.2. Sonikasyonda kullanılan başlığın etkisi :

Bu amaçla 13 mm solid prob ve stepped microtip karşılaştırılmıştır. Sonikasyon işleminde 10 ml süspansiyon hacmi kullanılmış ve inaktivasyon denemeleri % 40 amplitütte 30 ve 40 °C' lerde yapılmıştır. Bu denemelere ait sonuçlar ise Şekil 6' de görülmektedir.



Şekil 6. Farklı iki sıcaklık derecesinde, % 40 amplitüdde, iki farklı prob kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrileri.

Şekil 6’ da da görüldüğü gibi sonikasyon başlığının tipi inaktivasyon hızını çok önemli ölçüde etkilemiştir. 13 mm çapında olan prob kullanıldığında her iki sıcaklıkta çok güçlü bir inaktivasyon meydana gelirken, stepped microtip kullanıldığında yine her iki sıcaklıkta çok daha zayıf bir inaktivasyon oluşmuştur. Bunda başlığın 13 mm’ lik yüzey alanı etkili olmuş olabilir. Bu verilerden yola çıkarak bundan sonraki çalışmalara 13 mm’ lik solid proba devam edilmiştir. Tabii olarak sıcaklıkların etkileride aynı zamanda görülmektedir. Bu durum daha açık olarak Çizelge 4’ de görülmektedir.

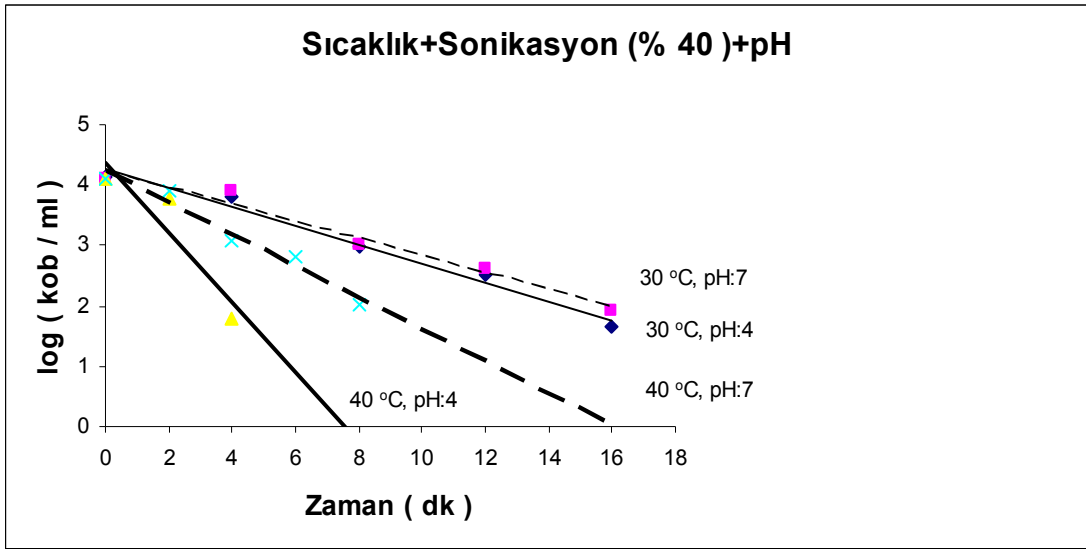
Çizelge 4: Farklı iki sıcaklık derecesinde, % 40 amplitüdde, iki farklı prob kullanılarak yapılan sonikasyon işlemi sonrasında elde edilen inaktivasyon eğrilerinin değerleri.

Başlık	Sıcaklık	Süre	R^2	Denklemler	$D(\text{dk})$
13 mm prob	30 ° C	0,2,4,6,8	0,9946	$Y = -0,3377x + 4,7395$	2,961208
13 mm prob	40 ° C	0,1,2,3,4	0,9624	$Y = -0,4011x + 4,7235$	2,493144
Stepped microtip	30 ° C	0,4,8,12,16	0,61	$Y = -0,0399x + 4,3734$	25,06266
Stepped microtip	40 ° C	0,2,4,6,8	0,712	$Y = -0,079x + 4,4393$	12,65823

Çizelge 4’ de görüldüğü gibi 13 mm’ lik başlıkla yapılan çalışmada 30 ve 40 °C’ lerde *D* değerleri sırasıyla 2.4 ve 2.9 dk kadar olurken aynı sıcaklıklarda stepped başlık kullanıldığında *D* değerleri neredeyse 8 kat kadar artmıştır.

3.3. Sonikasyon işlemi üzerine pH’ ın etkisini belirlemek amacıyla yapılan ön çalışma :

Sonikasyon işlemine pH’ın etkisi, 30 ve 40 °C’ lerde 10 ml’lik süspansiyonlarda, pH’ ları sitrat tamponu kullanılarak pH= 4 ve pH= 7’ ye getirilmiş süspansiyon ortamlarında, % 40 amplitüd uygulanarak belirlenmiştir. Bunlara ait inaktivasyon eğrileri Şekil 7’ de verilmiştir.



Şekil 7: İki farklı sıcaklıkta, pH=4, pH=7’ de, 13 mm’ lik prob kullanılarak yapılan % 40 sonikasyonun etkisi.

Farklı pH’ larda yapılan sonikasyon işleminden elde edilen *D* değerleri Çizelge 5’ de verilmiştir.

Çizelge 5: İki farklı sıcaklıkta, pH=4 ve pH=7’ de % 40 sonikasyonun etkisi sonucu oluşan inaktivasyon eğrilerine ait değerler.

pH	Sıcaklık	Süre	R^2	Denklem	$D(dk)$
4	30 ° C	0,4,8,12,16	0,9838	$y = -0,1563x + 4,2667$	6,3979
4	40 ° C	0,2,4	0,8487	$y = -0,5766 x + 4,3728$	1,7343
7	30 ° C	0,4,8,12,16	0,9677	$y = -0,122 x + 4,1587$	8,1967
7	40 ° C	0,2,4,6,8	0,9613	$y = -0,2626x + 4,2329$	3,8080

Şekil 7’ de de görüldüğü gibi aynı süspansiyon hacmi, aynı kültür yoğunluğu ve aynı sonikasyon düzeyi kullanılmış olmakla birlikte, düşük pH’ larda daha güçlü bir inaktivasyon ve dolayısıyla daha küçük bir D değeri, yüksek pH’ larda ise daha zayıf bir inaktivasyon ve dolayısıyla daha yüksek D değerleri elde edilmiştir. Ancak pH=7’ de sıcaklık 30 °C’ den 40 °C’ ye yükseltildiğinde D değeri 8.1967’ den 3.8080’ e inmiş ve dolayısıyla ilk değerın % 46.45’ ine inmiştir. Buna karşılık pH= 4’ de aynı sıcaklıklarda 6,3979’ dan 1,7343’ e inmiş ve dolayısıyla ilk değerın % 27,10’ una inmiştir. Düşük pH’ da sıcaklık artışının sonikasyon etkinliğini arttırdı. Buna dayanarak, pH ve sıcaklığın sonikasyonun etkenliğinde sinerjistik bir etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

3.4. Sonikasyon Süresinin Etkisi:

Yapılan tüm çalışmalarda mikroorganizma sayısının logaritması zamanla doğrusal olarak azalmıştır. Bu azalışa ait doğrusal regresyon denkleğinin determinasyon katsayısı (R^2) genellikle 0.9 un üzerinde olmuş ve ön çalışmaların yarısından fazlasında 0.96-0.99 arasında değışmiştir. Buna dayanarak test edilen mikroorganizmanın inaktivasyonunun klasik 1. derece reaksiyon kinetiğı ile gösterilebileceğıne karar verilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda bu eğride omuz ve kuyruk gibi doğrusallıktan sapma eğilimleri de görülmüştür. Bu nedenle, daha sonra yapılan esas çalışmalarda sonuçlar klasik modelin yanında bu sapsmaları da ifade edebilen Weibull Dağılımı ile de ifade edilmeye çalışılmıştır. Ancak bu model klasik modelden (birinci derece reaksiyon kinetiğı veya canlı kalanların sayısının zamanla düzgün doğrusal değışimi) daha başarılı olmaması nedeniyle tezin tamamında klasik modelle yapılan değılendirmeler kullanılmıştır.

3.5. pH, sıcaklık ve amplitüd gibi farklı ortam koşullarının sonikasyon işlemi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan var/yok çalışmaları:

Sonikasyon işlemi ile mikroorganizma inaktivasyonunda, pH, sıcaklık ve amplitüd gibi etkenlerin birlikte etkisini belirlemek amacıyla bir ön çalışma yapılması planlanmıştır. Ayrıca farklı ortam koşullarında önemli düzeyde bir mikrobiyal inaktivasyon için gerekli olan işlem süresinin önceden belirlenebilmesi için de var/yok olarak adlandırılan testler yol gösterici olacağı düşünülmüştür. Bu testlerin sonuçları alındıktan sonra, farklı ortam koşullarının oluşturulduğu çözeltilerde sonikasyon işleminin hangi sürelerde yapılması gerektiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgulardan yola çıkarak etkinliğin artırılması için standart 13 mm solid probun kullanılmasına karar verilmiştir. Bu ön çalışmada, pH = 2.2, 3.0, 4.0, 5.0 ve 7.0 olmak üzere farklı pH ' lar ve 4, 20, 30, 40, ve 50 °C sıcaklık uygulaması yapılmıştır.

Göze çarpan bir inaktivasyon elde edilebilmesinde gerekli sürenin belirlenmesi için yapılan var/yok çalışması sırasında sonikasyon ortamından belirli aralıklarla alınan örneklerin (0.02 ml) oluşturdukları koloni sayıları birbiriyle karşılaştırılmıştır. 0 anında alınan örneklerdeki koloni sayıları, örnekleme periyotlarında alınan örneklerden elde edilen koloni sayılarıyla karşılaştırılmıştır.

Buna göre bir gelişme skalası oluşturulmuştur, + işareti gelişmeyi, bu işaretlerin sayısı da gelişmenin düzeyini ifade etmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler Çizelge 6, 7 ve 8' de gösterilmiştir.

Çizelge 6: Sonikasyon kullanılmadan, farklı sıcaklık ve pH’ larda yapılan var/yok denemelerinin sonuçları

Sıcaklık	pH	Örnek alma süresi (dk)				
		0	15	30	45	60
4 °C	2.2	++++	++++	+++	++	+
	3	++++	++++	++++	++++	++++
	4	++++	++++	++++	++++	++++
	5	++++	++++	++++	++++	++++
	7	++++	++++	++++	++++	++++
20 °C	2.2	++++	++++	+++	++	+
	3	++++	++++	++++	++++	++++
	4	++++	++++	++++	++++	++++
	5	++++	++++	++++	++++	++++
	7	++++	++++	++++	++++	++++
30 °C	2.2	-	-	-	-	-
	3	++++	++++	+++	++	+
	4	++++	++++	++++	++++	++++
	5	++++	++++	++++	++++	++++
	7	++++	++++	++++	++++	++++
40 °C	2.2	-	-	-	-	-
	3	++++	-	-	-	-
	4	++++	+++	++	+	-
	5	++++	++++	++++	++++	++++
	7	++++	++++	++++	++++	++++
		Örnek alma süresi (dk)				
		0	10	20	30	40
50 °C	2.2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	++++	-	-	-	-
	5	++++	+++	++	+	+
	7	++++	++++	++++	+++	++

++++: çok yoğun üreme (sayılamayacak kadar çok koloni)

+++ : yoğun üreme (200 den fazla koloni)

++: az yoğun (200 koloniden az)

+: çok az (1-30 koloni)

-: gelişme yok

Çizelge 7: % 40 sonikasyon kullanılarak, farklı sıcaklık ve pH' larda yapılan var/yok denemelerinin sonuçları.

Sıcaklık	pH	Sonikasyon süresi (dk)					
		0	5	10	15		
4°C	2.2	++++	+	-	-		
	3	++++	+++	+	-		
20 °C	2.2	++++	-	-	-		
	3	++++	+	-	-		
		0	2	4	8	12	16
	7	++++	++++	++++	+++	+	+
		0	5	10	15		
30 °C	3	++++	-	-	-		
	4	++++	-	-	-		
40 °C	3	++++	-	-	-		
	4	++++	-	-	-		
	5	++++	+	-	-		
50 °C	4	++++	-	-	-		
	5	++++	-	-	-		
	7	++++	-	-	-		

++++: çok yoğun üreme (sayılamayacak kadar çok koloni)

+++ : yoğun üreme (200 den fazla koloni)

++: az yoğun (200 koloniden az)

+: çok: az (1-30 koloni)

-: gelişme yok

Çizelge 8: % 80 sonikasyon kullanılarak, farklı sıcaklık ve pH' larda yapılan var/yok denemelerinin sonuçları

Sıcaklık	pH	Sonikasyon süresi						
		0 dk	1 dk	2 dk	3 dk	4 dk		
4°C	2.2	++++	++++	++++	+++	++		
	3	++++	++++	++++	++++	+++		
20 °C	2.2	++++	+++	+++	+++	++		
	3	++++	++++	+++	+++	+++		
		0 dk	1 dk	2 dk	4 dk	6 dk	8 dk	
	7	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
30 °C		0	30 sn	60 sn	90 sn	120 sn		
	3	++++	++++	+++	++	++		
	4	++++	++++	++++	++++	+++		
40 °C	3	++++	++++	++	+	-		
	4	++++	++++	+++	+++	+++		
	5	++++	++++	+++	+++	+++		
50 °C	4	++++	-	-	-	-		
	5	++++	+	-	-	-		
	7	++++	+	-	-	-		

++++: çok yoğun üreme (sayılamayacak kadar çok koloni)

+++ : yoğun üreme (200 den fazla koloni)

++: az yoğun (200 koloniden az)

+: çok: az (1-30 koloni)

-: gelişme yok

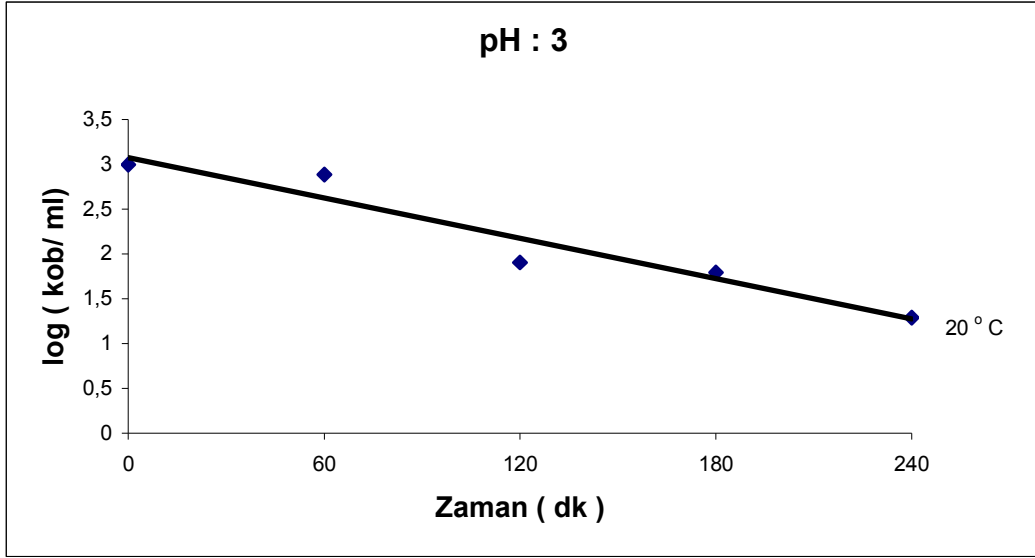
Sonikasyon uygulanmayan *L. monocytogenes* kültür süspansiyonundan alınan 0.02 ml' lik örnekte yaklaşık 10^4 kob olduğu düşünülürse “ – ” ile ifade edilen sonuçlarda, kültürde en az 4 *D* düzeyinde inaktivasyon meydana geldiği söylenebilir. Buna dayanarak Çizelge 4, 5 ve 6'dan tampon ortamında *L. monocytogenes*'in çeşitli sıcaklık pH ve sonikasyon düzeyi kombinasyonlarında 4 *D* azaldığı işlem sürelerini görmek ve tahmin etmek mümkün olmaktadır. Aradaki farklı sayıda “+” lar ile gösterilen değerler de bize yarı kantitatif bir değerlendirme yapma imkanı vermektedir.

3.6. Yapılan var/yok çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre seçilen sıcaklık, pH ve sonikasyon kombinasyonlarında yapılan inaktivasyon çalışmaları:

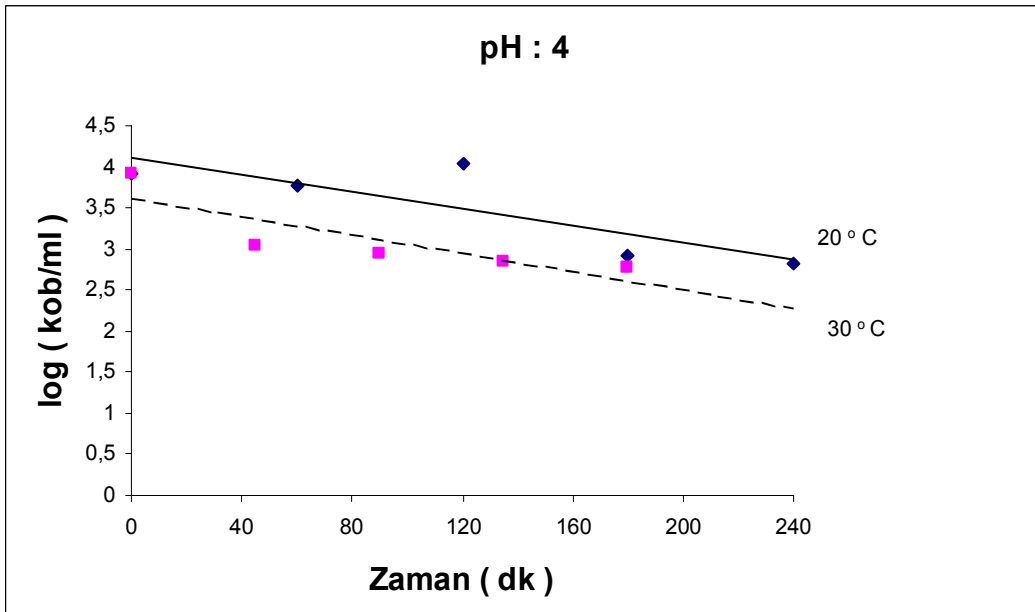
Farklı ortam koşullarının sonikasyon işlemi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan var/yok testlerinden elde edilen bilgilerin ışığında, *D* değerlerinin belirleneceği sıcaklık, pH, ve sonikasyon kombinasyonları seçilmiştir.

3.6.1.Sonikasyon uygulanmaksızın, farklı sıcaklık ve pH' da yapılan inaktivasyon çalışması:

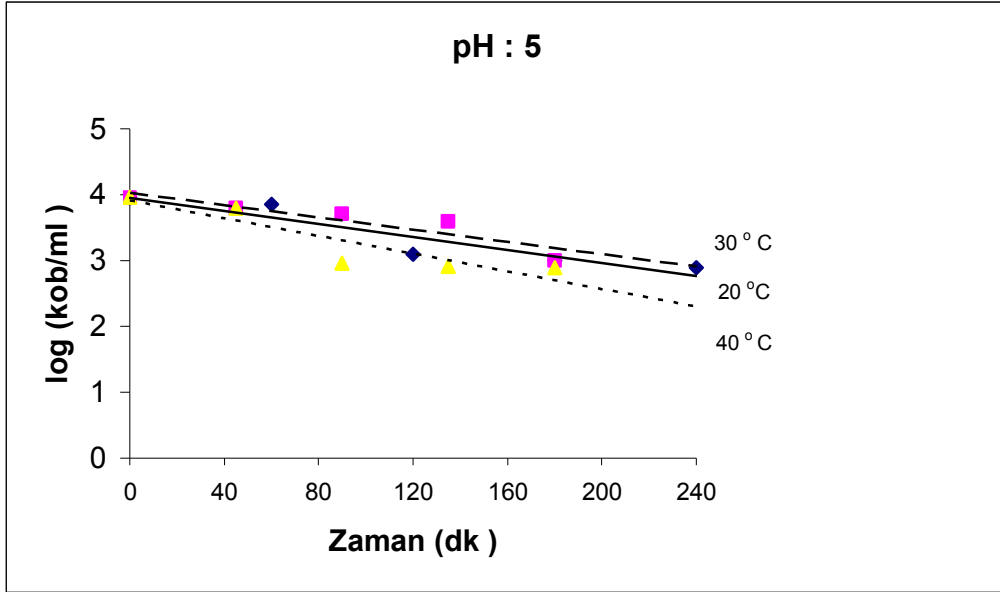
L. monocytogenes inaktivasyonunda ultrasoundun etkisini ortaya koymak amacıyla sadece farklı pH ve sıcaklığın kullanıldığı çalışmaların sonucu Şekil 8-11' de görülmektedir.



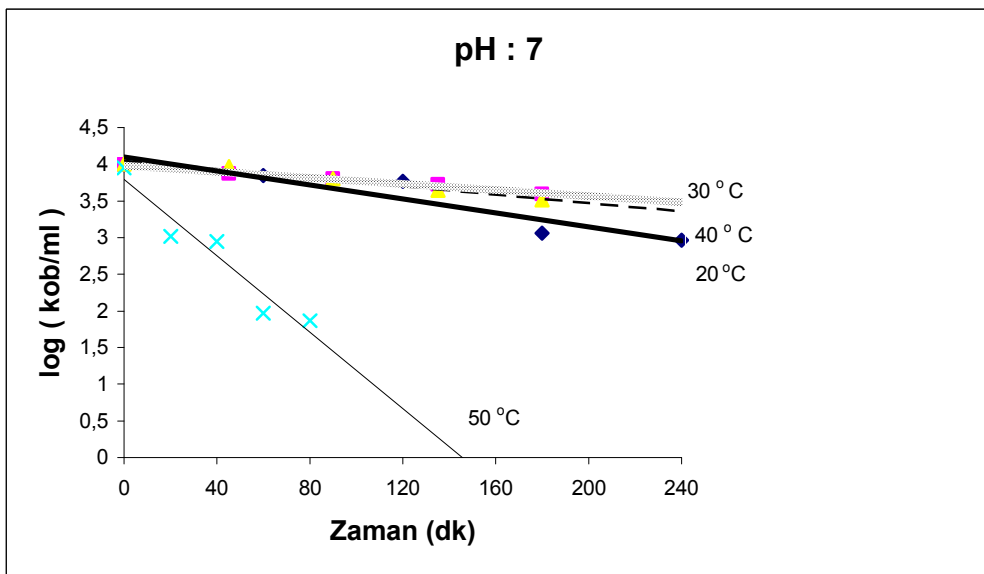
Şekil 8: 20 °C' de ve pH=3' de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması.



Şekil 9: 20 ve 30 °C' de ve pH=4' de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması.



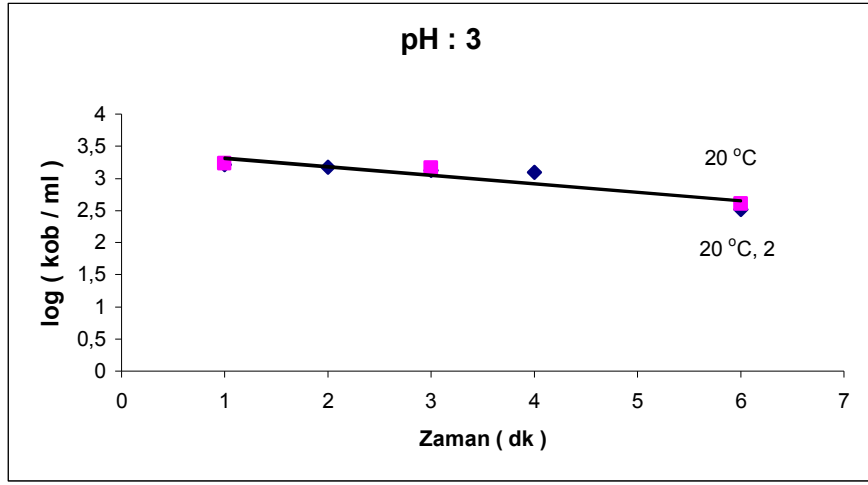
Şekil 10: 20, 30 ve 40 °C' de ve pH=5' de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması.



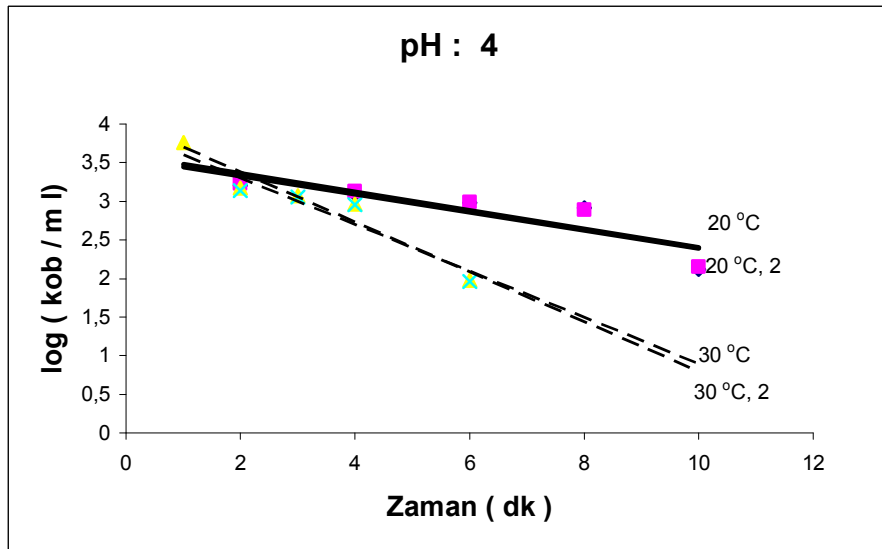
Şekil 11: 20, 30, 40 ve 50 °C de ve pH=7 de, sonikasyon uygulanmaksızın yapılan inaktivasyon çalışması.

3.6.2. % 40 amplitüdde, farklı sıcaklık ve pH' da yapılan sonikasyon çalışmaları:

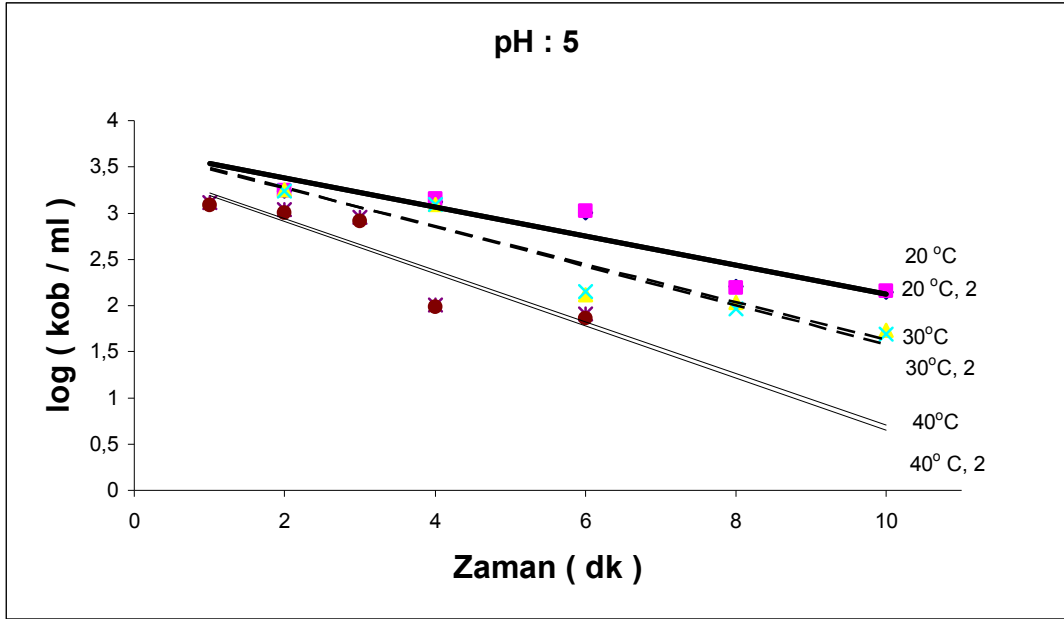
10 ml' lik sonikasyon haznesinde % 40 amplitüd kullanılarak elde edilen *L. monocytogenes* inaktivasyonunun zamana bağlı değişimleri Şekil 12, 13, 14 ve 15' de verilmiştir. İki tekrarlı yapılan çalışmalar sonrası elde edilen her iki grup sonuç grafiğe yansıtılmıştır (2 no' lu eğriler).



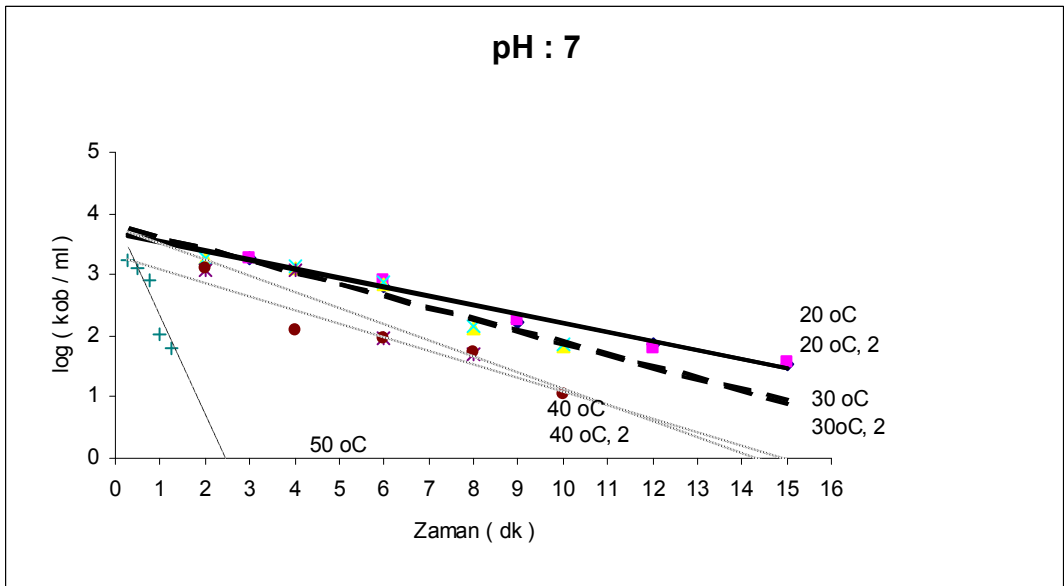
Şekil 12: 20 °C' de ve pH=3 'de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.



Şekil 13: 20 ve 30 °C' de ve pH=4 'de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.



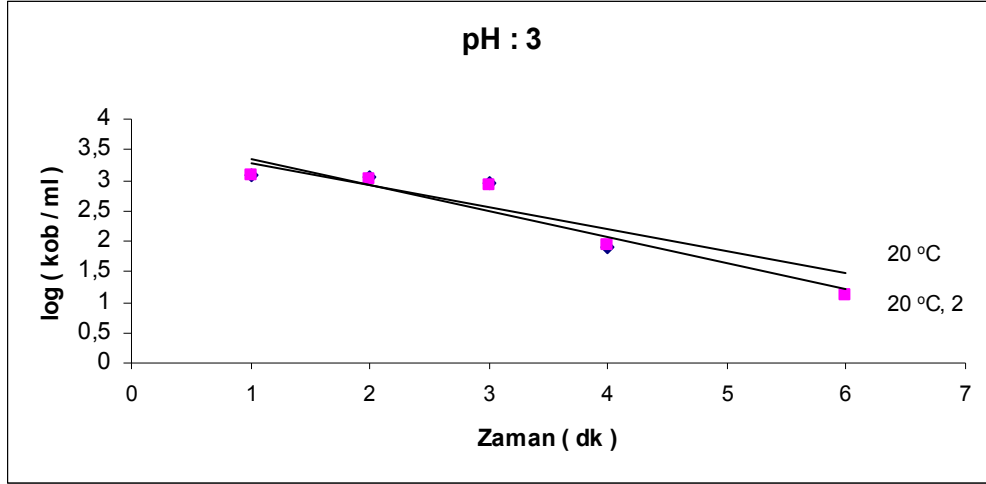
Şekil 14: 20, 30 ve 40 °C' de ve pH= 5' de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.



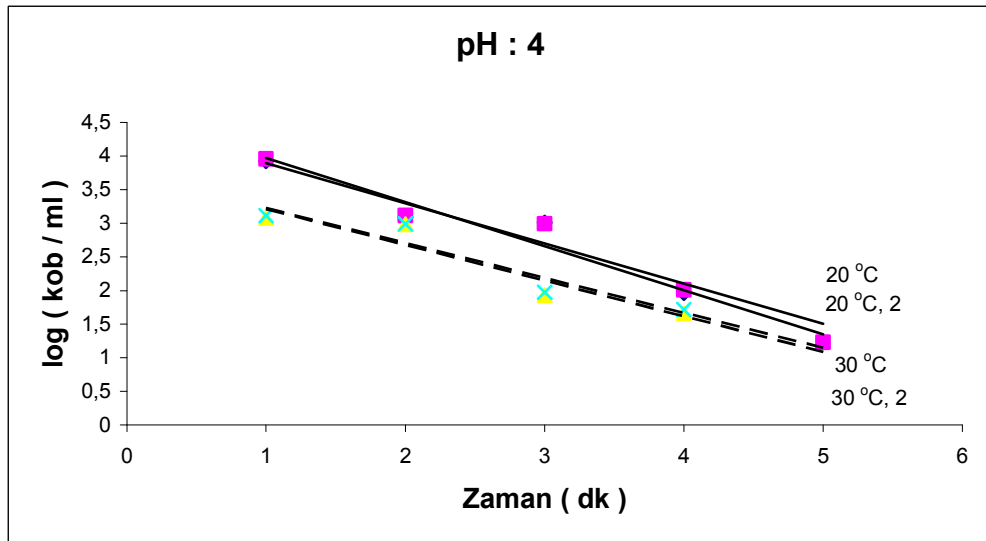
Şekil 15: 20, 30, 40, 50 °C' de ve pH=7' de, % 40 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.

3.6.3. % 80 amplitüdde, farklı sıcaklık ve pH' da yapılan sonikasyon çalışmaları:

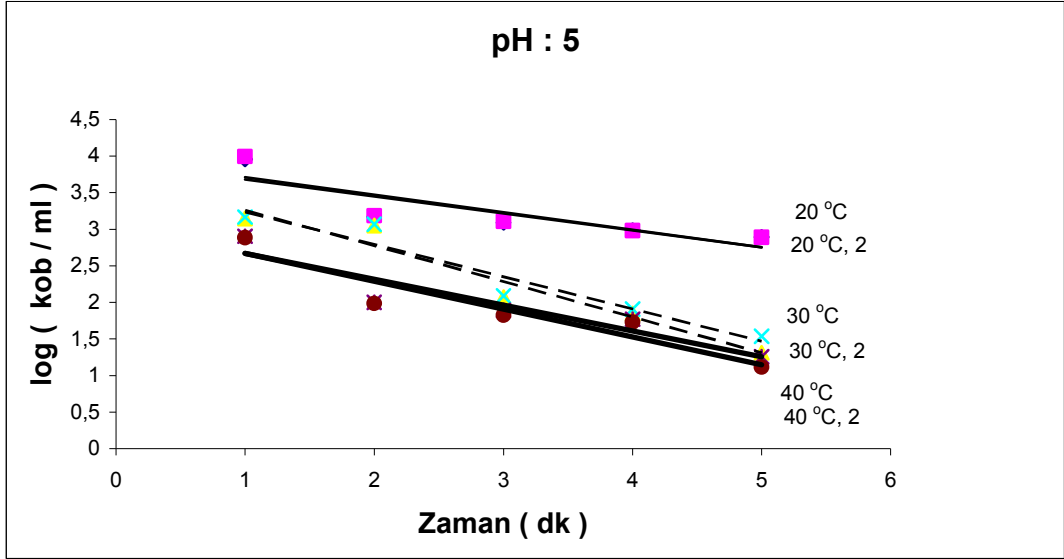
% 80 sonikasyon uygulanarak elde edilen inaktivasyonun zamana bağlı değişimleri ise Şekil 16, 17, 18 ve 19' da verilmiştir.



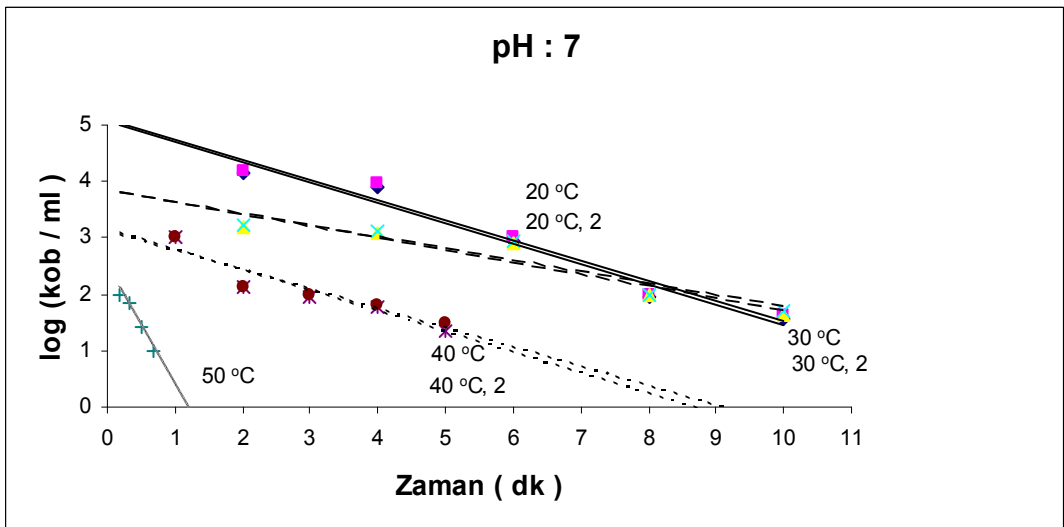
Şekil 16: 20 °C' de ve pH= 3' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.



Şekil 17: 20 ve 30 °C' de ve pH= 4' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.



Şekil 18: 20, 30 ve 40 °C' de ve pH= 5' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.



Şekil 19: 20, 30, 40 ve 50 °C'de ve pH= 7' de, % 80 sonikasyon uygulanarak ve iki paralel halinde yapılan inaktivasyon çalışması.

Şekiller incelendiğinde kolaylıkla görüleceği üzere sıcaklık 40 ve 50 °C' ye yükseldiğinde ve pH düşük değerlerinde inaktivasyon çok daha fazla olmaktadır. Yine düşük pH ve yüksek sıcaklıkta sonikasyonun etkinliği daha fazla olmaktadır.

Bu durum D değerleri incelendiğinde daha açık görülmektedir.

Çizelge 9' da bu çalışmada elde edilen regresyon denklikleri, bunların determinasyon katsayıları ile bu denkliklerden hesaplanan D değerleri verilmiştir.

Çizelge 9: Farklı sonikasyon, farklı sıcaklık ve farklı pH kombinasyonlarından elde edilen regresyon denklemleri, determinasyon katsayıları ile bu denklemlerden hesaplanan D değerleri.

Sonikasyon	Sıcaklık	pH	Reg.denk.	D_ değerleri	log D
0	20	3	$y = -0,0075x + 3,0751$	133,33333	2,1249387
0	20	4	$y = -0,0051x + 4,1014$	196,07843	2,2924298
0	20	5	$y = -0,0049x + 3,9494$	204,08163	2,3098039
0	20	7	$y = -0,0047x + 4,0971$	212,76596	2,3279021
0	30	4	$y = -0,0055x + 3,6009$	181,81818	2,2596373
0	30	5	$y = -0,0046x + 4,0258$	217,3913	2,3372422
0	30	7	$y = -0,0021x + 3,9867$	476,19048	2,6777807
0	40	5	$y = -0,0067x + 3,9097$	149,25373	2,1739252
0	40	7	$y = -0,0029x + 4,0443$	344,82759	2,537602
0	50	7	$y = -0,0261x + 3,7941$	38,314176	1,5833595
40	20	3	$y = -0,1342x + 3,4577$	7,4515648	0,8722475
40	20	3	$y = -0,1309x + 3,4353$	7,6394194	0,8830604
40	20	4	$y = -0,1174x + 3,5655$	8,5178876	0,9303319
40	20	4	$y = -0,1194x + 3,5952$	8,3752094	0,9229957
40	20	5	$y = -0,1555x + 3,6772$	6,4308682	0,8082696
40	20	5	$y = -0,1568x + 3,6951$	6,377551	0,8046539
40	20	7	$y = -0,1461x + 3,6652$	6,844627	0,8353498
40	20	7	$y = -0,1495x + 3,7024$	6,6889632	0,8253588
40	30	4	$y = -0,3233x + 4,0253$	3,0931024	0,4903943
40	30	4	$y = -0,3008x + 3,9044$	3,3244681	0,5217222
40	30	5	$y = -0,2054x + 3,678$	4,8685492	0,6873996
40	30	5	$y = -0,2118x + 3,6976$	4,7214353	0,674074
40	30	7	$y = -0,1934x + 3,7909$	5,1706308	0,7135435
40	30	7	$y = -0,1906x + 3,8025$	5,2465897	0,7198771
40	40	5	$y = -0,2788x + 3,4965$	3,5868006	0,5547072
40	40	5	$y = -0,2819x + 3,4734$	3,5473572	0,5499049
40	40	7	$y = -0,2638x + 3,7788$	3,7907506	0,5787252
40	40	7	$y = -0,2227x + 3,3266$	4,4903458	0,6522798
40	50	7	$y = -1,5847x + 3,7967$	0,6310343	-0,199947
80	20	3	$y = -0,3659x + 3,659$	2,7329872	0,4366376
80	20	3	$y = -0,4212x + 3,7557$	2,374169	0,3755116
80	20	4	$y = -0,5965x + 4,4882$	1,6764459	0,2243896
80	20	4	$y = -0,6559x + 4,6288$	1,5246227	0,1831624
80	20	5	$y = -0,2313x + 3,9126$	4,3233895	0,6358244
80	20	5	$y = -0,2412x + 3,9553$	4,145937	0,6176227
80	20	7	$y = -0,3584x + 5,051$	2,7901786	0,445632
80	20	7	$y = -0,3553x + 5,0837$	2,8145229	0,4494048
80	30	4	$y = -0,5309x + 3,743$	1,8835939	0,2749873
80	30	4	$y = -0,52x + 3,7482$	1,9230769	0,2839967
80	30	5	$y = -0,4876x + 3,7488$	2,0508614	0,3119363
80	30	5	$y = -0,4417x + 3,6783$	2,2639801	0,3548726
80	30	7	$y = -0,2128x + 3,8329$	4,6992481	0,6720284
80	30	7	$y = -0,2069x + 3,8401$	4,8332528	0,6842395
80	40	5	$y = -0,3532x + 3,0249$	2,8312571	0,4519793
80	40	5	$y = -0,3799x + 3,049$	2,6322717	0,4203307
80	40	7	$y = -0,3636x + 3,1294$	2,750275	0,4393761
80	40	7	$y = -0,3427x + 3,1188$	2,9180041	0,4650859
80	50	7	$y = -2,0866x + 2,4312$	0,4792485	-0,319439

Çizelge 9’da da görüldüğü gibi tampon ortamında pH=7’ de 20-40 °C gibi sıcaklıklarda hiçbir işlem yapılmadan doğal (muhtemelen açlık stresi vb.) nedenlerle *L. monocytogenes*’ in kendiliğinden inaktivasyonuna ait *D* değerleri 212,76-344.82 dakika arasında değişirken, % 40 sonikasyon uygulamasında *D* değeri aynı pH ve sıcaklıklarda 6.76-4.14 dakikaya inmiştir. %80 sonikasyonda ise *D* değerleri 2.80- 2.83 dakika olmuştur.

Benzer oransal etki düşük pH ve/veya yüksek sıcaklıkta yapılan sonikasyon uygulamalarında da görülmektedir. Aşağıda sıcaklık, pH ve sonikasyonun *D* değerleri ve bunların logaritmik çevrimleri üzerine kombine etkisine ait varyans analizi Çizelge 10 ve 11’ de görülmektedir.

Çizelge 10: Sıcaklık, pH ve sonikasyonun *D* değerleri ve bunların logaritmik çevrimleri üzerine kombine etkisinde kullanılan faktörler ve düzeyleri.

		N
S-Sonik.(%)	,00	10
	40,00	19
	80,00	19
T-Sıcaklık (C)	20,00	20
	30,00	15
	40,00	10
	50,00	3
PH	3,00	5
	4,00	10
	5,00	15
	7,00	18

Çizelge 11: D Değerlerine Ait Varyans Analizi

Bağımlı değişken: D

Varyans Kaynağı	Tip III kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F	Sig.(önemlik)
Düzeltilmiş model	482810,128(a)	29	16648,625	617124,523	,000
Sabit	129315,236	1	129315,236	4793405,032	,000
S	196780,230	2	98390,115	3647085,113	,000
T	33014,199	3	11004,733	407919,005	,000
PH	25403,942	3	8467,981	313887,689	,000
S * T	58119,108	6	9686,518	359055,946	,000
S * PH	39679,233	6	6613,205	245135,632	,000
T * PH	12760,616	3	4253,539	157668,452	,000
S * T * PH	19420,266	6	3236,711	119977,096	,000
Hata	,486	18	,027		
Toplam	593642,675	48			
Düzeltilmiş toplam	482810,613	47			

a R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = 1,000)

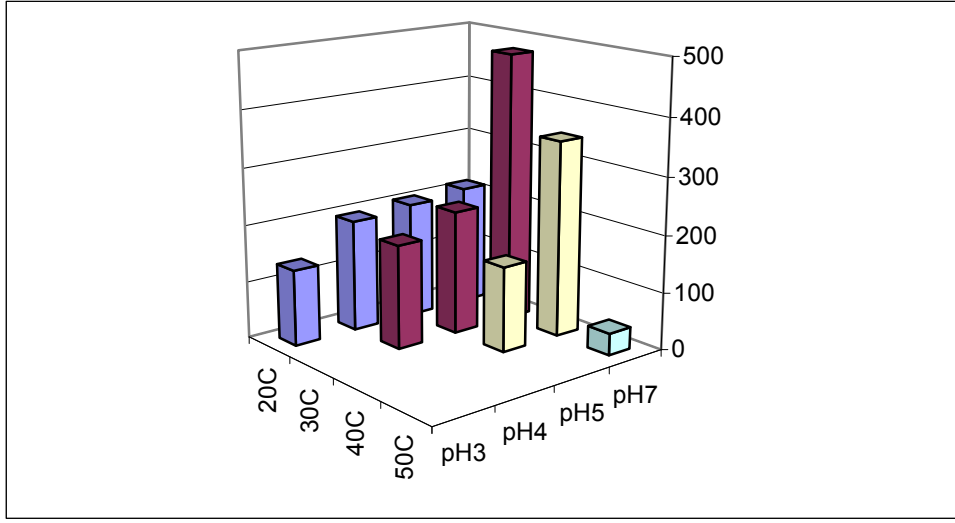
Çizelge 12: D Değerlerinin Logaritmik Çevrimlerinin Varyans Analizi

Dependent Variable: LOG_D

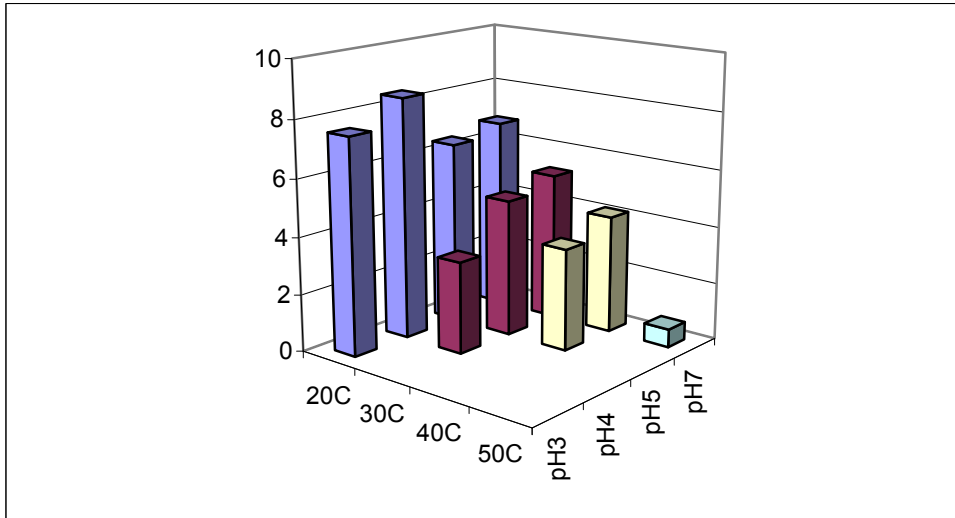
Var. Kaynağı	Tip III kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F	Sig.(önemlik)
Düzeltilmiş model	27,272(a)	29	,940	2060,017	,000
Sabit	32,665	1	32,665	71554,338	,000
S	19,572	2	9,786	21437,029	,000
T	2,056	3	,685	1500,960	,000
PH	,241	3	,080	175,865	,000
S * T	,156	6	,026	57,058	,000
S * PH	,142	6	,024	51,874	,000
T * PH	,125	3	,042	91,026	,000
S * T * PH	,140	6	,023	51,048	,000
Hata	,008	18	,000		
Toplam	65,545	48			
Düzeltilmiş toplam	27,280	47			

a R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = ,999)

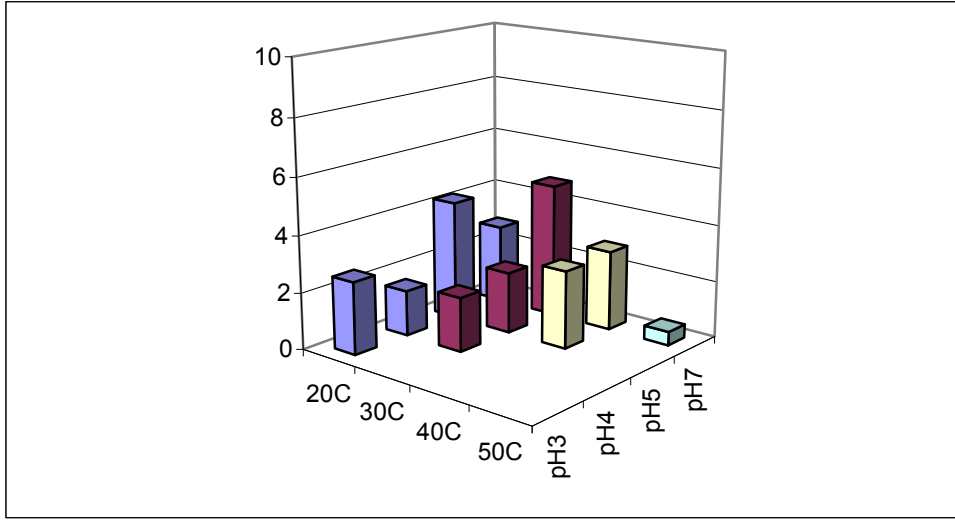
Çizelge 11 ve 12 incelendiğinde ele alınan 3 faktörün ve interaksiyonlarının *D* değerlerinin değişimini %100 yani tam olarak açıkladığı (determinasyon katsayısı, $R^2=1.00$) görülmektedir. Bu oldukça mükemmel bir durumdur. Bu durumda her bir faktörün ve interaksiyonunun *D* değerlerini nasıl etkilediği aşağıda şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 20: Sonikasyonsuz ortamda farklı sıcaklık ve pH'nın *L. monocytogenes*' in *D* değerleri üzerine etkisi.

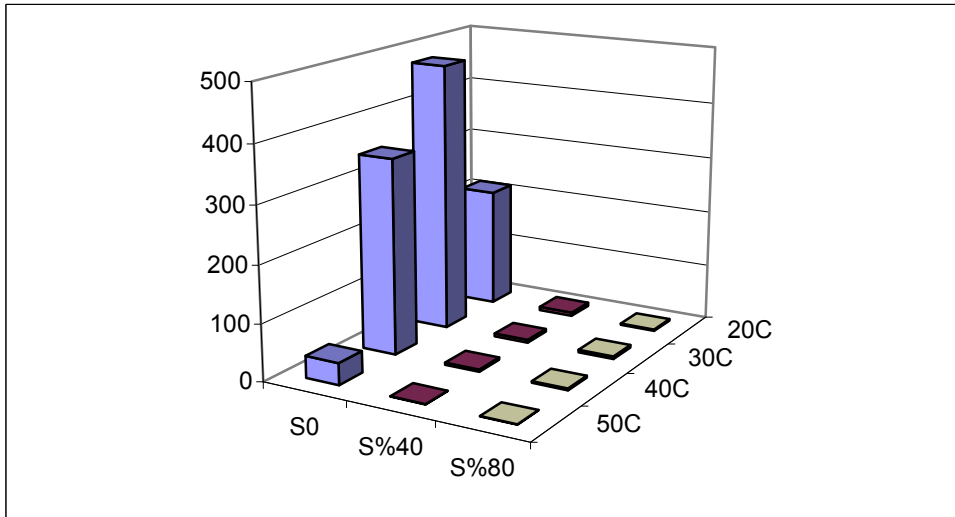


Şekil 21: %40 yoğunlukta sonikasyon uygulandığı ortamda farklı sıcaklık ve pH'nın *L. monocytogenes*' in *D* değerleri üzerine etkisi.

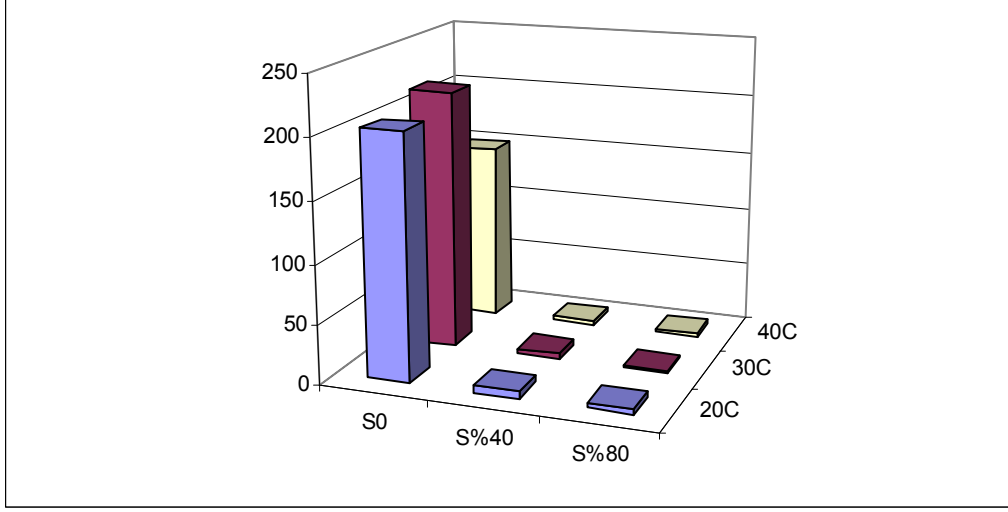


Şekil 22: %80 yoğunlukta sonikasyon uygulandığı ortamda farklı sıcaklık ve pH'nın *L. monocytogenes*' in D değerleri üzerine etkisi.

Benzer şekilde farklı pH' larda sonikasyon ve sıcaklığın birlikte etkisi şekil 23' de gösterilmiştir



Şekil 23: pH 7' de D değerleri üzerine sıcaklık ve sonikasyonun birlikte etkisi.



Şekil 24: pH=5' de D değerleri üzerine sıcaklık ve sonikasyonun birlikte etkisi.

4. TARTIŞMA

4.1. 100 ml' lik sonikasyon haznesinde 6 farklı sıcaklık kullanılarak, % 40 amplitüde gerçekleştirilen sonikasyon işleminden elde edilen sonuçlar:

Bu işlemde sıcaklık 4 °C' den 50 °C' ye kadar yükselirken *D* değerlerinde de buna paralel bir azalma gözlenerek, 25.38' den 1.97' ye (sırasıyla 4 °C ve 50 °C) düşmüştür.

Ultrasonik dalgaların *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerindeki etkisini, sıcaklık etkisi ile birlikte değerlendiren bir çalışma, 23 ml citrat tamponu içeren bir sonikasyon haznesinde yapılmıştır (Pagan ve ark., 1999a). Bu çalışmada 40 °C' de, 62-150 µm (20 kHz) arasında artan amplitüd değerlerinde, başlangıçtaki bakteri sayısının (N_0) 5 logaritmik devre kadar azaldığı ve inaktivasyon düzeyinin amplitüd artışıyla birlikte eksponansiyel olarak arttığı belirtilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise 49.6 µm amplitüd, 100 ml hacim ve 40 °C sıcaklık koşullarında elde edilen *D* değeri 11.89 olmuştur. Başlangıçtaki hücre sayısı yaklaşık 3 logaritmik birim azalmıştır (Şekil 1). Çalışmamızda kullanılan sonikasyon hacminin 100 ml ve amplitüdün ve 49.6 µm olması nedeniyle Pagan ve ark' nın (1999a) sonuçlarından daha az bir inaktivasyon düzeyi gözlenmiştir.

4.2. Sonikasyon uygulamalarında kullanılan başlık tipinin *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerindeki etkisi:

Kullanılan başlığın çapı ve seçilen amplitüd değeri sonikasyonun şiddetini belirlemektedir. Bu durumun *L. monocytogenes* inaktivasyonunu ne derecede etkilediğini belirlemek için 13 mm (solid prob, %40= 49.6 µm ve %80= 99.2 µm amplitüde) ve 3 mm (stepped microtip %40 amplitüde 84.4 µm) olmak üzere iki tür başlık kullanılmıştır.

13 mm solid prob kullanıldığında 30 ve 40 °C' lerde birbirine yakın (sırasıyla 2.96 ve 2.49) sonuçlar elde edilmiştir. 3 mm stepped microtip kullanıldığında ise *D* değerleri 30 ve 40 °C' ler için sırasıyla 25.06 ve 12.65 olmuştur.

E. coli inaktivasyonu için, 20 kHz' lik sonikatör kullanılarak yapılan bir çalışmada, farklı prob yüzey alanlarının, sonikasyon işlemini nasıl etkilediğini araştıran bir çalışma yapılmıştır. Bu amaçla 1.08, 4.6 ve 30.7 cm²' lik prob alanına sahip başlıklar kullanılarak oksijenle doyurulmuş 300 ml hacimde sonikasyon denemeleri yapılmıştır. Farklı amplitüdlere kullanıldığında *D* değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık gözlemlendiğini ve inaktivasyonun yüksek amplitüde daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (Hua ve Thompson, 2000).

Farklı prob lar ile farklı *D* değerlerinin elde edilmesinin prob çapından kaynaklandığı düşünülmektedir. Problar, konverter tarafından oluşturulan vibrasyon şiddetini arttıran mekanik transformer' larıdır. Küçük prob çapı daha yoğun bir kaviteasyon enerjisi yaratmakta ancak buna karşılık enerjinin yayıldığı alan daralmaktadır. Buna ters olarak büyük prob çapı daha az yoğun bir kaviteasyon enerjisi yaratmakta ve enerjinin yayıldığı alan daha genişlemektedir (Goodwin, 1990).

4.3. İnaktivasyon çalışmalarında kullanılan farklı pH değerlerinin *L. monocytogenes* inaktivasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan ön çalışma:

İnaktivasyon üzerine pH' nın etkisi (pH=4 ve pH=7) öncelikle 30 ve 40 °C' lerde denemiştir. Genel olarak pH= 4' de yapılan sonikasyon uygulamalarında her iki sıcaklık için de *D* değerleri daha az olmuştur. pH=7' de 30 ve 40 °C' lerde elde edilen *D* değerleri sırasıyla 8.19 ve 3.8 dir. pH=4' de, 30 ve 40 °C' lerde elde edilen *D* değerleri ise sırasıyla 6.39 ve 1.73 olarak belirlenmiştir.

L. monocytogenes inaktivasyonunda, sonikasyon uygulanacak çözeltinin pH' sının, manosonikasyon (MS) işlemi (117 µm, 200 kPa, 40 °C) üzerine etkisi Pagan ve ark. (1999a) tarafından belirlenmiştir. Bu çalışma sonunda pH=7' den pH=4'e düştüğünde *L. monocytogenes* için belirlenen *D*_{MS} değerlerinde önemli bir farklılık gözlenmediğini bildirmişlerdir.

4.4. Kullanılan farklı sonikasyon şiddetinin (amplitüd) ve diğer ortam koşulları ile kombine edildiği çalışmaların *L. monocytogenes*' in *D* değerleri üzerine etkisi:

Bu çalışmada *L. monocytogenes*' in inaktivasyonunda, sonikasyonun şiddeti (% 0, 40 ve 80), farklı sıcaklık (20, 30, 40 ve 50 °C) ve farklı pH ların (3, 4, 5 ve 7) etkisi araştırılmış ve sonikasyon yapılan ortamlardan belirli aralıklarda örnek alınarak, canlı kalan hücrelerin sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler, birinci dereceden reaksiyon kinetiği ile yorumlanmıştır.

L. monocytogenes' in inaktivasyonunda % 0, 40 ve 80 amplitüdde sonikasyonun uygulandığı, pH' ın 7 ve ortam sıcaklığının 50 °C olduğu çalışmalardan elde edilen *D* değerleri sırasıyla 38.31, 0.63 ve 0.47 dk olmuştur. Buradan, sonikasyon şiddeti arttıkça *D* değerlerinin giderek azaldığı oldukça açık görülmektedir. Aynı koşullarda fakat sıcaklığın 40 °C olduğu durumda ise, *D* değerleri sırasıyla 344.82, 4.14 ve 2.83 olmuştur. Sıcaklık 20 °C olduğunda *D* değerleri sırasıyla 212.76, 6.76 ve 2.80 olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 10 derecelik düşüşlerinde giderek daha büyüyen *D* değerleri elde edilmiş, yine amplitüd artışıyla inaktivasyon düzeyi arasında paralellik gözlenmiştir. Aynı durum sıcaklığın 30 °C olduğu sonikasyon çalışmaları için de geçerlidir.

D değerleri sonikasyon ortamının pH' sının, sonikasyon ile beklenen bakteri inaktivasyonunu nasıl etkilediği" açısından incelendiğinde, ise şöyle bir durum ortaya çıkmaktadır;

% 0 ve 40 amplitüd şiddetinde, 20 °C ve pH 3' de uygulanan sonikasyon sonrasında elde edilen *D* değerleri sırasıyla 133.33 ve 7.54 dk olarak bulunmuştur. Aynı koşullarda, ancak pH= 4, 5 ve 7 için bulunan *D* değerleri sırasıyla; 196.07/8.44, 204.08/6.40, 212.76/6.76 olmuştur. Sonikasyonsuz çalışmalardan elde edilen *D* değerlerinin, pH yükseldikçe arttığı belirlenmiştir (*L. monocytogenes*' in bu koşullarda %90 ını öldürmek için geçen süre pH= 7 olduğunda %62 artmıştır, 1.5 kez). % 40 sonikasyon şiddetinin, farklı pH' lara sahip ortamlara uygulanmasından elde edilen *D* değerleri, ortamının pH' ının 7 den 3' e düşmesiyle sonikasyon işleminin etkinliğini çok fazla değiştirmedeğini göstermektedir.

% 0 ve 80 amplitüd şiddetinde, 20 °C ve pH 3' de uygulanan sonikasyon sonrasında elde edilen *D* değerleri sırasıyla 133.33 ve 2.55 dk olarak bulunmuştur. Aynı

koşullarda, ancak pH=4, 5 ve 7 için bulunan *D* değerleri sırasıyla; 196.07/1.59, 204.08/4.23, 212.76/2.8 olmuştur. % 80 amplitüdde elde edilen *D* değerleriyle % 40 amplitüddelerle karşılaştırıldığında, aynı pH değerlerinde, daha küçük *D* değerleri elde edilişi *L. monocytogenes* inaktivasyonundaki asıl etkenin uygulanan ses dalgaları olduğunu göstermektedir.

% 40 amplitüd, 40 °C, pH =5 ve 7' de yapılan sonikasyon çalışmalarından elde edilen *D* değerleri sırasıyla 3.56 ve 4.14, yine aynı koşullarda % 80 amplitüdde yapılan sonikasyon çalışmalarından elde edilen *D* değerleri ise sırasıyla 2.73 ve 2.83 olmuştur. % 80 amplitüdde yapılan sonikasyon çalışmalarındaki inaktivasyon düzeyi, % 40' a oranla daha yüksek olmuştur. Hiç sonikasyon yapılmamış farklı pH' daki ortamlarda *L. monocytogenes* inaktivasyonu için belirlenen *D* değerleri, aynı pH' daki % 40 ve 80 şiddette sonikasyon uygulanmış ortamlardaki *D* değerleriyle karşılaştırıldığında sonikasyonun oldukça güçlü bir inaktivasyon meydana getirdiği gözlenmiştir.

Sıcaklığın ultrasonik dalgaların bakterisit etkisini oldukça önemli derecede etkilediği sonucuna da varılmıştır. Sonikasyon uygulanmadan, pH=7' de, 20 ve 50 °C' deki *D* değerleri sırasıyla 212.76 ve 38.31 olduğu halde, % 40 sonikasyon şiddeti ile sonikasyon yapılan aynı ortamdaki *D* değerleri 6.76 ve 0.63, %80 amplitüddeki *D* değerleri ise 2.80 ve 0.47 olmuştur.

4.5. Farklı ortam koşulları ile birlikte uygulanan sonikasyon işlemleri arasında gözlenen benzerliklerin istatistiksel yorumu

Çalışmalarda da *L. monocytogenes* inaktivasyon değerlerinin belirlenmesinde, 1. derece reaksiyon kinetiği kullanılmıştır. pH, sıcaklık ve amplitüd gibi değişkenlere bağlı olarak *D* değerleri arasındaki farklılıkların önemi de Varyans analizi ile belirlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda da aynı kinetik ve istatistiksel metodlar kullanılmıştır (Raso, ve ark., 1998; Pagan ve ark, 1999a; Guerrero ve ark., 2001;).

5. SONUÇ

Sonuç olarak denenen bazı pH ve sıcaklık değerlerinde, 20 kHz frekansta, 49.6 µm ve 99.2 µm amplitüde uygulanan ultrasonik dalgaların *L. monocytogenes* inaktivasyonunda sinerjistik bir etki gösterdiği söylenebilmektedir.

Bu sinerjistik etkileşim, pratikte kullanımı açısından umut vaad etmektedir. Deneysel koşullarda kullandığımız parametreleri taşıması muhtemel benzer gıda maddelerinin kullanıldığı denemelere yansıtılarak, mikrobiyal inaktivasyon için spesifik veriler elde edilebilecektir. Ve böylelikle pastörizasyon vs. gibi ısı işlem kullanılarak muhafaza edilebilen gıda maddelerinin raf ömrünün arttırılmasında, *L. monocytogenes* gibi patojen mikroorganizmaların inaktivasyonu ile gıda güvenliğinin sağlanmasında, daha düşük sıcaklık kullanılarak besin değeri kayıplarını en aza indirmek mümkün olabilecektir.

KAYNAKÇA

- Anonymus, 2000, Food and Drug Administration Report, Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: Ultrasound. Published June 2, 2000 Available at <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift-us.html>
- Bellara, S.R., McFarlane, C.M., Thomas, C.R. and Fryer, P.J., 2000, The growth of *E. coli* in a food simulant during conduction cooling: combining engineering and microbiological modelling, Chemical Engineering Science, 55 , 6085-6095.
- Bozkurt, H. ve Erkmen, O., 2001, Predictive modeling of *Yersinia enterocolitica* inactivation in Turkish feta cheese during storage, Journal of Food Engineering, (47), 81-87.
- Buchanan, R.L. and Bagi, L.K., 1997, Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *E. coli* O 157: H7, Food Microbiology 14, 413-423.
- Butz, P. and Tauscher, B., 2002, Emerging Technologies: Chemical Aspects, Food Research International, 35(2/3), 279-284.
- Chorin, E., Thuault, D., Cleret, J.J. and Bourgeois, C.M., 1997, Modelling *Bacillus cereus* growth, International Journal of Food Microbiology 38,229-234.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., and Franson, M., 1995, Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC.

KAYNAKÇA(devam)

- Ertuğrul, N., Kunduhoğlu, B. ve Çoksöyler, N., 2003, *Escherichia coli* Kültüründe canlı Hücre Sayısının Değişimi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin Matematiksel Modellerle Belirlenmesi, 3.Gıda Mühendisliği Kongresi Dergisi, 657-671, Ankara
- Floros, J.D. and Liang, H., 1994, Acoustically asisted diffusion through membranes and biomaterials, *Food Technol.*,48(12):79-84.
- Garcia, M.L., Burgos, J., Sanz, B. and Ordonez, J.A., (1989), Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*, *Journal of Applied Bacteriology* 67, 619-628.
- Giffel, M.C. and Zwietering, M.H., 1999, Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 46 , 135-149
- Goodvin, T.J., 1990, Equipment (Ed: Mason, T.J. in *Chemistry with ultrasound*), 159-187.
- Guerrero, S., Lopez-malo, A. and Alzamora, S.M., 2001, Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 31-39.
- Gürgün, V. ve Halkman, K.A., 1990, *Mikrobiyolojide sayım Yöntemleri*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, 2. Baskı, Ankara.
- Hoover, D.G., 2000, Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: Ultrasound. *Journal of Food Science* 93-95 (Suppl.).
- Hua, T. and Thompson, J.E., 2000, Inactivation of *E. coli* by Sonication at Discrete Ultrasonic Frequencies, *Science No: 15*, 3888-3893.

KAYNAKÇA(devam)

Hughes, D.E. and Nyborg, W.L., 1962, Cell disruption by ultrasound, *Science* 38, 108-114.

Hülßen, U., 1999, Alternative heat treatment processes, *European Dairy Magazine* 3, 20-24.

Jimenez-Munguia, M.T., Arce-Garcia, M.R., Argáiz, A., Palou, E. and Lopez-Malo, A., 2001, Mold spore inactivation during cavitation due to ultrasound treatments, IFT 2001 Annual Meeting Technical Program, Abstracts, 154.

Johnson, L.L., Peterson, R.V. and Pitt, W.G., 1998, Treatment of bacterial biofilms on polymeric biomaterials using antibiotics and ultrasound, *Journal of Biomaterial Science, Polymer Ed.*, 9 (11), 1177-1185.

Lee, B.H., Kermasha, S. and Baker, B.E., 1989, Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of *salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate, *Food Microbiology* 6, 143-152.

Leistner, L. And Gorris, L.G.M., 1995, Food preservation by hurdle technology, *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 41-46.

Lillard, H.S., 1993, Bactericidal effect of chlorine on attached *salmonella* with and without sonication, *Journal of Food Protection*, 56 (8), 716-717.

Lillard, H.S., 1994, Decontamination of poultry skin by sonication, *Food Technology*, Dec., 72-73.

KAYNAKÇA(devam)

- Limaye, M.S. and Coakley, W.T., 1998, Clarification of small volume microbial suspensions in an ultrasonic standing wave, *Journal of Applied Microbiology* 84 (6), 1035-1042.
- Lopez-Malo, A., Jimenez-Fernandez, M. and Palou, E., 2001, *Penicillium digitatum* spores inactivation by combining thermoultrasonication treatments and antimicrobial agents, IFT 2001 Annual Meeting Technical Program, Abstracts, 151.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker J., 1997, *Brock Biology of Microorganisms*, PP. Eighth Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey
- McClements, D.J., 1995, Advances in application of ultrasound in food analysis and processing, *Trends in Food Science and Technology*, 6, (9), 293-299.
- Miles, C.A., Morley, M.J., Hudson, W.R. and Mackey, B.M., 1995, Principles of separating microorganisms from suspensions using ultrasound, *Journal of Applied Bacteriology* 78, 47-54.
- Mizrach, A., Galilli, N. and Rosenhouse, G., 1994, Determining quality of fresh products by ultrasonic excitation, *Food Technol.*,48(12):68-71.
- Ordenez, J.A., Sanz, B., Hernandez, P.E. and Lopez-Lorenzo, P., 1984, A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermotolerant streptococci, *Journal of Applied Bacteriology* 54, 175-177.
- Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Boistier, E., Blum, L.J. and Bonneau, M., 2000, The development of ultrasonic apparatus for noninvasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment, *Letters in Applied Microbiology* 30 (1), 47-52.

KAYNAKÇA(devam)

Öner, M., 1992, Mikroorganizmaların Büyümeleri, Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basım Evi, Yayın No: 6, Bornova İzmir.

Özhan, N., 2000, Şalgam suyunda *E. coli*' nin yaşama süresinin bulunması, Yüksek Lisans Tezi, ME.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

Özhan, N., Çoksöyler, N., 2005, Survival of *Escherichia coli* in traditional fermented turnip juice. J. Food Sci.Technol., 42 (1) 67-69.

Pagan, R., Manas, P., Alvarez, I. And Condon, S., 1998, Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (Manosonication) and lethal (Manothermosonication) temperatures. Food Microbiology.

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., Condon, S., (1999b), Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures, Applied and Environmental Microbiology, 65 (1), 297-300.

Piyasena, P., Mohareb E. and McKellar, R.C., 2003, Inactivation of microbes using ultrasound:a review. International Journal of Food Microbiology, 87: 207-216.

KAYNAKÇA(devam)

- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. and Roos, T., 1997, Modelling the growth rate of *e. coli* as a function of ph and lactic acid concentration, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 6, 2355-2360.
- Presser, K.A., Roos, T. and Ratkowsky, D.A., 1998, Modelling the growth limits (growth/ no growth interface) of *E. coli* as a function of temperature, ph, lactic acid concentration and water activity, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 5, 1773-1779.
- Raso, J., Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J., 1998, Influence of treatment and pressure on the lethality of ultrasound, *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), 465-471.
- Ross, T., Dalgaard, P. and Tienungon, S., 2000, Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products, *International Journal of Food Microbiology*, (62), 3, 231-245.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. and Flandrois, J.P., 1995, Convenient model to describe effects of temperature and ph on microbial growth, *Applied and Environmental Microbiology*,(61),2, 610-616.
- Sams, A.R. and Feria, R., 1991, Microbial effects of ultrasonication of broiler drumstick skin, *Journal of Food Science*, 56 (1), 247-248.
- Scherba, G., Weigel, R.M. and O'Brien, W.D., 1991, Quantitative assessment of germicidal efficacy of ultrasonic energy, *Applied and Environmental Microbiology* 57 (7), 2079-2084.

KAYNAKÇA(devam)

Seymour, I.J., Burfoot, D., Smith, R.L., Cox, L.A. and Lockwood, A., (2002),
Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables.
International Journal of Food Science & Technology 37, 547-557.

Skandamis, P.N. and Nychas, G.J., 2000, Development and evaluation of a model
predicting the survival of *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant
salad at various temperatures, pHs and Oregano essential oil concentrations,
Applied and Environmental Microbiology,(66),4, 1644-1653.

Skauen, D., 1976, A comparison of heat production and cavitation intensity in several
ultrasonic cell disrupters, Ultrasonics 14, 173-176.

Stumpf, P.K., Green, D.E. and Smith, F.W., 1946, ultrasonic disintegration as method
of extracting bacterial enzymes, Journal of Bacteriology 51, 487-493.

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
Engineering 45, 171-179.

Wijtzes, T., De Wit, J.C., Huis In' T Veld, J.H.J., Van't Riet, K., and Zwietering, M.H.,
1995, Modelling Bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of
acidity and temperature, Applied and Environmental Microbiology, (61),7,
2533-2539.

Wrigley, D.M. and Llorca,N.G., 1992, Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim
milk and egg by heat and ultrasonic waves treatment, Journal of Food Protection
55 (9), 678-680.

KAYNAKÇA(devam)

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Riet, K., 1999, Modelling of the bacterial growth curve, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 6, 1875-1881.

Zwietering, M.H., Koos, J.T., Hasenack, B.E., Will, J.C. and Riet, K.V., 1991, Modelling of bacterial growth as a Function of temperature, *Applied and Environmental Microbiology*,(57), 41094-1101.