

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

***Escherichia coli*'NİN TERMAL ÖLÜM SÜRESİ (TÖS), D- VE z-
DEĞERLERİNİN ORTAMA EKLENEN ASETİK ASİT VE TUZ
KONSANTRASYONUNA BAĞLI OLARAK DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Uğur KALAÇ
DANIŞMAN: Prof. Dr. F. Nafi ÇOKSÖYLER
İKİNCİ DANIŞMAN: Doç. Dr. Elvan OCAK

VAN-2016

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

***Escherichia coli*'NİN TERMAL ÖLÜM SÜRESİ (TÖS), D- VE z-
DEĞERLERİNİN ORTAMA EKLENEN ASETİK ASİT VE TUZ
KONSANTRASYONUNA BAĞLI OLARAK DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Uğur KALAÇ

VAN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER danışmanlığında, Uğur KALAÇ tarafından hazırlanan ‘*Escherichia coli*’nin Termal Ölüm Süresi (TÖS), D- ve z-Değerlerinin Ortama Eklenen Asetik Asit ve Tuz Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Belirlenmesi’ isimli bu çalışma 02/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER

İmza:

Üye : Doc. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

İmza:

Üye : Yrd. Doc. Dr. Bülent HALLAÇ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../..... gün ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Uğur KALAÇ

ÖZET

***Escherichia coli*'NİN TERMAL ÖLÜM SÜRESİ (TÖS), D- VE z-DEĞERLERİNİN ORTAMA EKLENEN ASETİK ASİT VE TUZ KONSANTRASYONUNA BAĞLI OLARAK DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ**

KALAÇ, Uğur

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nafi ÇOKSÖYLER

İkinci Danışman: Doç. Dr. Elvan OCAK

Aralık 2016, 71 sayfa

Bu çalışmada *E. coli*'nin 52-64 °C pH'sı 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 7.0'a getirilmiş; %0, 1, 2, 3 ve 5 oranında NaCl eklenmiş Nutrient Broth (NB) ortamında 4 ve 3 log devre azalmayı temsil eden Termal Ölüm Süreleri (TÖS) ve z-değerleri belirlenmiştir. Çalışmada inaktivasyon ortamından alınan örneklerin sıvı besi yerinde üredi üremedi testleri yerine 10⁴ hücreyi temsil eden 5µl'lik porsiyonları 3'er paralel halinde Nutrient Agar (NA) plakları üzerine ekim yapılmıştır. Tarafımızdan yapılan bu modifikasyon sonucunda klasik TÖS denemelerinde elde edilen üredi üremedi ikili sonuçlarına ilaveten çok az üredi (1-9 iğne başı koloni) gibi üçüncü bir sonuç ta çıkmaktadır. Yaptığımız çalışmada bu üçüncü değerler üzerinden çizilen TÖS eğrilerinin klasik olarak çizilen üredi/üremedi noktalarına göre çizilen TÖS eğrilerine nazaran verilerimizi istatistiki olarak daha iyi temsil ettiği görülmüştür. Bu bulgu tamamen bu çalışmada gözlenen orijinal bir gözlem olup daha detaylı çalışmalarla pekiştirilmelidir. Seçilen referans TÖS değeri (TÖS 58°C) üzerine tuzun ve pH'nın artırıcı etkisi görülmüştür. Tuzun z-değerleri üzerine etkisi artırıcı yönde olmuştur.

Anahtar kelimeler: D-değeri, *Escherichia coli*, pH, z-değeri

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF ACETIC ACID AND NaCl CONTENT ON THE PARAMETERS OF THERMAL DEAD TIME (TDT), D VALUE, z-VALUES OF *Escherichia coli*

KALAÇ, Uğur

M.Sc. Thesis, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Fikret Nafi ÇOKSÖYLER

2nd Supervisor: Associate professor Elvan OCAK

December 2016, 71 pages

In this study, TDT and z-values of *E. coli* are determined at NB medium. The pH of NB test mediums are adjusted 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 and 7.0 by acetic acid and NaCl is added to each pH level at the levels of 0 (not added), 1, 2, 3 and 5 %. Study is performed at 52-64 °C interval. Two TÖS value is produced resembling 3 and 4 Log inactivation. In this study, samples taken during inactivation study, are applied to NA plates as drop plates. So that three results are obtained as growth, non-growth and a little growth (a few pinhead colonies at drop plate). TDT Curves, for 3 log level reduction and taken into account the third data (a few growth) are showed better statistical compliance than The Curve which resembling 4 log reduction and growth/no-growth points. This findings, in this study is completely original and must be proven by further studies. TDT values as selected reference TOS values are increase by salt content and pH value. The z-values are also increased by salt content.

Keywords: D-values, *Escherichia coli*, pH, z-values

ÖN SÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük katkıları bulunan, yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. F. Nafi ÇOKSÖYLER'e, benim için çalışma ortamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımnda yardımcı olan Arş. Gör. Şehriban UĞUZ'a, hayatımın her evresinde hep yanımda olan aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Uğur KALAÇ

Van, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	3
3. MATARYEL VE YÖNTEM	6
3.1. Materyel.....	6
3.2. Yöntem	6
3.2.1. Çalışmada kullanılan yöntemler	6
3.2.1.1. Saf kültür temini	6
3.2.1.2. Çalışma stok kültürünün hazırlanması	6
3.2.1.3. Deneme planı	7
3.2.1.4. Sterilizasyon ortamının pH'sının ayarlanması	7
3.2.1.5. İnaktivasyon denemeleri kültürlerinin hazırlanması	7
3.2.1.6. İnaktivasyon denemelerinin yapılması	8
3.2.1.7. TSA besiyeri plaklarının inkübasyonu	9
3.2.1.8. TÖS eğrilerinin çizilmesi	10
3.2.1.9. Tuz ve asetik asit konsantrasyonunun TÖS, D- ve z-değerleri üzerine etkisinin modellenmesi.....	10
3.3. Çalışmada Kullanılan Analitik Yöntemler	10
3.3.1. Kültürel sayım	10
3.4. Çalışmada Kullanılan Matematiksel ve İstatistiksel Yöntemler.....	11
3.4.1. TÖS için hücre sayısının her noktaya inokülasyon hacminin belirlenmesi	11
3.4.2. Önceki çalışmalara göre örnek alma aralıklarının belirlenmesi	11
3.4.3. Her çalışma için petri yüzeylerine ekim noktalarının belirlenmesi.....	12

	Sayfa
3.4.4. Her tuz-asetik asit kombinasyonu için TÖS eğrilerinin çizimi ve z-değeri ile referans TÖS değerinin belirlenmesi.....	13
3.4.5. TÖS ve z-değerlerinin tuz ve astik asit konsantrasyonu ve pH'ya bağlı değişiminin modellenmesi.....	13
4. BULGULAR	15
4.1. Tryptic Soy Agar Besi yerinde pH ve Tuz Düzeylerinin Ayarlanması.....	15
4.2. Termal Ölüm Süresi Denemeleri.....	16
4.3. Termal Ölüm Süresi Eğrilerinin Çizilmesi.....	29
4.4. Termal Ölüm Süresi Eğrilerinin Üzerinden z-Değerlerini ve Referans TÖS Değerlerinin ve Referans D-Değerlerinin Belirlenmesi	56
4.5. <i>E. coli.</i> 'nin %0-5 tuz ve 4.5-7.0 pH'da Nutrient Broth Ortamında z-Değerlerinin Değişimi.....	58
4.6. Tuz ve pH'nın TÖS Değeri Üzerine Etkisi	60
4.7. Tuz ve pH'nın z-Değerleri Üzerine Etkisi.....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Numune alma zamanlarının belirlenmesi için bir örnek.....	12
Çizelge 4.1. Farklı tuz oranlarındaki TSB besi yerine eklenen asetik asit ile pH değişimi	16
Çizelge 4.2. <i>E. coli</i> 'nin %5 tuz içeren pH'sı 7.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	17
Çizelge 4.3. <i>E. coli</i> 'nin %3 tuz içeren pH'sı 7.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	17
Çizelge 4.4. <i>E. coli</i> 'nin %2 tuz içeren pH'sı 7.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	18
Çizelge 4.5. <i>E. coli</i> 'nin %1 tuz içeren pH'sı 7.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	18
Çizelge 4.6. <i>E. coli</i> 'nin %0 tuz içeren pH'sı 7.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	19
Çizelge 4.7. <i>E. coli</i> 'nin %5 tuz içeren pH'sı 6.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	19
Çizelge 4.8. <i>E. coli</i> 'nin %3 tuz içeren pH'sı 6.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	20
Çizelge 4.9. <i>E. coli</i> 'nin %2 tuz içeren pH'sı 6.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	20
Çizelge 4.10. <i>E. coli</i> 'nin %1 tuz içeren pH'sı 6.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	21
Çizelge 4.11. <i>E. coli</i> 'nin %0 tuz içeren pH'sı 6.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	21
Çizelge 4.12. <i>E. coli</i> 'nin %5 tuz içeren pH'sı 5.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	22
Çizelge 4.13. <i>E. coli</i> 'nin %3 tuz içeren pH'sı 5.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	22
Çizelge 4.14. <i>E. coli</i> 'nin %2 tuz içeren pH'sı 5.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	23
Çizelge 4.15. <i>E. coli</i> 'nin %1 tuz içeren pH'sı 5.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	23
Çizelge 4.16. <i>E. coli</i> 'nin %0 tuz içeren pH'sı 5.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	24
Çizelge 4.17. <i>E. coli</i> 'nin %5 tuz içeren pH'sı 5.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	24

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.18. <i>E. coli</i> 'nin %3 tuz içeren pH'sı 5.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	25
Çizelge 4.19. <i>E. coli</i> 'nin %2 tuz içeren pH'sı 5.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	25
Çizelge 4.20. <i>E. coli</i> 'nin %1 tuz içeren pH'sı 5.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	26
Çizelge 4.21. <i>E. coli</i> 'nin %0 tuz içeren pH'sı 5.0 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	26
Çizelge 4.22. <i>E. coli</i> 'nin %5 tuz içeren pH'sı 4.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	27
Çizelge 4.23. <i>E. coli</i> 'nin %3 tuz içeren pH'sı 4.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	27
Çizelge 4.24. <i>E. coli</i> 'nin %2 tuz içeren pH'sı 4.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	28
Çizelge 4.25. <i>E. coli</i> 'nin %1 tuz içeren pH'sı 4.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	28
Çizelge 4.26. <i>E. coli</i> 'nin %0 tuz içeren pH'sı 4.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları	29
Çizelge 4.27. <i>E. coli</i> 'nin %0-5 tuz ve 4.5-7.0 pH'da Nutrient Broth ortamında z-değerleri ve referans TÖS değerleri	57
Çizelge 4.28. Tuz ve pH'nın TÖS _k üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu	61
Çizelge 4.29. Tuz ve pH'nın TÖS _k üzerine etkilerine ait doğrusal modelin katsayıları ve onlara ait t ve p değerleri	61
Çizelge 4.30. Tuz ve pH'nın TÖS _d değerleri üzerine etkisine ait varyans analizi	62
Çizelge 4.31. Tuz ve pH'nın TÖS _d üzerine etkilerine ait doğrusal modelin katsayıları ve onlara ait t ve p değerleri	63
Çizelge 4.32. Tuz ve pH'nın z-değerleri üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu	63
Çizelge 4.33. Tuz ve pH'nın z-üzerine etkilerine ait doğrusal modelin katsayıları ve onlara ait t ve p değerleri	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Farklı Tuz ve Asetik Asit Konsantrasyonlarındaki TSB Besiyerleri	7
Şekil 3.2. TSB Besiyerlerinin Su Banyosunda Isıtılması	8
Şekil 3.3. İşaretlenmiş NA Besiyeri	9
Şekil 3.4. Ekim Yapılan Plakları İnkübasyonu	9
Şekil 4.1. % 5 tuz ve 7 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	31
Şekil 4.2. % 3 tuz ve 7 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	32
Şekil 4.3. % 2 tuz ve 7 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	33
Şekil 4.4. % 1 tuz ve 7 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	34
Şekil 4.5. % 0 tuz ve 7 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	35
Şekil 4.6. % 5 tuz ve 6 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	36
Şekil 4.7. % 3 tuz ve 6 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	37
Şekil 4.8. % 2 tuz ve 6 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	38
Şekil 4.9. % 1 tuz ve 6 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	39
Şekil 4.10. % 0 tuz ve 6 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	40
Şekil 4.11. % 5 tuz ve 5.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	41
Şekil 4.12. % 3 tuz ve 5.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	42
Şekil 4.13. % 2 tuz ve 5.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	43
Şekil 4.14. % 1 tuz ve 5.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	44
Şekil 4.15. % 0 tuz ve 5.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	45
Şekil 4.16. % 5 tuz ve 5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	46
Şekil 4.17. % 3 tuz ve 5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	47
Şekil 4.18. % 2 tuz ve 5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	48
Şekil 4.19. % 1 tuz ve 5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	49
Şekil 4.20. % 0 tuz ve 5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	50
Şekil 4.21. % 5 tuz ve 4.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	51
Şekil 4.22. % 3 tuz ve 4.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	52
Şekil 4.23. % 2 tuz ve 4.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	53

Şekil

Sayfa

Şekil 4.24. % 1 tuz ve 4.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	54
Şekil 4.25. % 0 tuz ve 4.5 pH' da <i>E. coli</i> 'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi	55
Şekil 4.26. Kesikli çizgi z-değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi	58
Şekil 4.27. Kesikli çizgi TÖS değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi	59
Şekil 4.28. Düz çizgi z-değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi.....	59
Şekil 4.29. Düz çizgi TÖS değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi.....	60
Şekil 4.30. İnkübasyon sonrası gelişen koloniler	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar

Açıklama

ATCC

American Type Culture Collection

NA

Nutrient Agar

NaCl

Sodyum Klorür

NB

Nutrient Broth

TÖS

Termal Ölüm Süresi

TSA

Trytic Soy Agar

TSB

Trytic Soy Broth

1. GİRİŞ

Gıda güvenliği konusu, tüm dünyada, halk sağlığı ve ekonomik boyutu nedeniyle önem kazanan ve önemi giderek artan bir konu haline gelmiştir. Gıda güvenliği daha önemli hale gelirken gıda çeşitliliğindeki artışlar, yeni gıdalar, az işlem görmüş gıdalar, ısıtma işlemi daha sınırlı olarak kullanma beklentisi gıda üreticisini (mühendisini) aşılması zor bir kısaca sokmaktadır. Bu paradokstan çıkış, ya geliştirilen her gıda maddesinde belli sayıdaki patojen mikroorganizmayı inaktive edecek ısıtma işlem sürelerini (TÖS'ler) belirleme ya da TÖS üzerine etkili olan pH ve su aktivitesi (örneğin tuz konsantrasyonu) gibi temel faktörlerin etkisini ortaya koyan modellerden yararlanma veya yeni modeller oluşturma ile olacaktır.

TÖS çalışmaları, genellikle sporlu bakteriler üzerine yürütüldüğünden ve 100 derecenin üzerinde çalışıldığından kullanılan teknikler tekli ve çoklu tüp teknikleri gibi zaman ve emek isteyen çalışmalardır. Bu nedenle bu tip çalışmaları çok faktörlü hale getirerek model oluşturmak oldukça kapsamlı bir çalışmadır. Ancak bağırsak kökenli patojen mikroorganizmalar ve onların indikatörleri 100 derecenin çok daha altındaki sıcaklıklarda inaktive oldukları için tüplü yöntem kolaylıkla bulk yöntemine çevrilebilir. Bu yöntem, inaktivasyon çalışmasında olağanüstü bir kolaylık ve malzeme tasarrufu sağlayacaktır. Gıda güvenliğinin en önemli konusu, bağırsak kökenli patojen mikroorganizmaların üretimin çeşitli aşamalarında gıdalara bulaşması ve bulaşan mikroorganizmaların tüketicinin sağlığı için risk teşkil etmesidir.

Escherichia coli (*E. coli*), bağırsak kökenli patojen mikroorganizmaların indikatörü olarak bilinir (Ekici ve ark., 2008). *E. coli*, gıdalarda diğer bağırsak kökenli patojenlere benzer çoğalma ve yok olma davranışı göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *E. coli* en çok kullanılan test mikroorganizmasıdır.

Tezin amacı, gıdalara yeterli ama mümkün olan en düşük düzeyde ısıtma işlemi uygulayabilmek için gıdaları temsil eden pH ve tuz şartlarında pratik olarak kullanılacak bir TÖS belirleme metodu geliştirmek ve bu metot ile *E. coli*'nin TÖS'lerinin çeşitli pH ve tuz konsantrasyonu kombinasyonlarındaki değerlerini belirlemek ve bu değişimin matematiksel modellerini oluşturmaktır. Bu çalışmayla, hem hızlı ve pratik yöntemle TÖS belirleme hem de matematiksel modeller geliştirerek daha

genel şartlarda deney yapmaksızın TÖS'ü tahmin edebilme konusunda literatüre katkıda bulunulmaya çalışılacaktır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Escherichia coli (*E. coli*) gram (-), spor yapmayan, fakültatif anaerob bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklığı 35-37°C olup gelişme aralığı 9-45°C arasındadır. Gelişmeleri için özel istekleri yoktur. Enerji kaynağı olarak basit bir şekerin bulunması halindeki her besi ortamında gelişirler. Laktozu gaz oluşturarak fermente ederler. İnsan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında bulunurlar. Normal olarak patojen bir bakteri değildir ancak son 20-30 yılda bazı patojen suşları keşfedilmiştir. Patojen *E. coli* türleri çok önemli gıda kaynaklı hastalıklarının etmenidirler. Bu türler diyarejenik *E. coli*'ler, enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), diffuz-adhering *E. coli* (DAEC), enteroagregatif *E. coli* (EAaggEC) olmak üzere altı ana grup altında toplanmaktadır (Halkman ve ark., 1998).

E. coli, bağırsak kökenli patojen mikroorganizmaların indikatörü olarak bilinir (Ekici ve ark., 2008). İndikatör mikroorganizmalar, gıda sanayinde hijyen kurallarına uygun olarak üretim yapılıp yapılmadığının göstergesi olarak değerlendirilir. Genel prensip olarak indikatör mikroorganizmaların patojen olmaması gerekirse de *E. coli*'nin patojen türleri de bulunmaktadır (Halkman ve ark., 1998).

E. coli, *Salmonella* ve *Shigella* gibi bağırsak kökenli bir mikroorganizmadır. *E. coli* patojen mikroorganizmalara göre dışkıda devamlı ve yüksek sayıda bulunması nedeniyle gıdalarda fekal bulaşmanın ve fekal kökenli patojen bakterilerin indikatörü olarak kullanılır. Miktarıda mikrobiyolojik kriter olarak değerlendirilir. Başka bir deyişle gıdalarda bulunan *E. coli* miktarı, bir gıda güvenliği kriteri olarak yer almaktadır (Montville ve Matthews, 2008).

E. coli diğer bağırsak kaynaklı patojenler gibi ısıtma işlemine çok dayanıklı değildir. Bu nedenle ısıtma işlemi bu grup bakterilerin yok edilmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Isıtma işlemi, bakteri hücrelerinin sitoplazma membranını parçalayarak bakteri DNA'sında kırılmalara, enzimlerinde denatürasyona ve ribozomlarında bozukluklara neden olarak bakterinin ölümünü sağlamaktadır (Çoksöyler ve Avşaroğlu, 2013). Isıtma işlemi ile mikrobiyal inaktivasyonun ilk ölçüsü olan TÖS kavramı, 1900'lerin başında konserve sanayi için geliştirilmiş olup bir konserve kutusu içindeki hedef bakteri sporlarının belli

bir ısı işlem sıcaklığında tamamının öldürülebildiği minimum süre olarak tanımlanabilir. Ortamda ne kadar çok hücre veya spor varsa inaktivasyon işlemi o kadar uzun sürmektedir. Bu nedenle TÖS'ün tanımında inaktive edilecek hücre veya spor sayısı çok önemlidir. *Clostridium botulinum* gibi çok tehlikeli gıda intoksikasyonu etmeni olan bu bakteri için bu sayı 10^{12} 'dir ve 12D kavramı olarak tanınmaktadır. Bir konservede hiçbir zaman bu kadar çok spor bulunmaz. Örneğin bu bakteri sporunun bir konserve kutusunda 1 tane olduğunu varsaysak, TÖS kadar bir ısı işlem sonucunda bu bakterinin canlı kalma olasılığı 10^{-12} 'ye (10^{12} kutudan sadece birinde canlı spor kalma olasılığı) inecektir. Bu da o konserve fabrikasını tüm üretim ömrü boyunca ürünlerinde pratik olarak bu bakterinin canlı kalamayacağı anlamına gelmektedir (Çoksöyler ve Avşaroğlu, 2013).

Mikroorganizmaların inaktivasyonu birinci derece reaksiyon kinetiğine benzemektedir. Yani, var olan hücre sayısı belli sıcaklıkta yapılan ısı işlem sürecinde zamana karşı logaritmik bir azalma gösterir. İnaktivasyonun diğer bir kavramı olan D değeri, hedef mikroorganizmanın canlı hücre sayısının belli sıcaklıkta ve belli bir ortamda bir logaritmik devre azalması (onda birine inmesi veya % 90'ının inaktive olması) için geçen süre olarak tanımlanır. İki kavramı karşılaştıracak olursak, D değeri belirlenmesinde ısı işlem sürecinde periyodik olarak alınan örneklerde canlı kalan hücrelerin sayısı belirlenip, buradan azalmanın kalıbı üzerinden D değeri belirlenirken, TÖS belirlenmesinde bir sayım yapılmaz. Alınan örneklerde üreme olsun (en az bir canlı spor kaldı) / üreme olmadı (hiç canlı spor kalmadı) şeklinde kalitatif bir değerlendirme yapılır. Eğer TÖS'ü 12D olarak tanımlarsak TÖS ve D arasındaki ilişkinin $TÖS = 12 \times D$ değeri olduğu kolaylıkla görülecektir. Tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi mikroorganizmaların inaktivasyonu, işlem sıcaklığı yükseldikçe hızlanır. Mikrobiyal inaktivasyon hızının sıcaklığa bağlı değişimi de logaritmiktir. Hızın sıcaklığa bağlı değişimini gösteren parametre z- değeridir. z- değeri, TÖS veya D-değerinin 1 log devre azalması (%10'a inmesi) için gereken sıcaklık farkı olarak tanımlanır (Çoksöyler, 2013).

Mikroorganizmalar için şartlar optimum ise mikroorganizmalar ısı işleme daha dayanıklıdır. pH, koruyucu vb. gibi diğer faktörlerin olumsuz olması durumunda mikroorganizmanın ısı işleme direnci azalır. Isıl işlem uygulamasında diğer faktörlerinde kullanılarak işlem sıcaklığının düşürülmesi engeller teknolojisinin bir

kavramıdır (Sorensen, 1994). Bu nedenle başta asetik asit olmak üzere ürünlere eklenen koruyucular ile ısıl işlemin daha düşük derecelerde yapabileme imkanı doğmaktadır. Ancak McQuestin ve ark. (2009), *E. coli*'nin fermente et ürünlerinde inaktivasyonu ile ilgili 44 yayınlanmış çalışma üzerinde yaptıkları incelemede, inaktivasyona asıl etkenin sıcaklık faktörü olduğunu bildirmişlerdir. pH ve su aktivitesinin ise inaktivasyon üzerine çok daha az etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Juneja ve ark. (2009), *E. coli*'nin bir patojen suşu olan *E. coli* O157:H7'nin kıyma ortamında z- değerinin 4.23 ile 5.06 derece arasında değiştiği 55 °C 67.79 dakika, 62.5 °C 2.01 dakika olarak belirlemişlerdir.

Stringer ve ark. (2000), yaptıkları derlemede *E. coli* O157:H7'nin elma suyu ve kıymada dahil olmak üzere çeşitli ortamlardaki D- ve z-değerlerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaları değerlendirmişler ve bu değerlerin mikroorganizmanın gelişme şartları, inaktivasyonun yapıldığı ortam, ısıl işlem uygulama metodu ve mikroorganizmaları geri kazanma şartlarının nasıl etkilediğini belirtmişlerdir.

Lee ve Kang (2009), *E. coli* O157:H7'nin termal inaktivasyonu sırasında asetik asit ve tuz ilavesinin etkilerini incelemiş ve sıcaklık ve asit artışının sinerjetik bir etki sağlamasına karşılık sıcaklık ve tuz artışının böyle bir etki sağlamadığını belirtmişlerdir. Ancak asit, tuz ve sıcaklık birlikte kullanıldığında tuzun koruyucu etkisi nedeniyle bu kombinasyonun inaktivasyon etkisi zayıflamıştır.

İnaktivasyonun modellenmesinde genel olarak 3 tür model kullanılmaktadır. Birincil modeller belli ortam şartlarında ve belli sıcaklıklarda inaktivasyonun zamana bağlı değişimidir. İkincil modeller ise birincil model parametrelerinin pH, sıcaklık, a_w gibi faktörlere bağlı değişimini ortaya koymaktadır. Örneğin Arrhenius denkliği, inaktivasyonun hızının sıcaklıkla değişimini ortaya koyan ikincil bir modeldir. Kombine modeller ise birincil ve ikincil modellerin birleştirilmesi ile oluşturulan modellerdir. Bunlarda birincil model parametreleri yerine onları etkileyen ikincil modeller entegre edilerek oluşturulurlar (Çoksöyler, 2013).

3. MATARYAL VE YÖNTEM

3.1. Mataryel

Bu çalışmada materyal olarak *Escherichia coli* türüne ait şuşlar, NaCl, asetik asit, gliserol, Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar (NA), Tryptic Soy Broth (TSB), Tryptic Soy Agar (TSA), gibi besiyerleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan yöntemler

3.2.1.1. Saf kültürün temini

Escherichia coli saf kültürü, ATCC koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan kültürün gıda kaynaklı olmasına özen gösterilmiştir. Kültür usulüne göre açıldıktan sonra TSB besiyerine aktarılmış ve tüp 37°C'de 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda NA plaklarına sürme yapılmış ve bir tipik kolonilerden yatık muhafaza besiyerine (TSA) alınmıştır. Yatık vasatlar inkübasyon (37°C'de 24-48 saat) sonrası buzdolabında kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Çalışma stok kültürünün hazırlanması

Yatık vasattan içinde 10 ml TSB besiyeri bulunan tüpe öze yardımı ile aşılama yapılmış ve tüpler 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda tüplerde yaklaşık 10^9 kob/ml düzeyinde canlı hücre oluşmuştur. Sayıyı tam olarak belirleyebilmek için *E. coli* şuşlarından hazırlanan stok çalışma kültüründen katı besiyerine aktarım yapılmış ve kültürel sayım sonucunda stok çalışma kültürünün genel düzeyleri belirlenmiştir.

3.2.1.3. Deneme planı

Çalışma, TSB besiyeri ortamında %0, 1, 2, 3 ve 5 olmak üzere 5 tuz konsantrasyonunun ve 7.0 pH, 6.0 pH, 5.5 pH, 5.0 pH ve 4.5 pH olmak üzere 5 pH konsantrasyonunun tüm kombinasyonlarında 52 °C, 55 °C, 58 °C, 61 °C ve 64 °C'lerde *E. coli*'nin TÖS'lerinin belirlenmesi şeklinde planlanmıştır. Her sıcaklık, asit ve tuz kombinasyonunda çalışma 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

3.2.1.4. Sterilizasyon ortamının pH'sının ayarlanması

Çeşitli tuz düzeylerine (%0-%5) getirilen sterilizasyon ortamlarında (Tryptic Soy Broth) sterilize edildikten sonra %10'luk Steril asetik asit çözeltisi ile pH metre kullanılarak 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 7.0 pH değerlerine getirmek için yapılan sarfiyat belirlenmiştir. Bu çalışma en az üç paralel yapılarak bir ortalama değer elde edilmiştir. Daha sonra asıl denemede pH metre kullanılmaksızın pH ayarlamalarda bu değerler kullanılmıştır. Her tuz x pH kombinasyonunda 3-4 fazla sayıda tüp hazırlanmış ve fazlalıklar pH'nın kontrolü için kullanılmış ve bunlara ekim yapılmamıştır. Şekil 3.1'de bu sterilizasyon ortamları görülmektedir.



Şekil 3.1. Farklı tuz ve asetik asit konsantrasyonlarındaki TSB besiyerleri.

3.2.1.5. İnaktivasyon denemeleri kültürlerinin hazırlanması

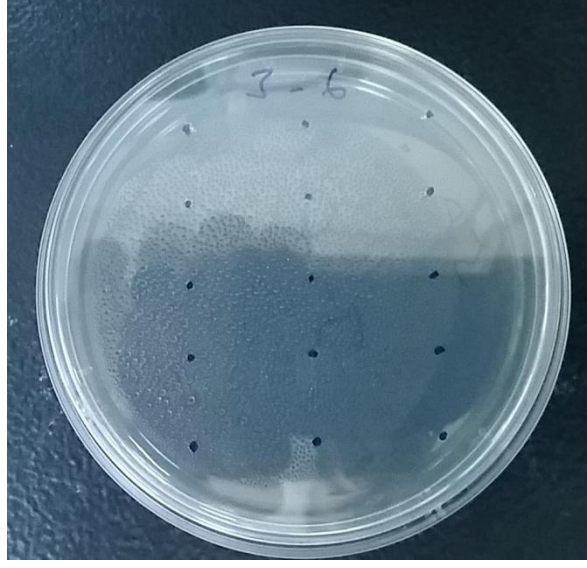
İnaktivasyon çalışması Tryptic Soy Broth ve Tryptic Soy Agar'da yapılmıştır. Besiyerleri usulüne göre hazırlanıp 50'şer ml olarak 100 ml'lik erlenmayerlere dağıtılıp sterilize edilmiştir. Her erlenmayere sterilizasyon öncesi belirlenen miktarda NaCl ve sterilizasyon sonrası da belirlenen miktarda steril asetik asit eklenmiştir. Çalışma vasatları en az 4'er paralel olarak hazırlanmış ve bunlardan biri pH kontrolü, merkezi sıcaklık kontrolü gibi kontrol işlemlerinde kullanılmıştır.

3.2.1.6. İnaktivasyon denemelerinin yapılması

Su banyosunda inaktivasyon sıcaklığına getirilmiş olan vasata aseptik şartlar altında 0,5 ml stok kültür eklenip karıştırıldıktan sonra kaynaklara dayanılarak (kaynaklarda verilen D-, TÖS ve z-değerlerinden) hesaplanan aralıklarda otomatik pipet ile örnekler (5- 10 µl) alınmıştır. Örnek petri kutusunda bulunan TSA plağında önceden belirlenen yere damlatılmıştır. Her örnek için ayrı bir steril pipet ucu kullanılmıştır. Her inaktivasyon sıcaklığı için ayrı bir petri kullanılmıştır. Denemeler her inaktivasyon sıcaklığı için aynı şekilde düzenlenmiştir.



Şekil 3.2. TSB besiyerlerinin su banyosunda ısıtılması.



Şekil 3.3. İşaretlenmiş NA besiyeri.

3.2.1.7. TSA besiyeri plaklarının inkübasyonu

Her damla bulunduğu yerde adsorbe olduktan sonra besiyeri plakları 37C'de 2 gün inkübasyona bırakılmış ve damlaların konulduğu yerlerde koloni gelişimleri pozitif (+), koloni gözlenmemesi ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Ekim yapılan plakları inkübasyonu.

3.2.1.8. TÖS eğrilerinin çizilmesi

Her tuz-asetik asit kombinasyonu için + ve -'ler yarı logaritmik bir kağıt üzerine sıcaklığa (sıcaklık aritmetik x-ekseni olmak üzere) karşı süreyi (süreler logaritmik y-ekseni) belirten nokta olarak kaydedilmiştir. TÖS eğrisi, tüm +'ları altta ve tüm -'leri üstte bırakan bir doğru olarak çizilmiş ve bu doğru üzerinden z-değeri Çoksöyler (2013) tarafından belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

3.2.1.9. Tuz ve asetik asit konsantrasyonunun TÖS, D- ve z-değerleri üzerine etkisinin modellenmesi

Bu amaçla her tuz-asetik asit kombinasyonunda z-değeri ile bir referans TÖS değerinin (veya D-değerinin) asetik asit ve tuz konsantrasyonuna bağlı olarak nasıl değiştiği üç boyutlu grafikler ile gösterildikten sonra doğrusal modellerle açıklanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla da doğrusal regresyondan yararlanılmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Analitik Yöntemler

3.3.1. Kültürel sayım

Kültürel sayım için TSB besiyeri kullanılmıştır. Bu yöntemde, stok kültürden hazırlanan seri dilüsyonların 10^{-6} ., 10^{-7} ., 10^{-8} . ve 10^{-9} . dilüsyonlarından 0,1 ml örnek alınarak yayma plaka yönteminin prensibi gereği plak yüzeyine yayılmıştır. Kültürel sayım ikili paralel şeklinde gerçekleştirilmiş olup ikişer paralel olacak şekilde yayma plaka yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve 30-300 arası koloninin geliştiği petripler değerlendirilmiştir. Sayım sonucu; sayım (kob/ml) = $((N1+N2)/2) * Do$ şeklinde hesaplanmıştır. Formülde N1, N2 ve Do; sırası ile uygun sayım yapılabilir dilüsyona ait petriplerde (30-300 arasında koloni içeren) sayım sonuçları ve o dilüsyonun seyrelti oranıdır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Matematiksel ve İstatistiksel Yöntemler

3.4.1. TÖS için hücre sayısının her noktaya inokülasyon hacminin belirlenmesi

TÖS, test edilen türün hücre/spor sayısına bağlı bir değerdir. *C. botulinum* gibi çok tehlikeli organizmalarda bu sayı 10^{12} veya 12D'lik bir azalma hedeflenirken *E. coli* ve *Salmonella* gibi mikroorganizmalar için 4D'lik bir azalma (%99.99'luk bir azalma) öngörülmektedir (Çoksöyler, 2013; Gayan ve ark., 2012, 2013). Bu nedenle inaktivasyon ortamından periyodik olarak alınacak ve petrielerde belli noktalara bırakılacak 5 µl'lik (0.005 ml) örneklerde en az 10^4 kob bulunması gerekmektedir. Buna göre 3.2.1.3. ve 3.2.1.4. de verilen 50 ml'lik vasatlara başlangıç anında stok kültürden eklenir. Bu durumda stok lag fazı kültürün canlı hücre yoğunluğu örneğin 10^8 kob/ml olması durumunda her vasat 1'er ml stok kültür ile aşılacak, 10^9 kob/ml olması durumunda ise aşılama 0,1 ml kültür kullanılmıştır. Kültürün 24. saatindeki canlı hücre yoğunluğu ise 4-5 gün boyunca ardışık olarak pasajlanan 24 saatlik kültürlerin sayım sonuçlarına bakılarak tahmin edilmiştir. Ayrıca inokülasyonda kullanılan kültürün yoğunluğu ise kültürel sayım sonucunu belirlenerek yapılan işlem teyit etmiştir.

3.4.2. Önceki çalışmalara göre örnek alma aralıklarının belirlenmesi

Bu amaçla ComBase programı kullanılacaktır. Program ComeBase sitesinde (<http://www.combase.cc/index.php/en/>) yer almaktadır. Programın inaktivasyon modülünden *E. coli*, pH ve NaCl seçilmiştir. Programda asetik asit konsantrasyonu bir parametre olarak bulunmamakta olup bunun yerine pH bulunmaktadır. 3.2.1.3 de belirtilen kontrol vasatlarında her asetik asit-tuz kombinasyonu için pH değerleri okunacak ve bu değer ComBase programında asetik asit yerine bu pH değerleri girilmiştir. Programın tahmin ettiği D-değerinin 4 katı alınarak tahmini TÖS hesaplanmış ve denemelerde bu süre, bu sürenin yarım ve bir log devre altı (üçte ve onda biri) ve yarım ve bir log devre üstü (3 ve 10 katı) olmak üzere 5 ardışık sürede örnek alınmıştır. Örneğin % 0,1, 0,2 ve 0,3 asetik asit eklenmiş %2 tuzlu TSB besiyerlerinin pH'ları sırası ile 5,6, 5,2 ve 5,0 olsun. Bu besiyerlerinde örneğin 62°C'de

D-değerleri program tarafından aşağıdaki gibi tahmin edilmiştir. Tahmini TÖS ve bunun örnek alınacak alt katları ve üst katları aşağıda cetvel halinde verilmiştir.

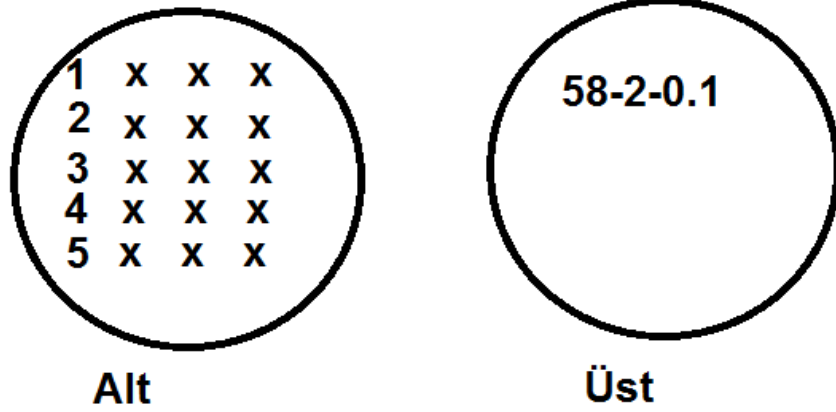
Çizelge 3.1. Numune alma zamanlarının belirlenmesi için bir örnek

Örnek alınacak süreler								
Sıcaklık (°C)	Tuz (%)	pH (AcA,%)	Tahmini TÖS (dak)	Tah. TÖS/10	Tah. TÖS/3	Tah. TÖS	Tah. TÖS*3	Tah. TÖS*10
58	2	5.6; %0.1	4.599	0.460	1.533	4.599	13.797	45.99
58	2	5.2; %0.2	4.483	0.448	1.494	4.483	13.449	44.83
58	2	5.0; %0.3	4.339	0.434	1.446	4.339	13.017	43.39

Bu tabloda görüldüğü gibi süreler arasındaki küçük farklılıklar bize numune alma sırası oluşturma imkanı vermiştir.

3.4.3. Her çalışma için petri yüzeylerine ekim noktalarının belirlenmesi

Her sıcaklık-% tuz-Asetik asit (pH) kombinasyonu için bir petri kutusu kullanılmıştır. Her örnekleme süresinde ardışık 3 defa örnek alınmış, petri kutusundaki ilgili yere inoküle edilmiştir. İnokülasyon noktaları petri kutusunun altından cam yazar kalem ile işaretlenmiştir. Sıcaklık-% tuz-asetik asit (pH) kombinasyonunu betimleyen uygun bir kod petri kutusunun kapağına yazılmıştır. Örneğin, yukarıdaki örnek için “58-2-0.1” gibi.



3.4.4. Her Tuz-Asetik asit kombinasyonu için TÖS eğrilerinin çizimi ve z-değeri ile referans TÖS değerinin belirlenmesi

Bu amaçla yarı logaritmik kağıtlardan yararlanılmıştır. Her tuz-asetik asit kombinasyonu için bir grafik oluşturulmuştur. Grafik için hazırlanan tabloya sıcaklık birinci değişken (bağımsız), üredi ve üremedi süreleri ise 2. ve 3. değişken olarak girilmiştir. Petri kutusunda her sıcaklık ve süre kombinasyonu için bulunan üç noktadan en az birinde koloni oluşması durumunda o kombinasyonun süre değeri üredi, üç noktanın hiçbirinde üreme olmaz ise o kombinasyonun süre değeri üremedi olarak tabloya girilmiştir. Üredi ve üremedi için farklı işaretler kullanılmıştır (üremedi için “•”; üredi için ise “o” şeklinde). Grafik çizerken Y eksenini (süre) logaritmik, X eksenini (sıcaklık) aritmetik olarak şekillendirilmiştir.

3.4.5. TÖS ve z-değerlerinin tuz ve asetik asit konsantrasyonu ve pH'ya bağlı değişiminin modellenmesi

Yukarıda da görüldüğü gibi her asetik asit-tuz-sıcaklık kombinasyonunda canlı kalma eğrileri (Birincil Model) çıkarılmamakta ve sadece TÖS değerleri belirlenmektedir. İnaktivasyon işlemi sıcaklığına bağlı olarak TÖS değerlerinin değişimi bir ikincil modeldir ve bu model parametresi olan z- değerinin hesaplanması yukarıda verilmiştir. Yine ikincil model olarak TÖS, D- ve z-değerlerinin üzerine tuz ve asetik asit konsantrasyonunun etkisi çoklu doğrusal regresyon ile (doğrusal model) hesaplanmıştır. Ayrıca asetik asit konsantrasyonları yerine onlara karşılık gelen pH değerleri kullanılarak tuz ve pH'ya karşı yine TÖS, D- ve z-değerlerinin değişimi yine

çoklu doğrusal regresyon ile belirlenerek ve iki yaklaşımdan R^2 değeri yüksek olan daha başarılı olarak kabul edilmiştir. Ancak pH faktör olarak kullanıldığında “asetik asit ile düşürülen pH” ifadesi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Tryptic Soy Agar Besi yerinde pH ve Tuz Düzeylerinin Ayarlanması

3 gr Tryptic Soy Broth ve 100 ml saf su ile TSB besi yeri hazırlandı. Oluşturulan TSB besi yerine %5 tuzlu besi yeri için 5 gr NaCl, %3 tuzlu besi yeri için 3 gr NaCl, %2 tuzlu besi yeri için 2 gr NaCl, %1 tuzlu besi yeri için 1 gr NaCl eklendi.

pH ayarlaması yapılırken de 25 gr asetik asit ve 250 ml saf su karıştırılarak %10'luk asetik asit çözeltisi elde edildi. Oluşturulan %10'luk asetik asit çözeltisinden 0.1 ml farklı tuz oranlarındaki TSB besi yerine eklenerek aşağıdaki tablo oluşturulmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı tuz oranlarındaki TSB besi yerine eklenen asetik asit ile pH değişimi

eklenen asetik asit miktarı	%0 tuzda pH	%1 tuzda pH	%2 tuzda pH	%3 tuzda pH	%5 tuzda pH
0	7,41	7,36	7,31	7,26	7,16
0,1	7,29	7,232	7,174	7,116	7
0,2	7,19	7,114	7,038	6,962	6,81
0,3	7,03	6,954	6,878	6,802	6,65
0,4	6,88	6,798	6,716	6,634	6,47
0,5	6,76	6,672	6,584	6,496	6,32
0,6	6,59	6,508	6,426	6,344	6,18
0,7	6,45	6,372	6,294	6,216	6,06
0,8	6,29	6,21	6,13	6,05	5,89
0,9	6,14	6,058	5,976	5,894	5,73
1	5,98	5,906	5,832	5,758	5,61
1,1	5,79	5,722	5,654	5,586	5,45
1,2	5,65	5,582	5,514	5,446	5,31
1,3	5,46	5,402	5,344	5,286	5,17
1,4	5,34	5,284	5,228	5,172	5,06
1,5	5,23	5,182	5,134	5,086	4,99
1,6	5,15	5,096	5,042	4,988	4,88
1,7	5,06	5,014	4,968	4,922	4,83
1,8	4,98	4,936	4,892	4,848	4,76
1,9	4,91	4,866	4,822	4,778	4,69
2	4,88	4,832	4,784	4,736	4,64
2,1	4,81	4,77	4,73	4,69	4,61
2,2	4,78	4,736	4,692	4,648	4,56
2,3	4,73	4,686	4,642	4,598	4,51
2,4	4,7	4,658	4,616	4,574	4,49
2,5	4,66	4,622	4,584	4,546	4,47
2,6	4,65	4,608	4,566	4,524	4,44
2,7	4,61	4,57	4,53	4,49	4,41
2,8	4,59	4,548	4,506	4,464	4,38
2,9	4,56	4,52	4,48	4,44	4,36
3	4,54	4,496	4,452	4,408	4,32
3,1	4,51	4,468	4,426	4,384	4,3
3,2	4,49	4,448	4,406	4,364	4,28

4.2. Termal Ölüm Süresi Denemeleri

Çalışma %0, %1, %2, %3 ve %5 Tuz içeren ve pH'sı 4.5, 5.0, 5.5, 6 ve 7.0 olan NB ortamlarında *E.coli*'nin termal ölüm süresi denemeleri her tuz x pH

Çizelge 4.26. *E. coli*'nin %0 tuz içeren pH'sı 4.5 olan Nutrient Broth ortamında canlı kalma denemesi sonuçları

Süre (d)	52 °C			55 °C			58 °C			61 °C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.25							+	+	+	+	+	+
0.5							+	+	+	+	+	+
1							+	+	+	+	+	+
2				+	+	+	+	+	+	-	-	-
4				+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+						
16	+	+	+	7	6	6						
32	+	+	+	-	-	-						
64	7	4	4									
128	-	-	-									
256												

4.3. Termal Ölüm Süresi Eğrilerinin Çizilmesi

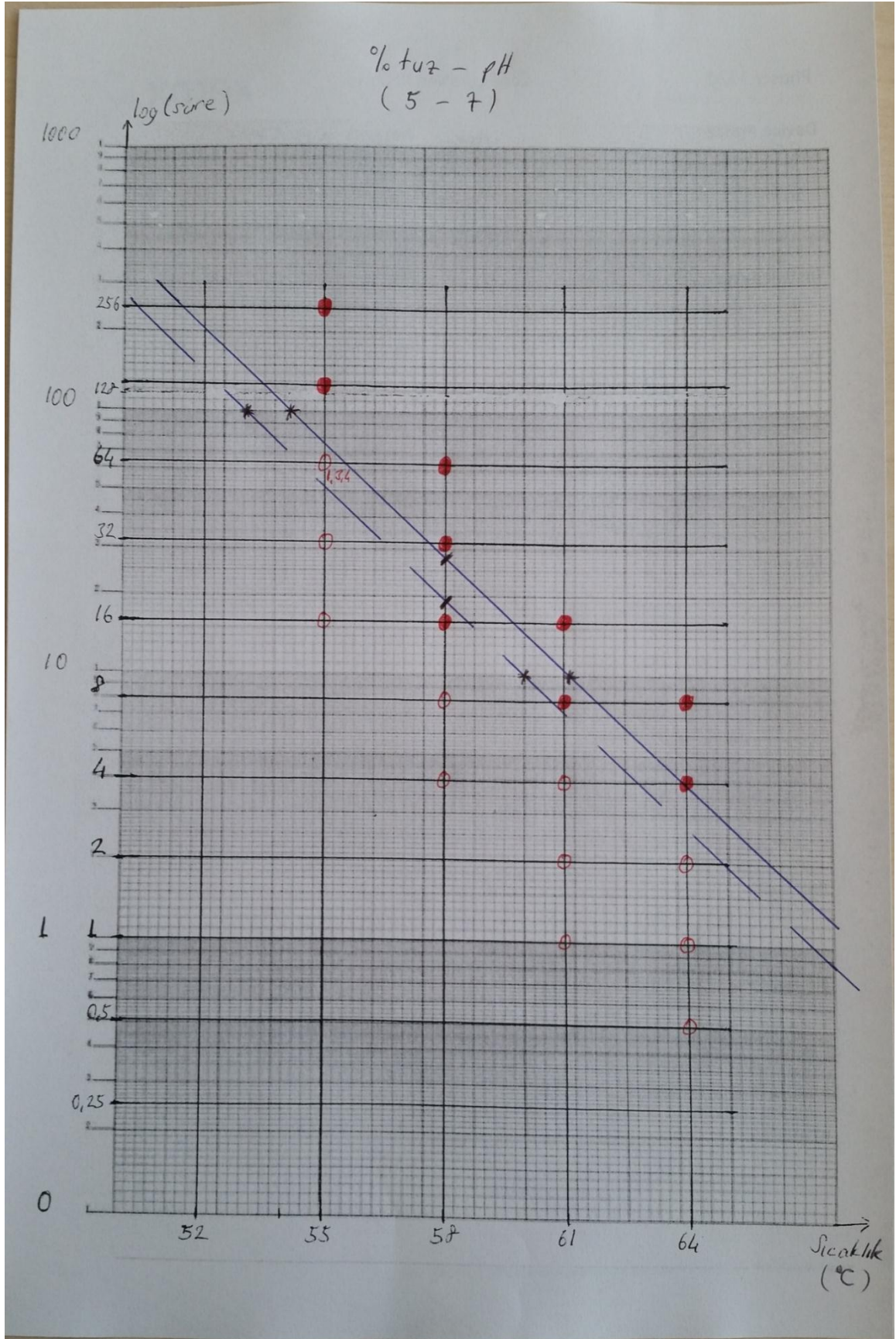
Yarı logaritmik kağıdın Aritmetik olan tabanı (x-ekseni) sıcaklık; logaritmik olan sol yan kenarı (y- eksteni) Termal Ölüm Süreleri (TÖS) için kullanıldı. Her sıcaklık süre kombinasyonunda 3'er paralel örnek alınıp ekilmiş olmakla birlikte karışıklığa neden olmaması için bu üç paralel tek nokta olarak gösterildi. Şöyle ki:

-Eğer ekilen üç paralelde de üreme gözlenmedi ise. Bu içi boş küçük bir daire “●” ile gösterildi.

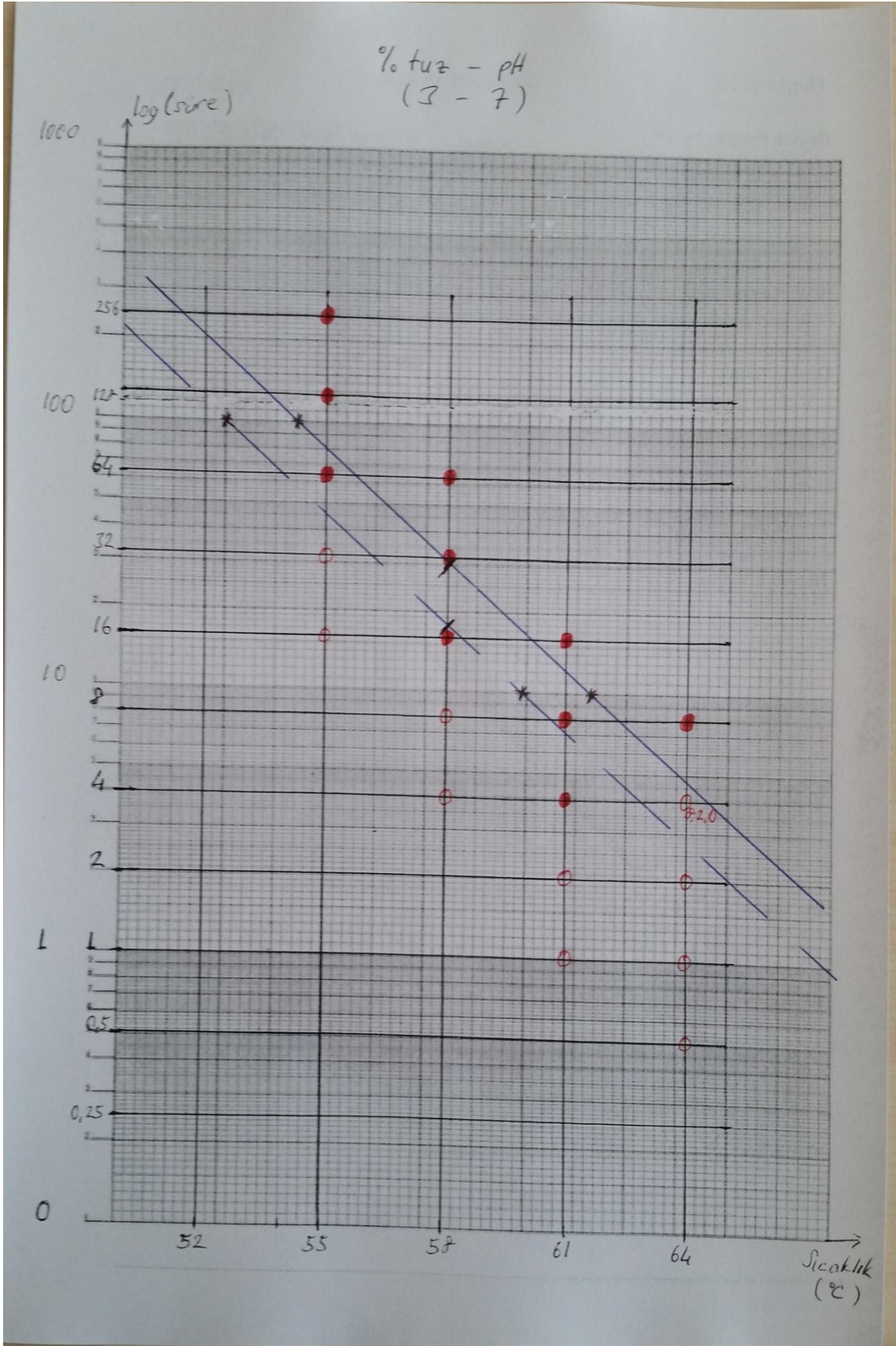
- Eğer ekilen üç paralelde de üreme gözlendi ise. Bu içi dolu küçük bir daire “o” ile gösterildi.

- Eğer üç noktadan en az birinde üreme varsa bu nokta yine “o” ile gösterildi ama üreme olmayan sonuçlar yanına sayım sonucu olarak kaydedildi. Örneğin: “0, 2, 8” gibi; bu üç noktanın birinde üreme olmadığı, diğer ikisinde 2 ve 8 koloni gözleendiği anlamına gelmektedir. Yukarıda belirtilen biçimlerde olan değerlerin kullanılarak Termal Ölüm eğrilerinin çizimi esas olarak Çoksöyler (2013) tarafından belirtildiği gibi yapıldı. Buna göre tüm boş noktalar altta kalacak ve mümkün olduğunca tüm dolu noktalar üstte kalacak şekilde bir doğru çizilir. Bu doğru TÖS eğrisidir. Ancak önemli sayıda pH tuz kombinasyonunda, tüm sıcaklık denemelerinde hiç üreme noktası elde edilemedi. Bu durumlarda sayılabilir (0-9) koloninin geliştiği noktaların üzerinden geçen bir “gölge” TÖS eğrisi elde edildi (TÖS grafiklerinde kesikli çizgi). Bu eğri

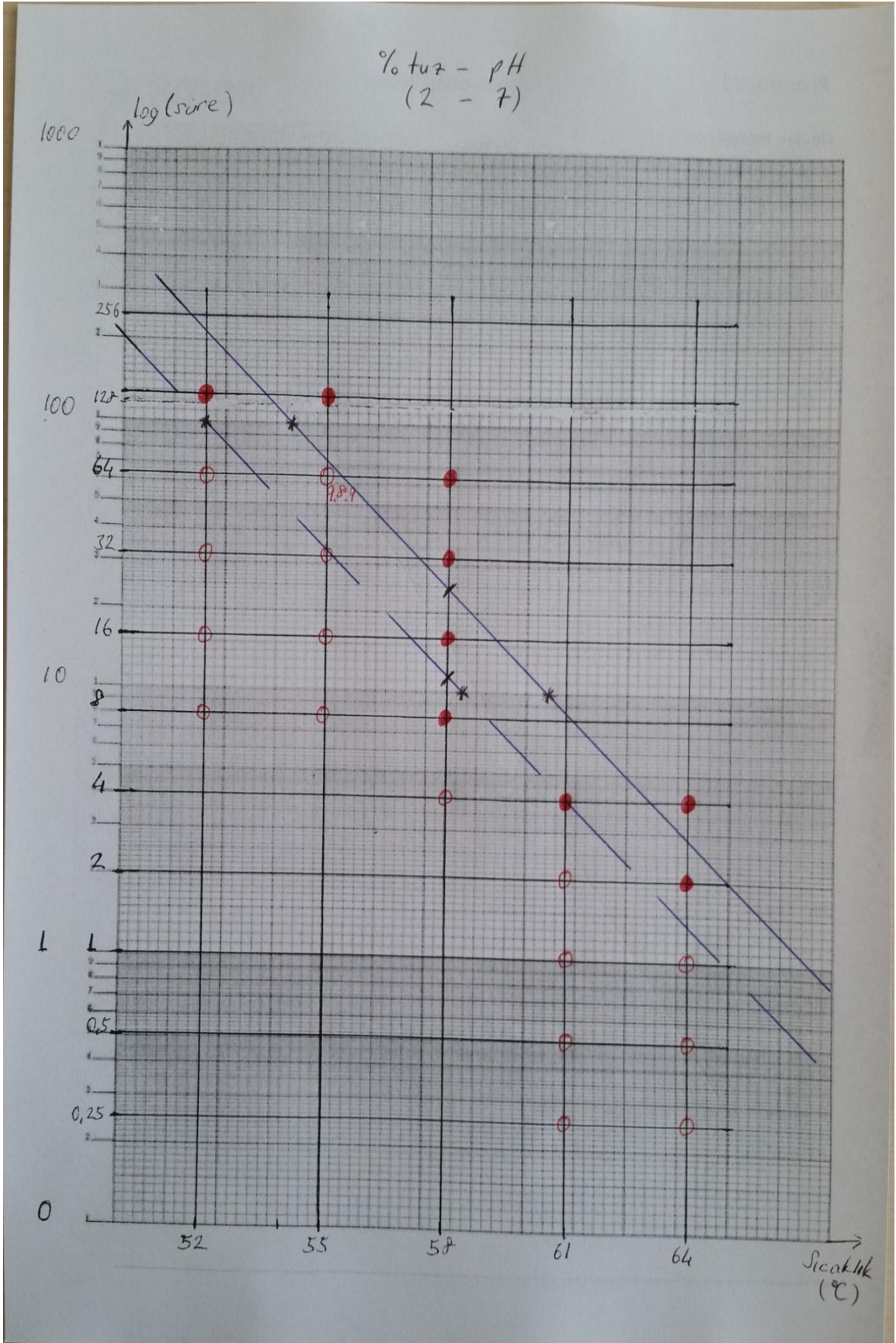
üzerindeki noktalar en az 3 log devrelik bir azalmayı temsil etmektedir. Daha sonra bu çizgiye paralel olarak tüm boş noktalar altta kalacak şekilde TÖS eğrisi çizildi. Sonuç olarak 5 tuz ve 5 pH düzeyinin oluşturduğu 25 kombinasyon için çizilen TÖS grafikleri Şekil 4.1 - 4.25'te görülmektedir.



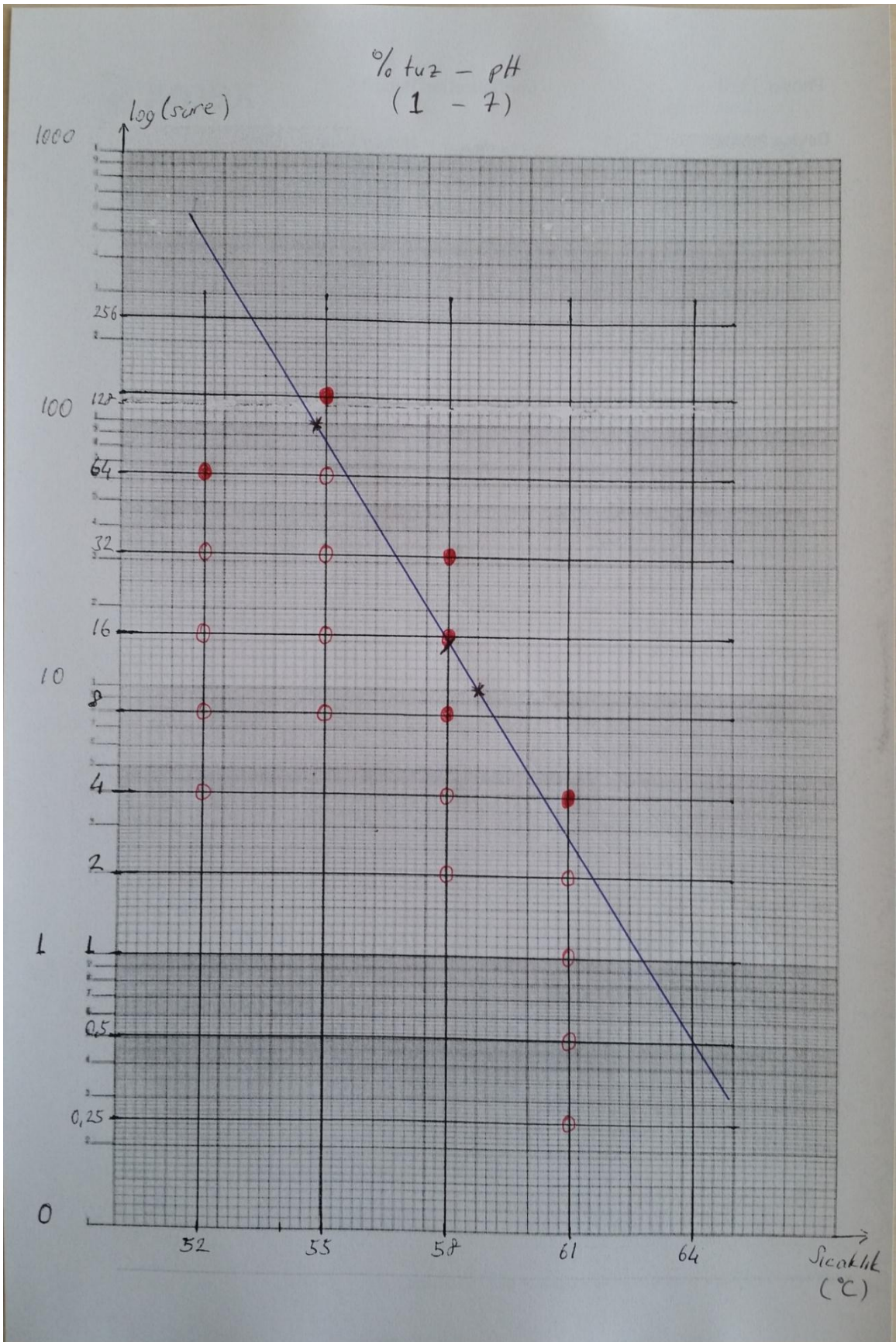
Şekil 4.1. % 5 tuz ve 7 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



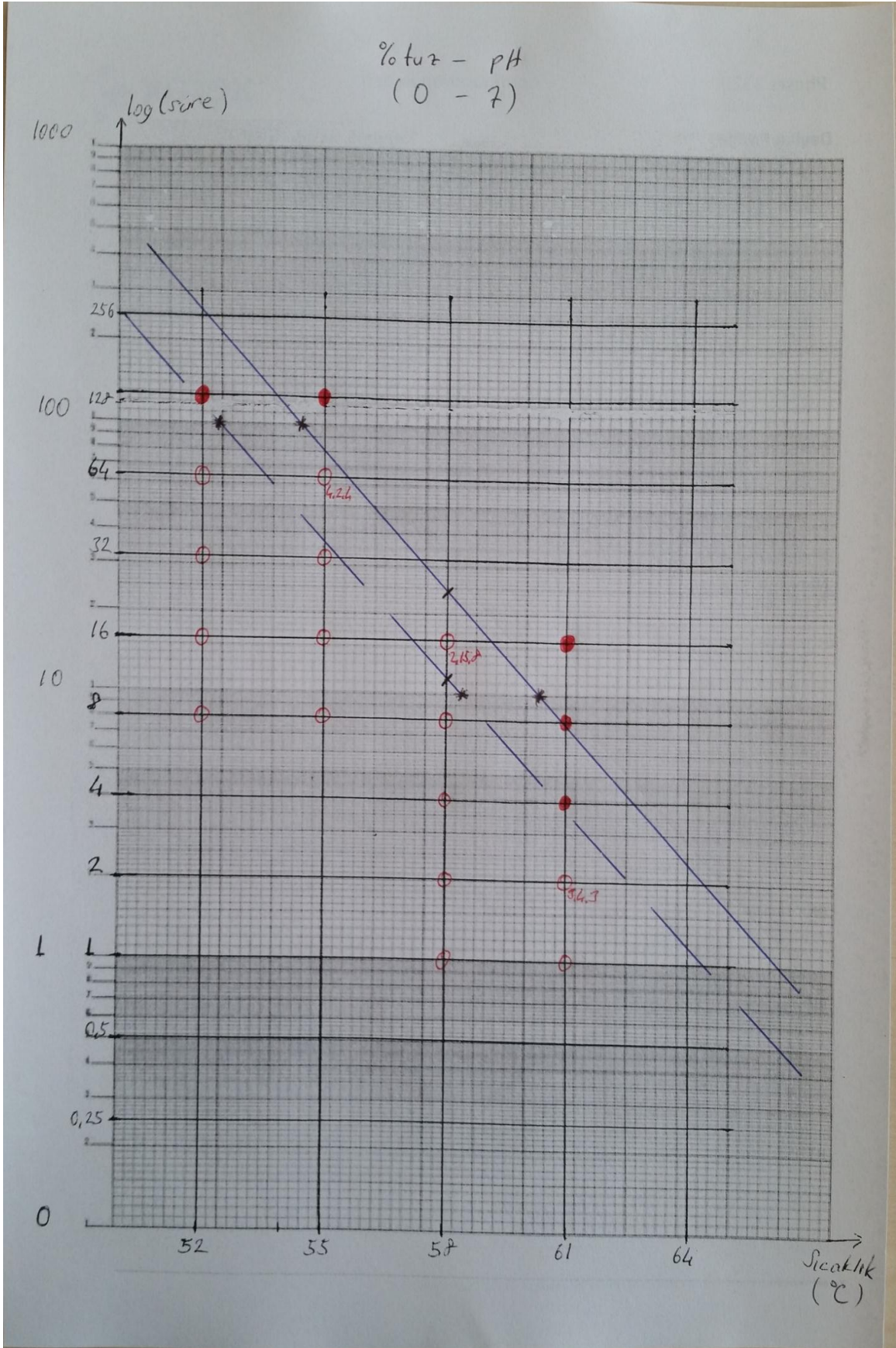
Şekil 4.2. % 3 tuz ve 7 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



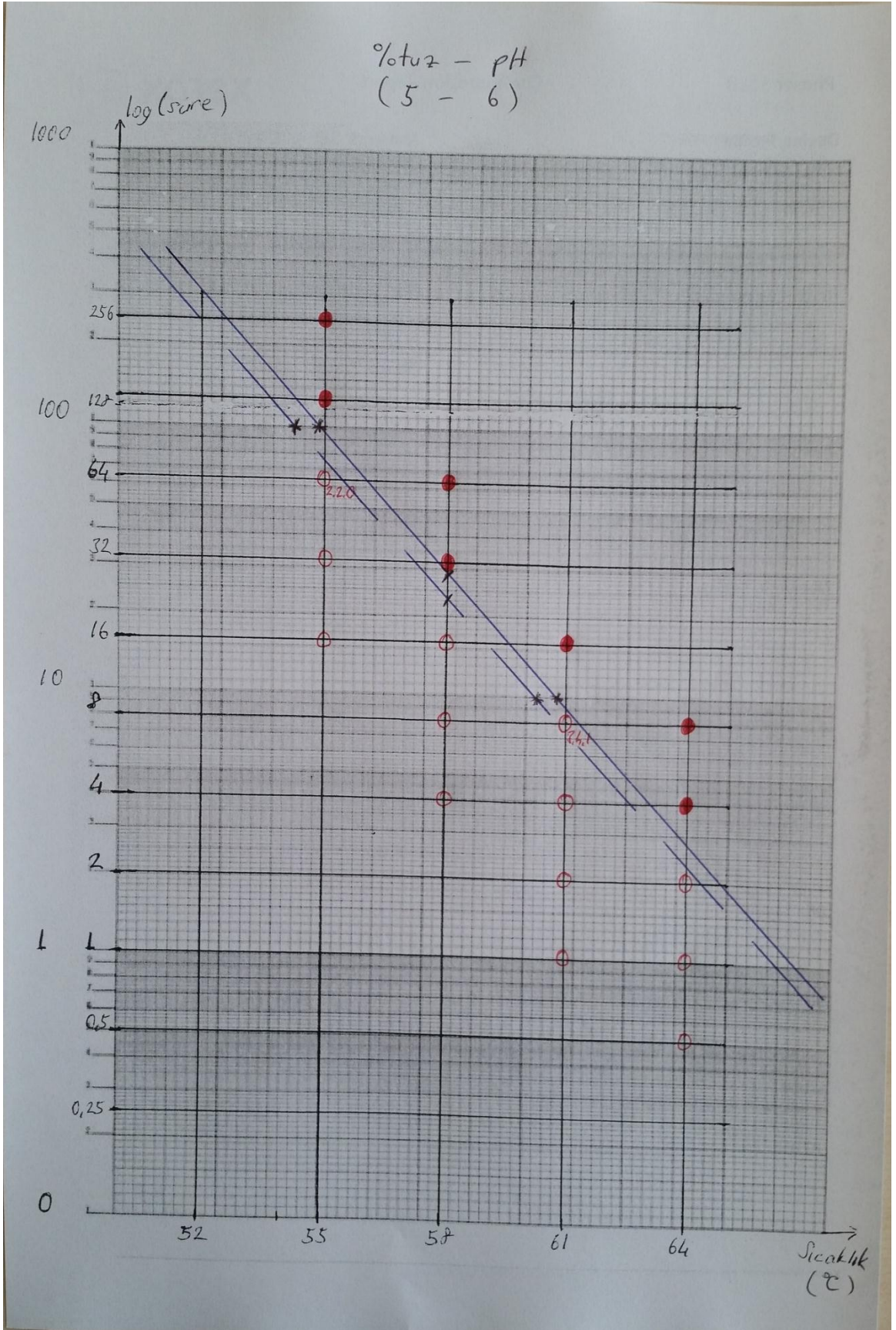
Şekil 4.3. % 2 tuz ve 7 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



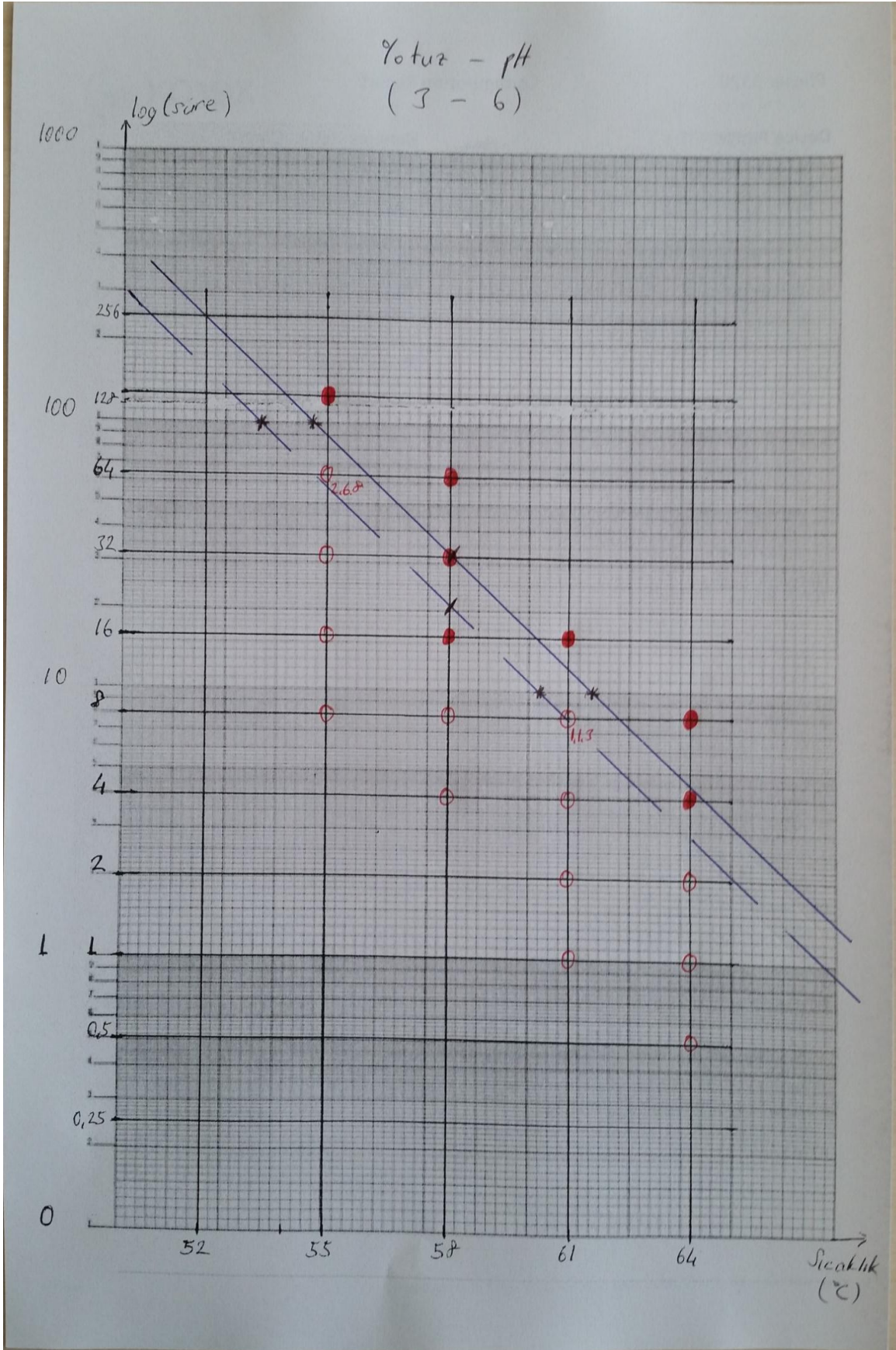
Şekil 4.4. % 1 tuz ve 7 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



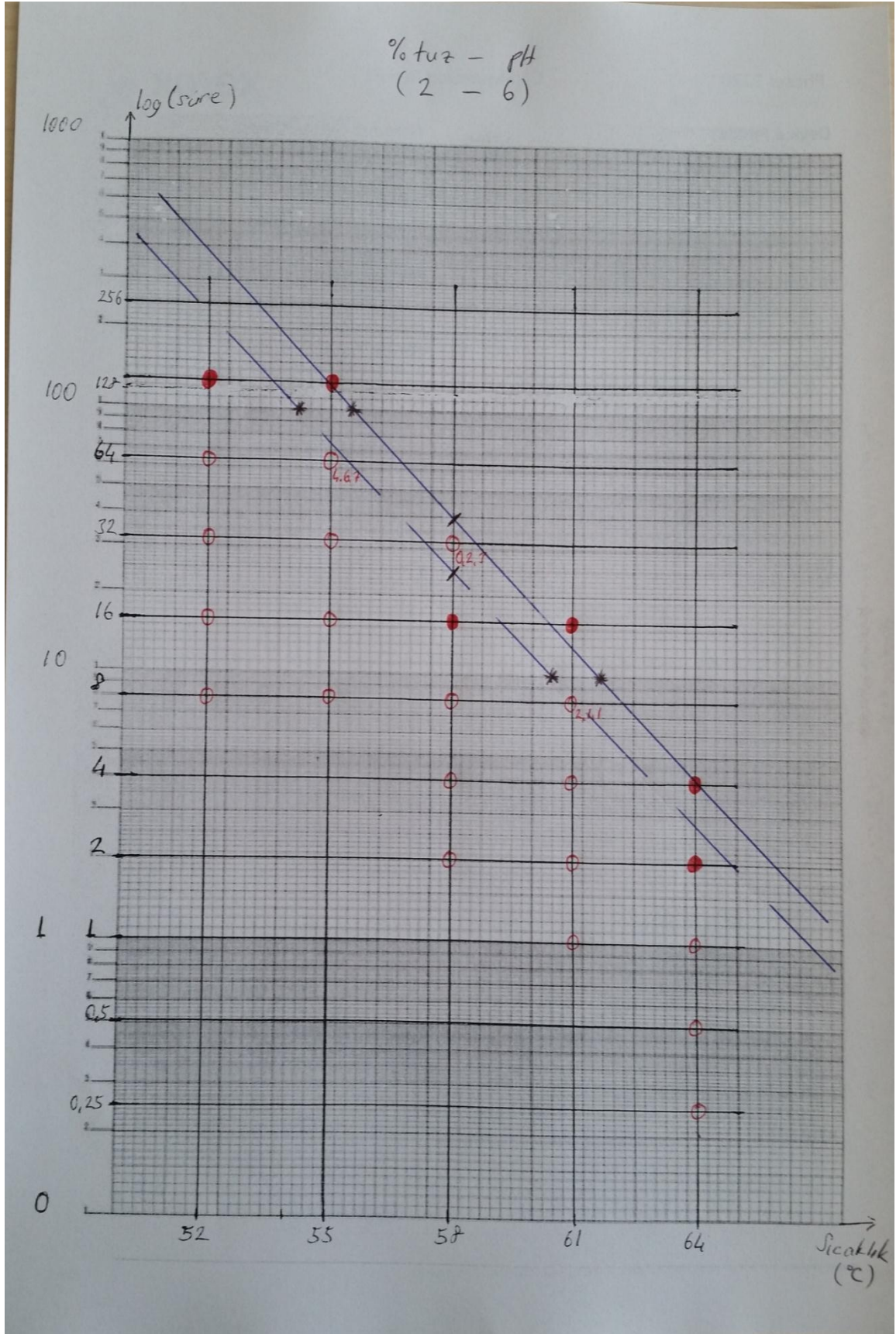
Şekil 4.5. % 0 tuz ve 7 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



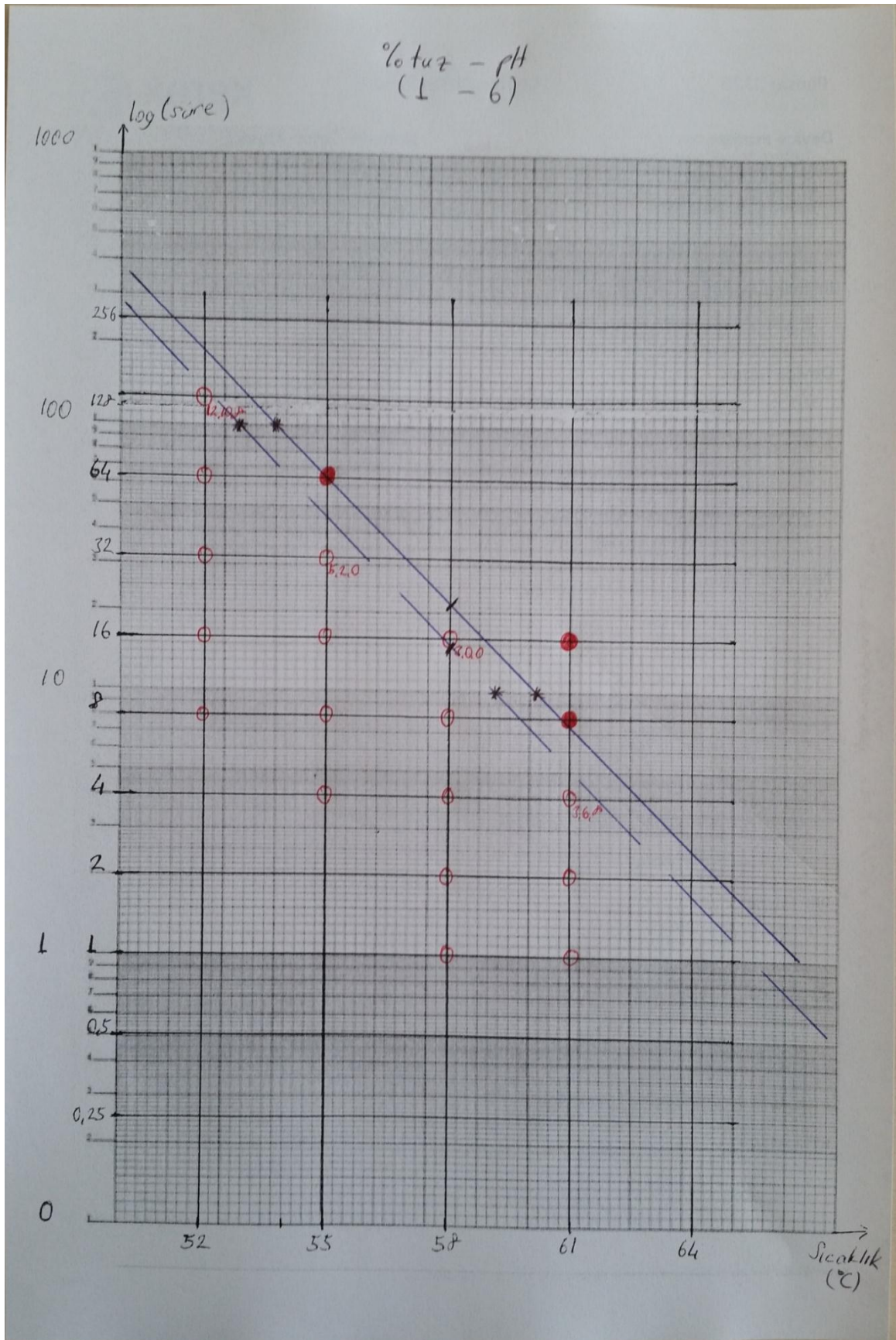
Şekil 4.6. % 5 tuz ve 6 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



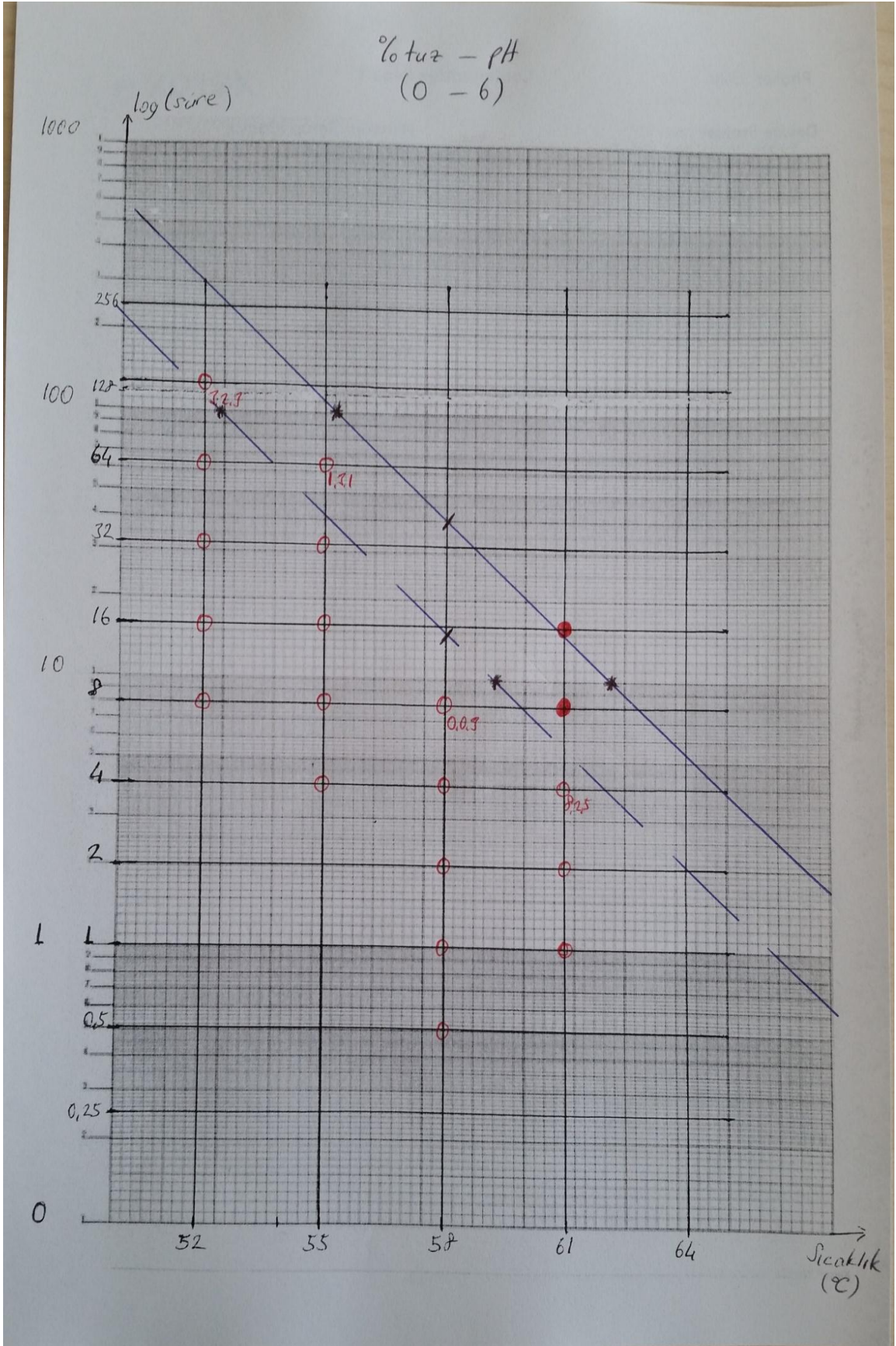
Şekil 4.7. % 3 tuz ve 6 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



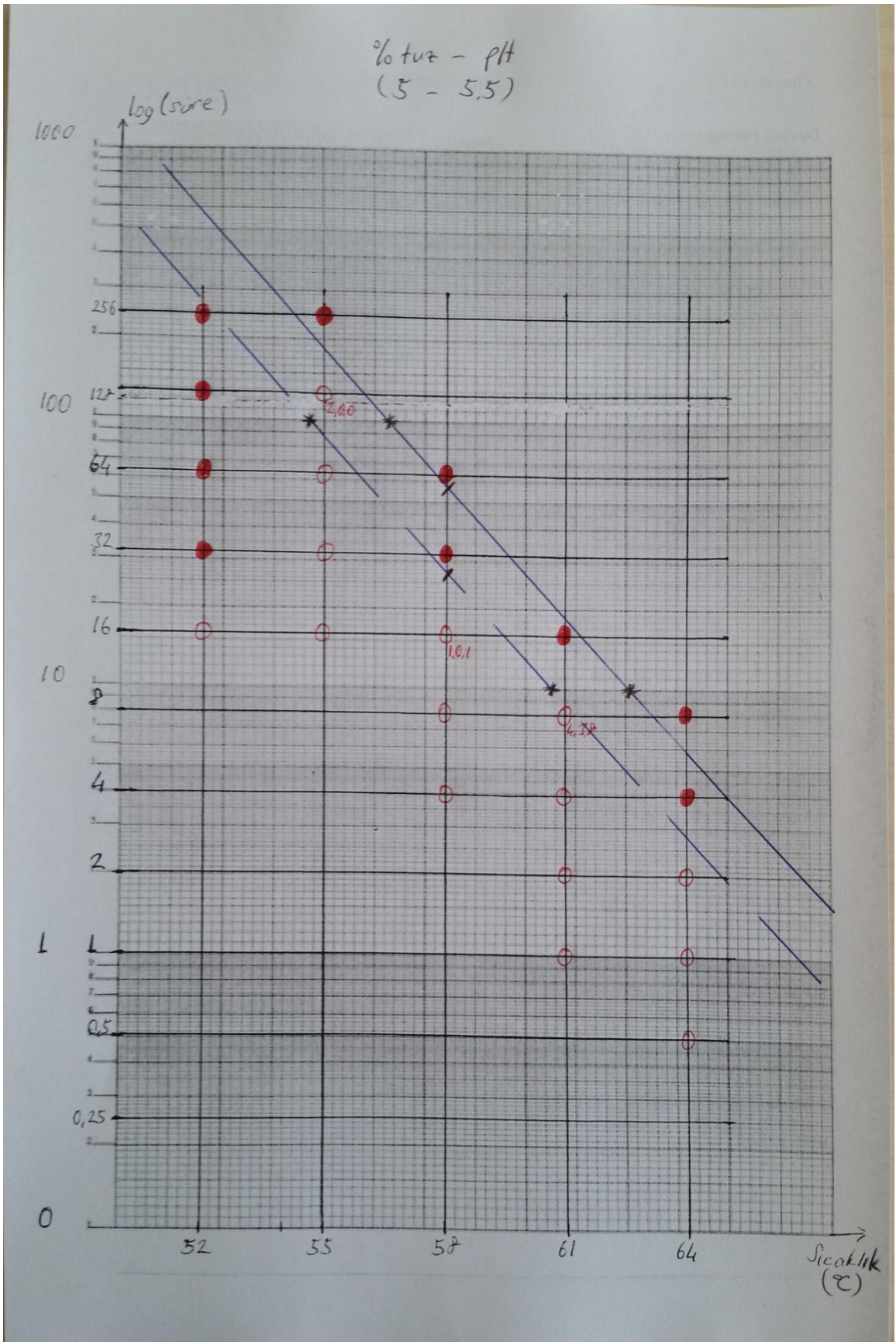
Şekil 4.8. % 2 tuz ve 6 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



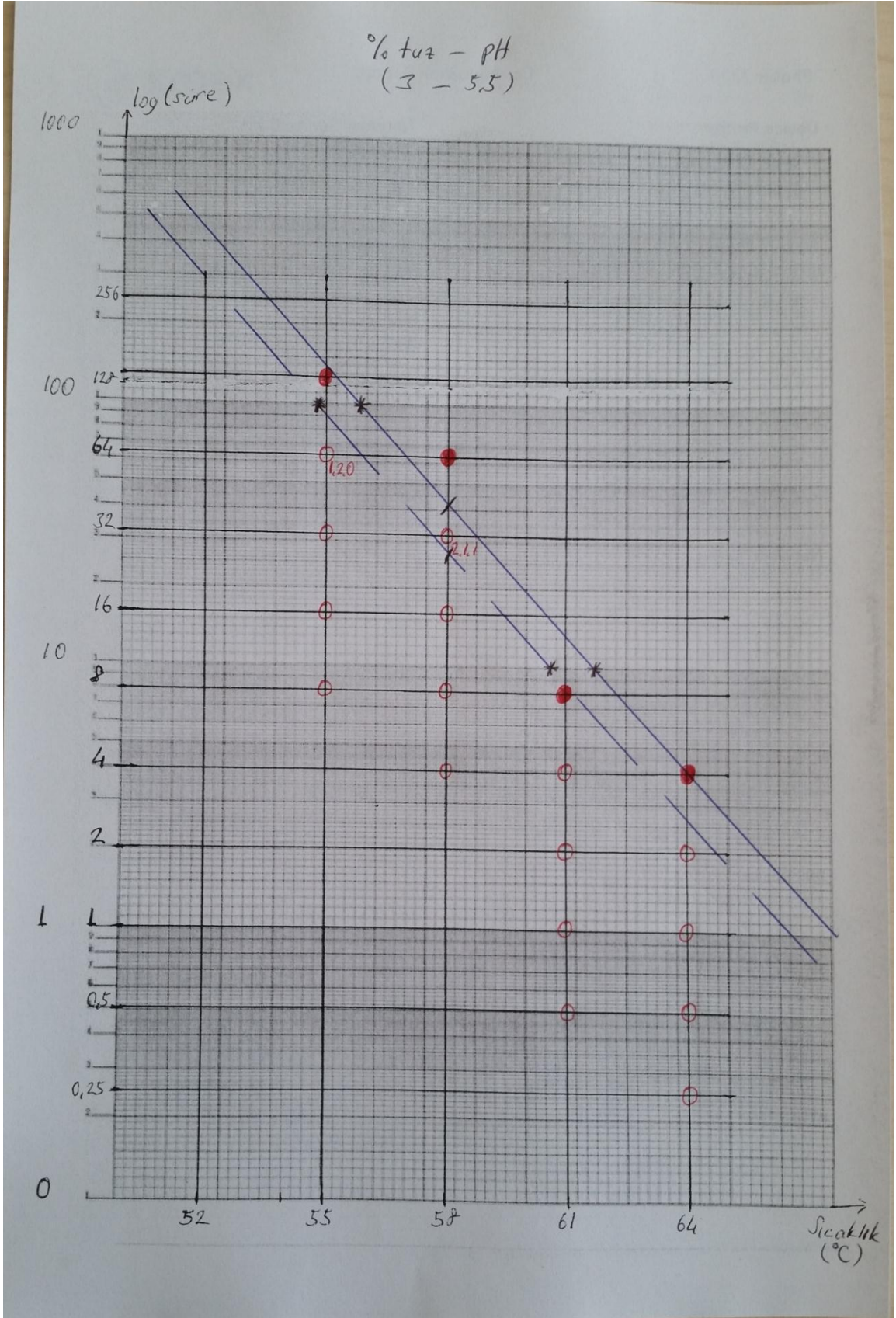
Şekil 4.9. % 1 tuz ve 6 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



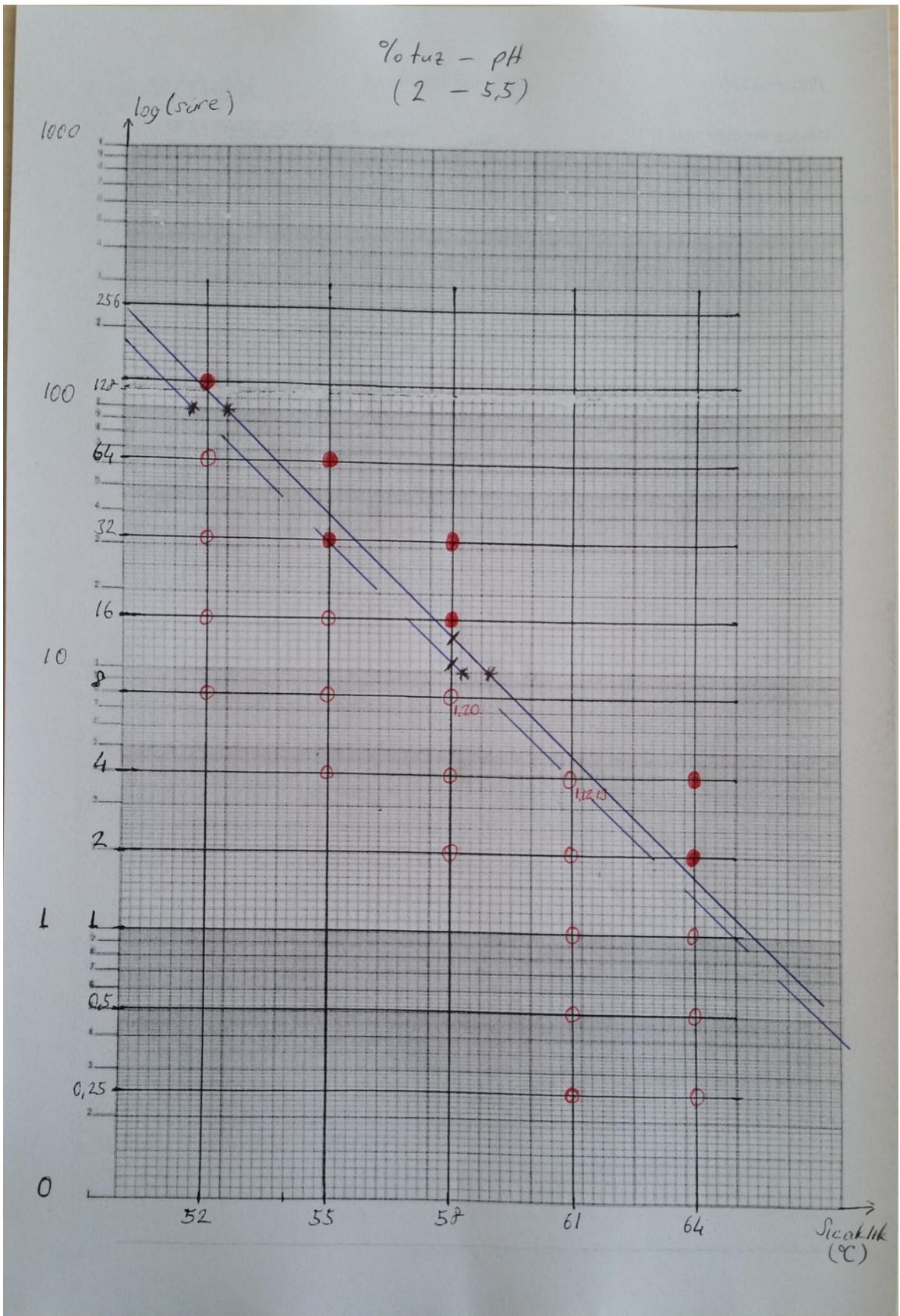
Şekil 4.10. % 0 tuz ve 6 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



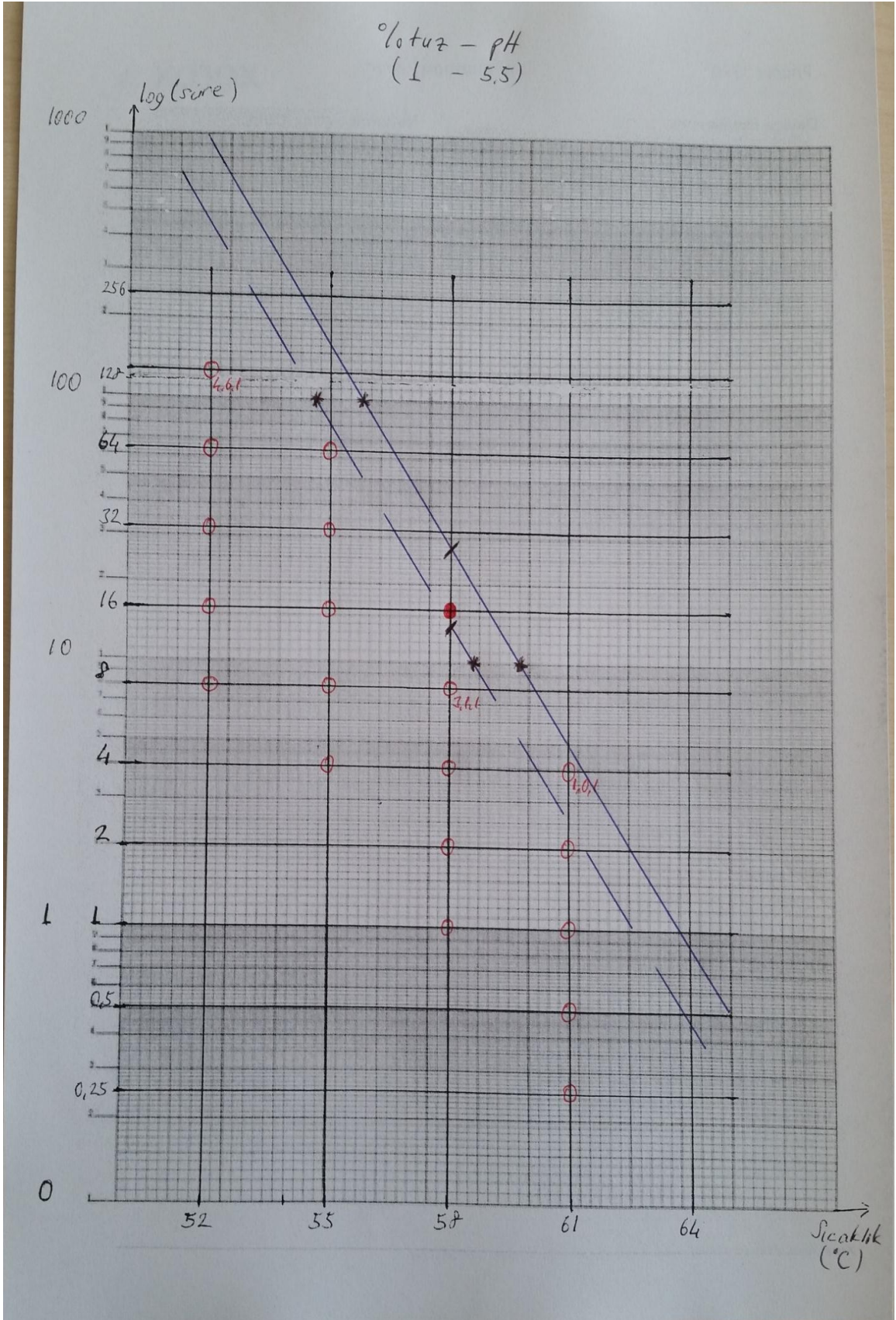
Şekil 4.11. % 5 tuz ve 5,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



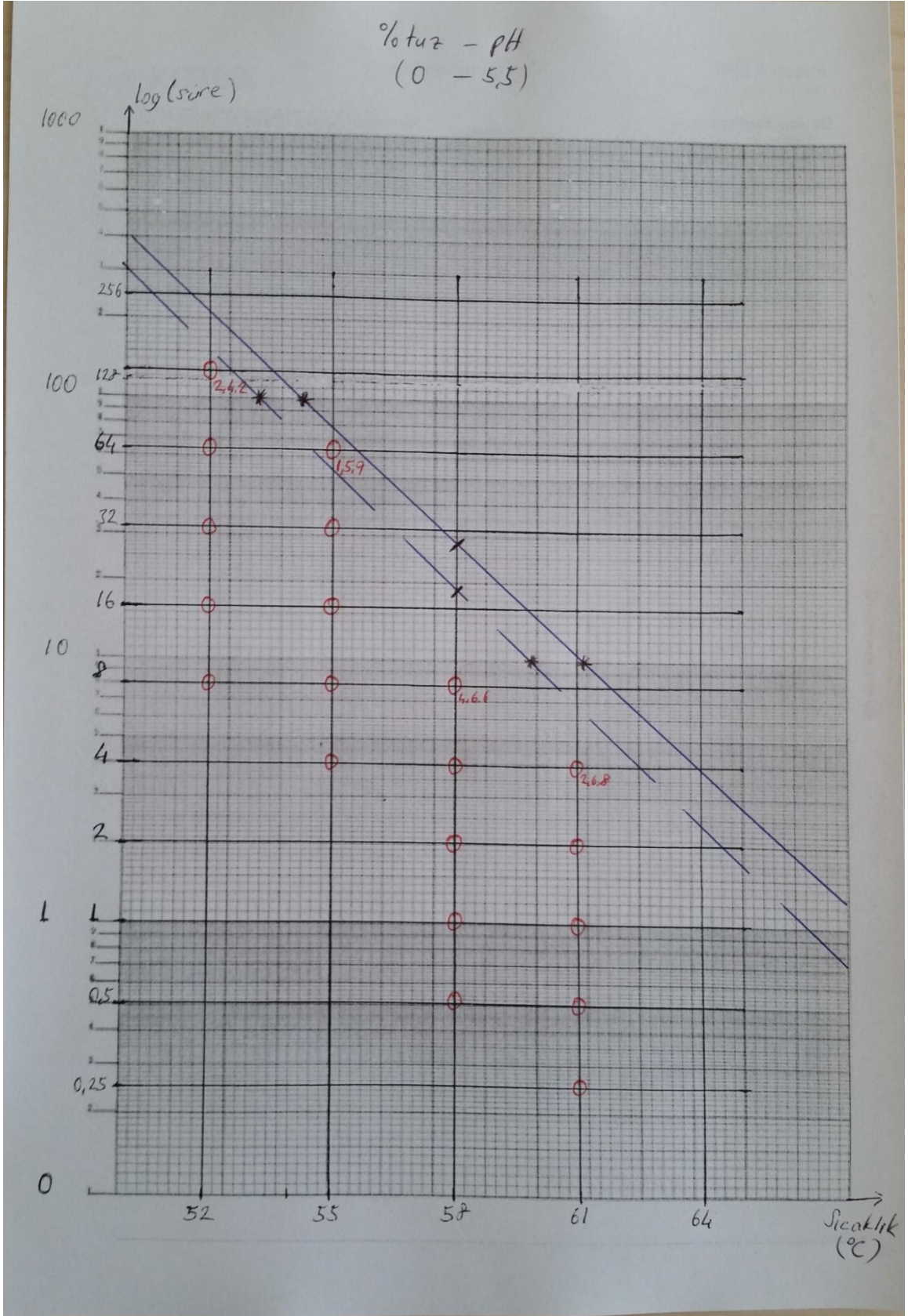
Şekil 4.12. % 3 tuz ve 5,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



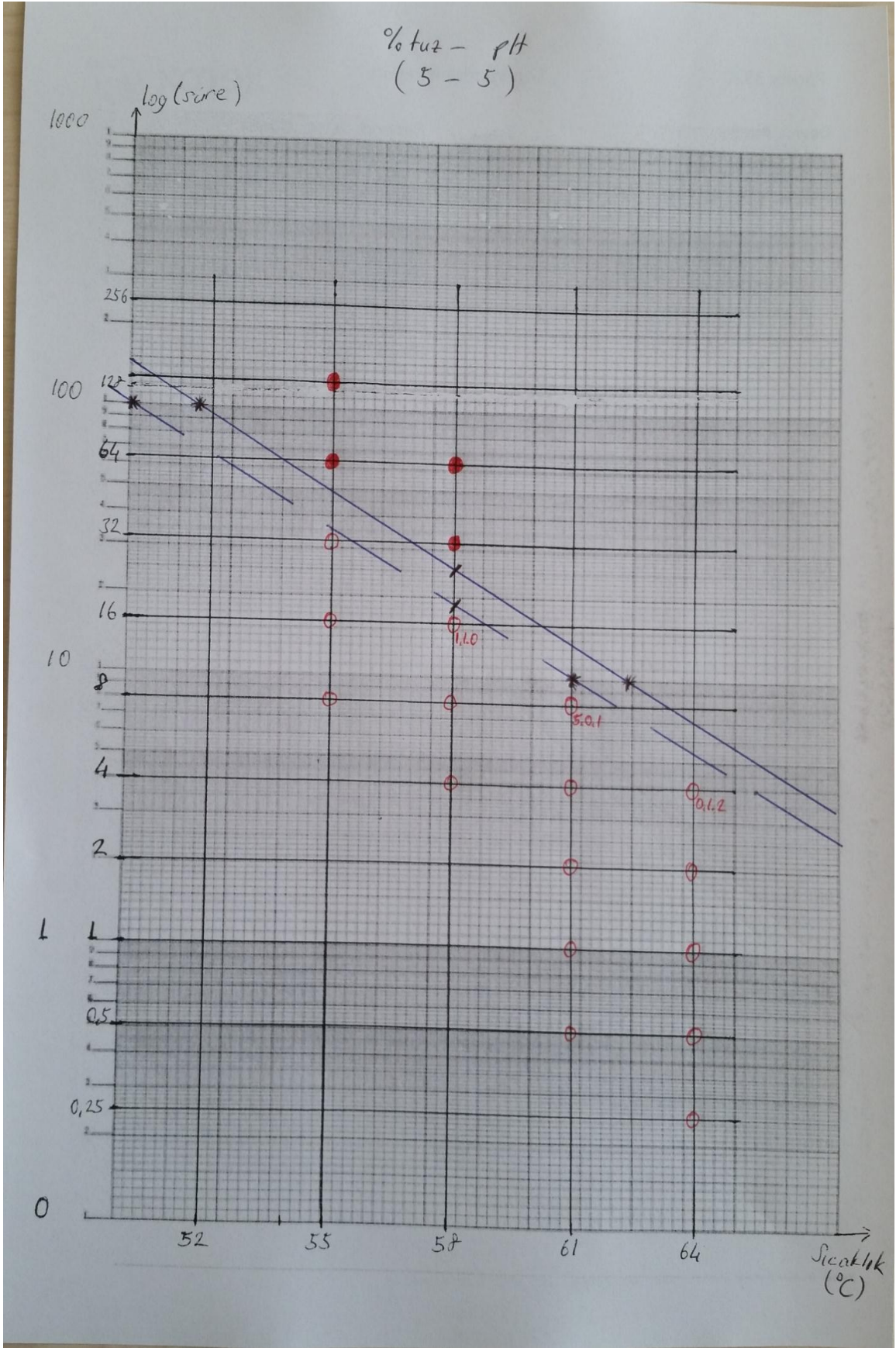
Şekil 4.13. % 2 tuz ve 5,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



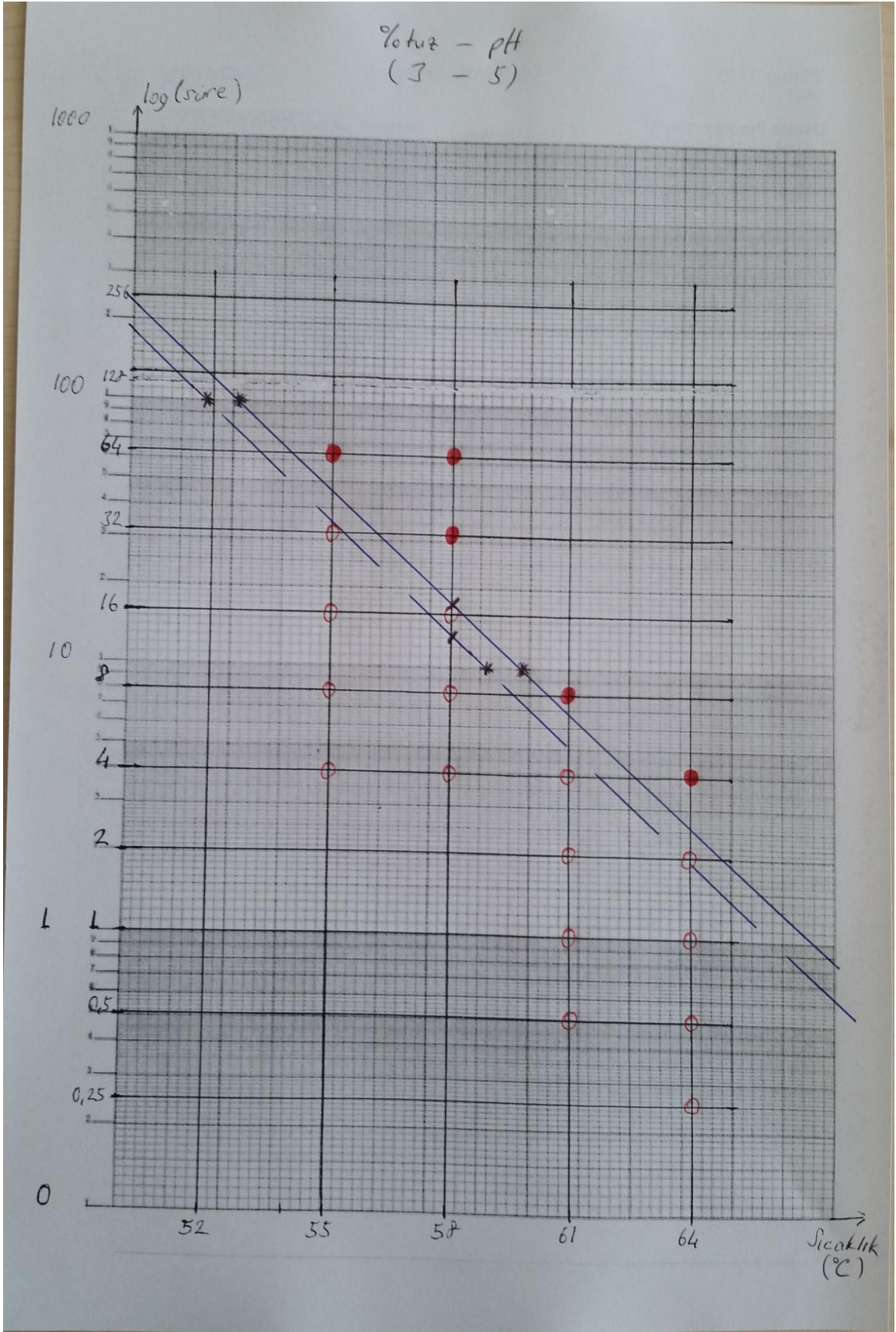
Şekil 4.14. % 1 tuz ve 5,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



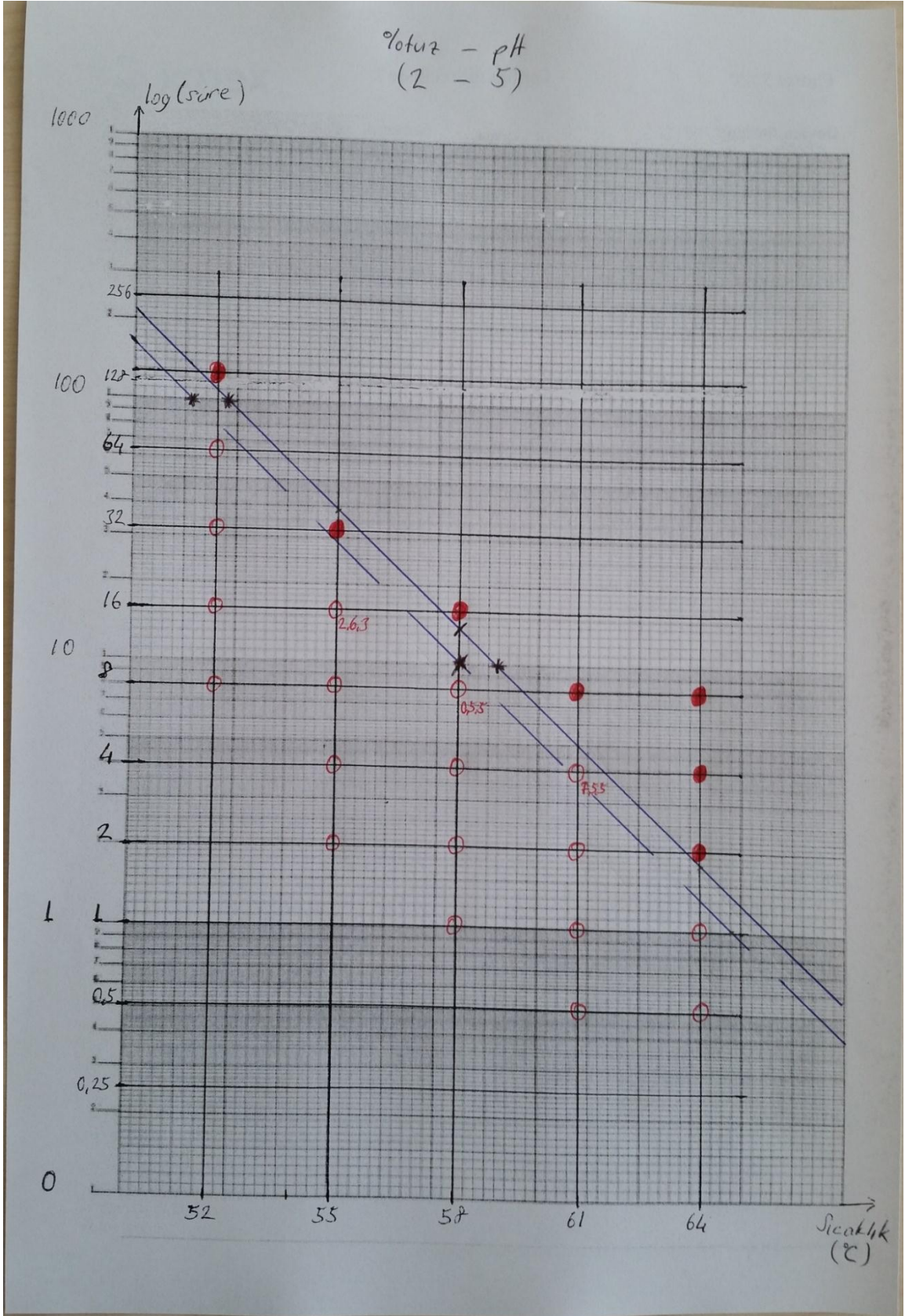
Şekil 4.15. % 0 tuz ve 5,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



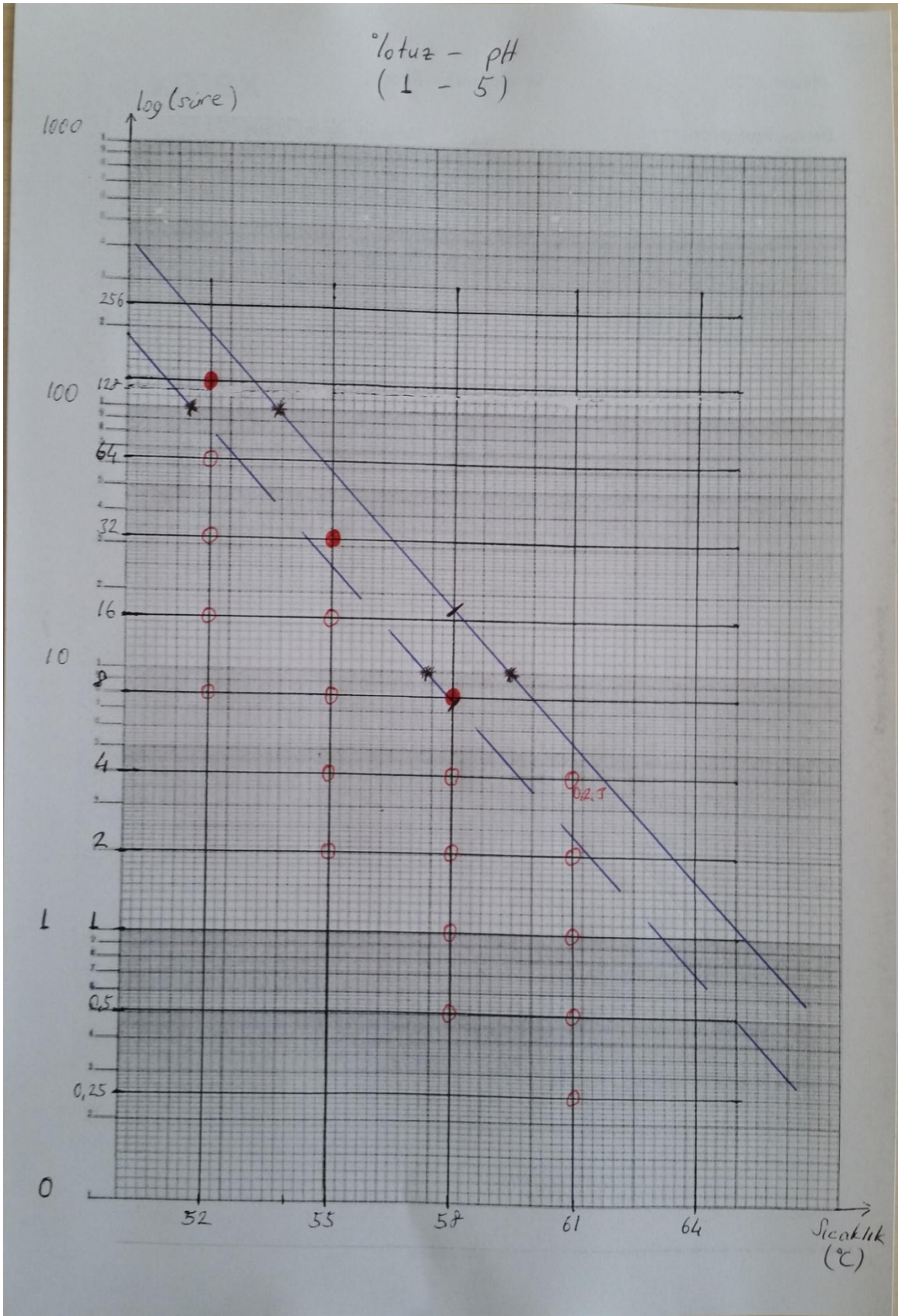
Şekil 4.16. % 5 tuz ve 5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



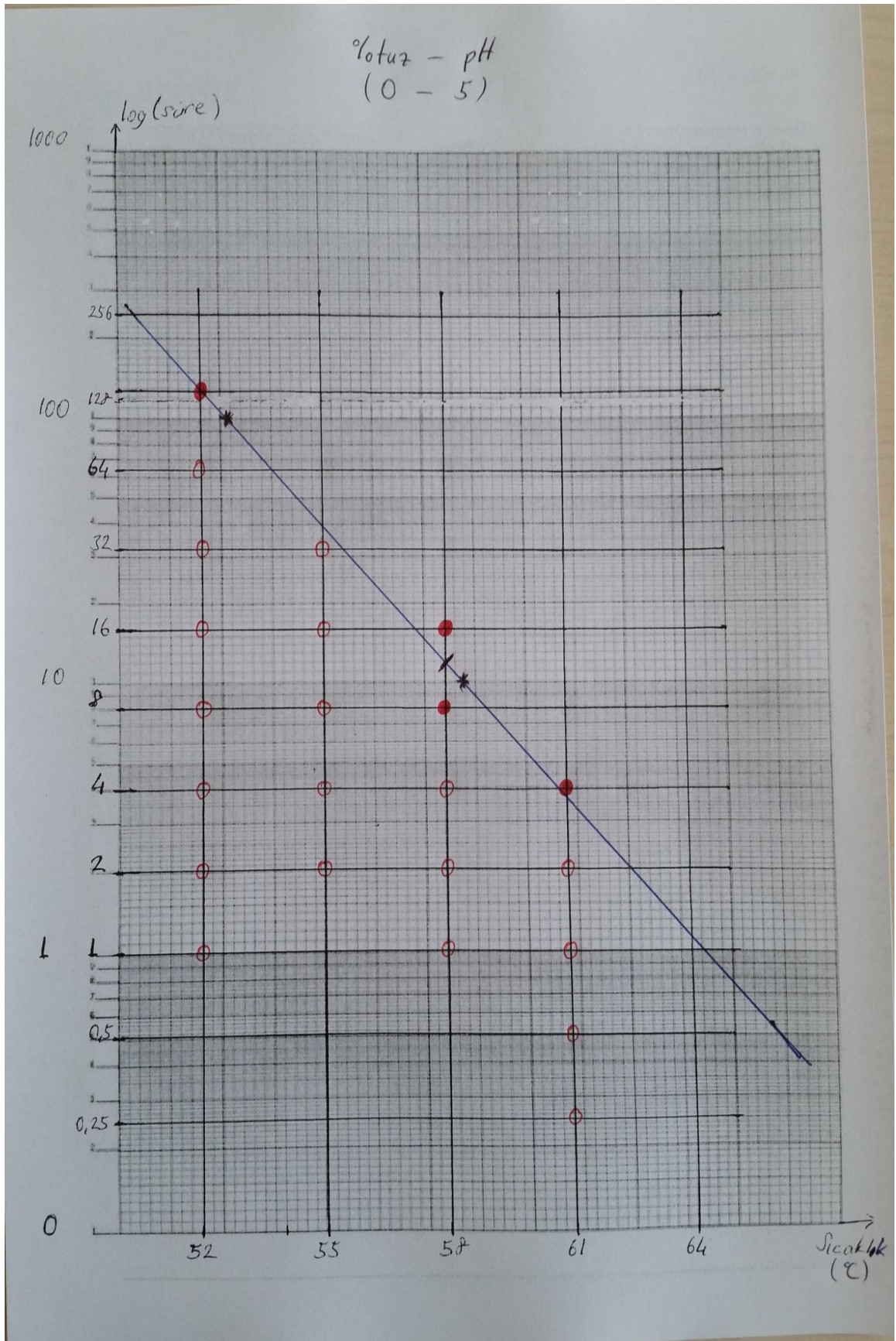
Şekil 4.17. % 3 tuz ve 5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



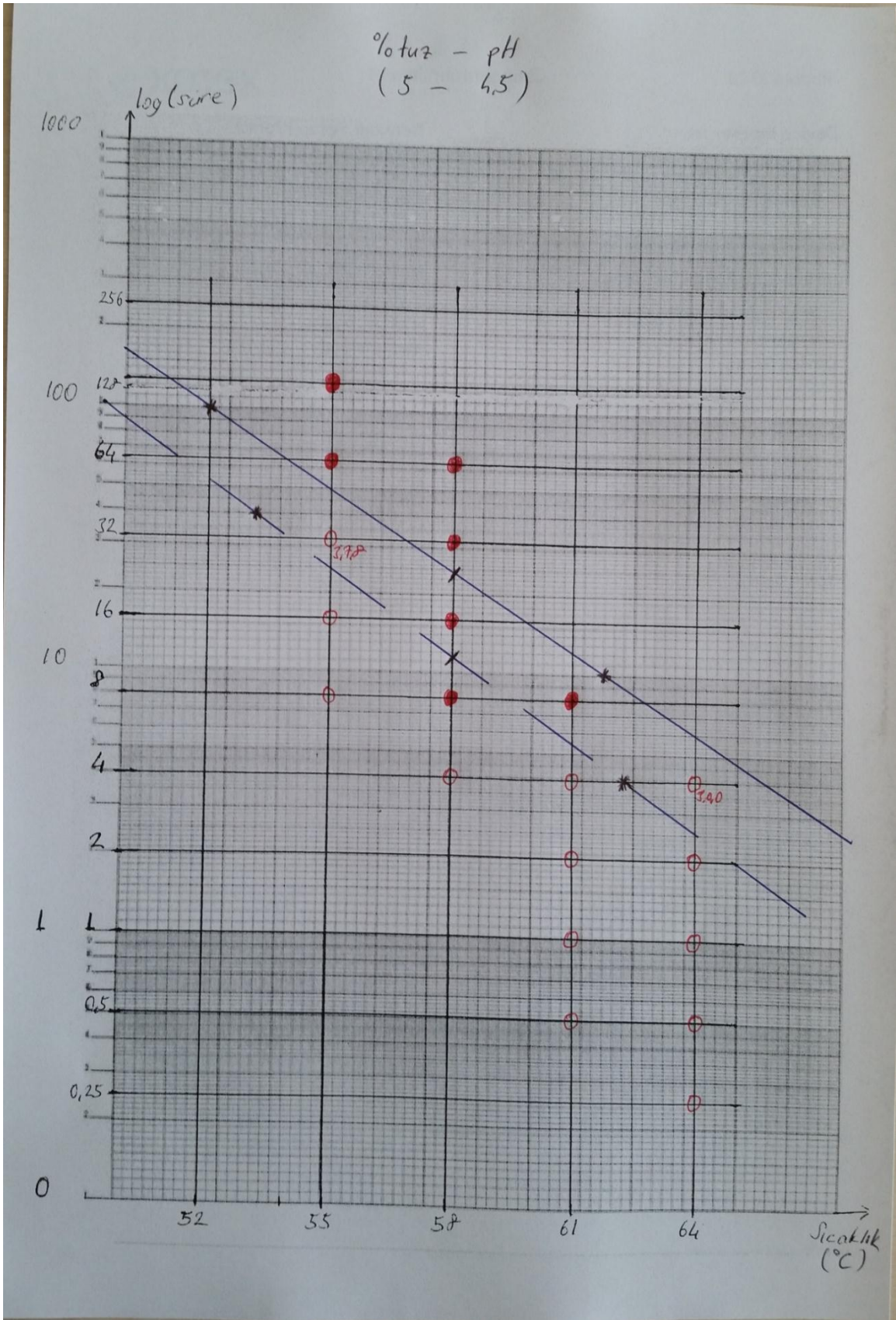
Şekil 4.18. % 2 tuz ve 5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



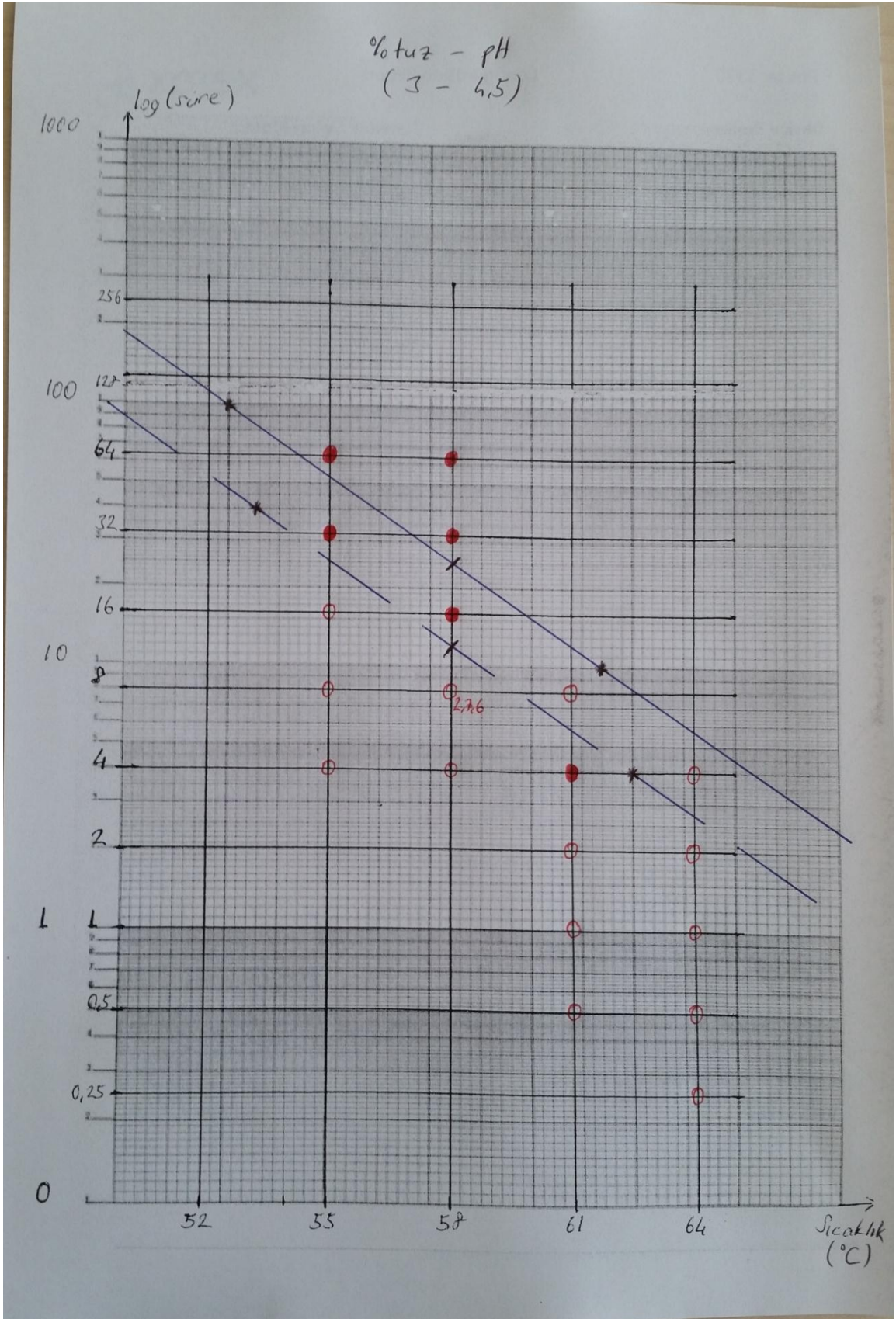
Şekil 4.19. % 1 tuz ve 5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



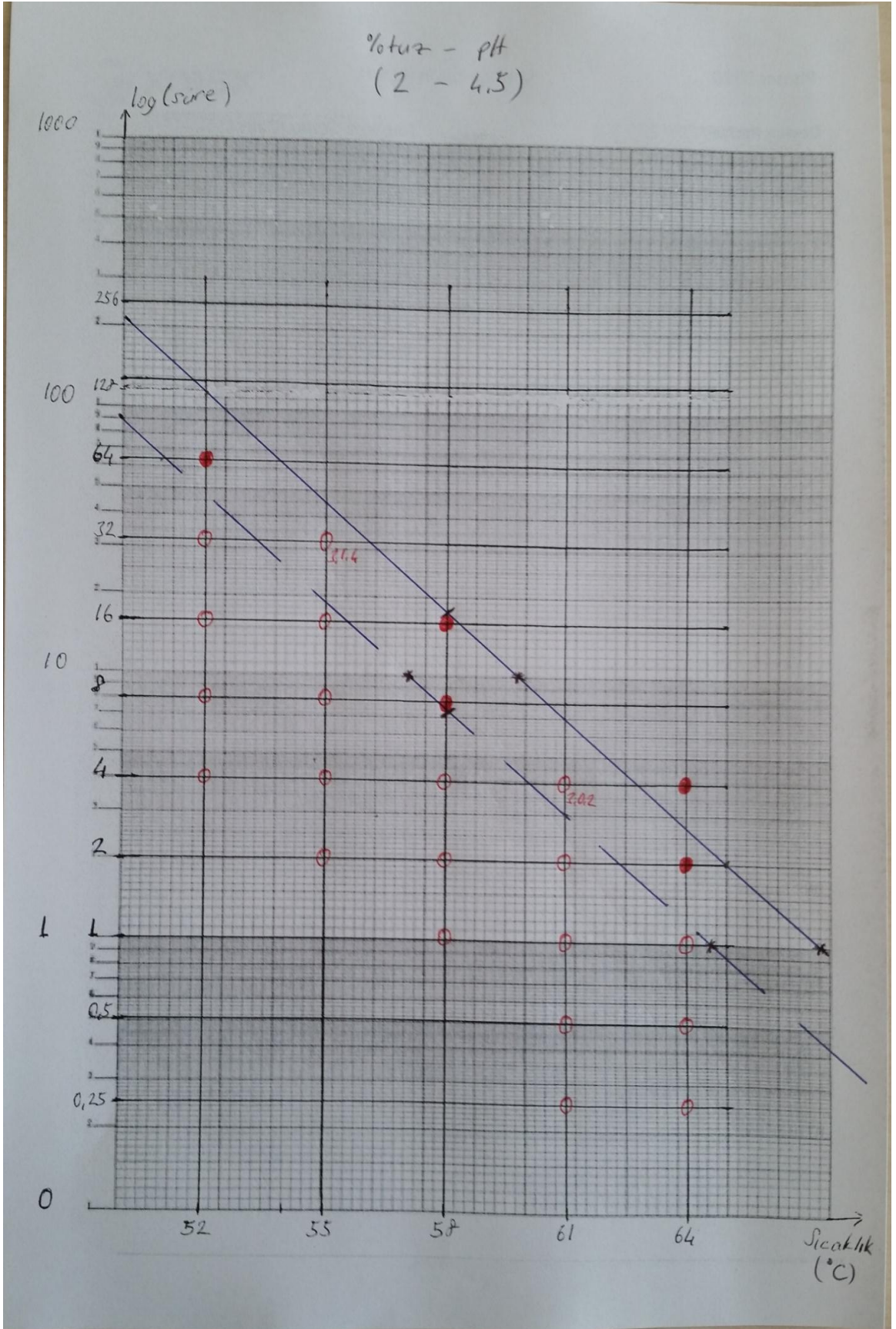
Şekil 4.20. % 0 tuz ve 5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



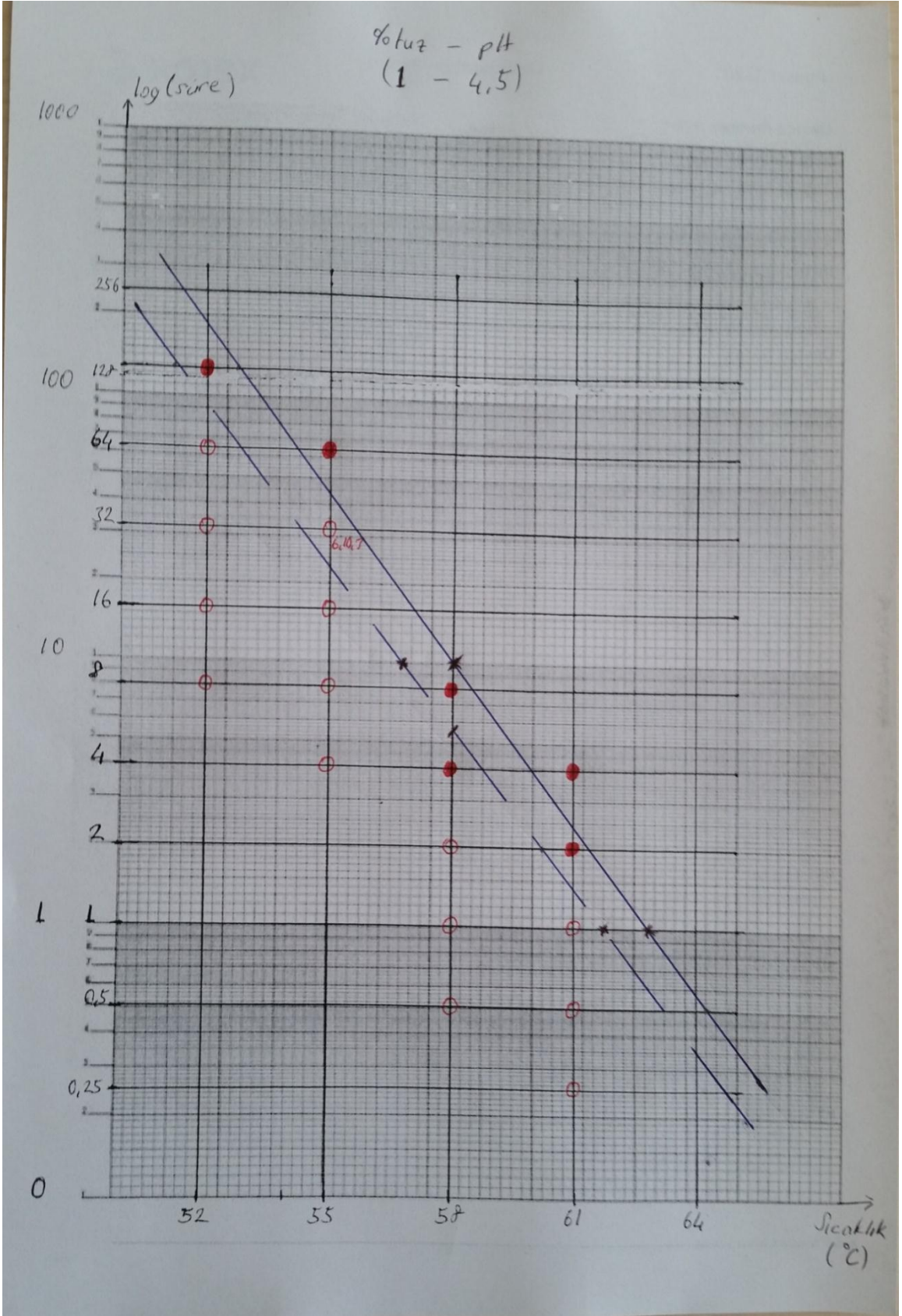
Şekil 4.21. % 5 tuz ve 4,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



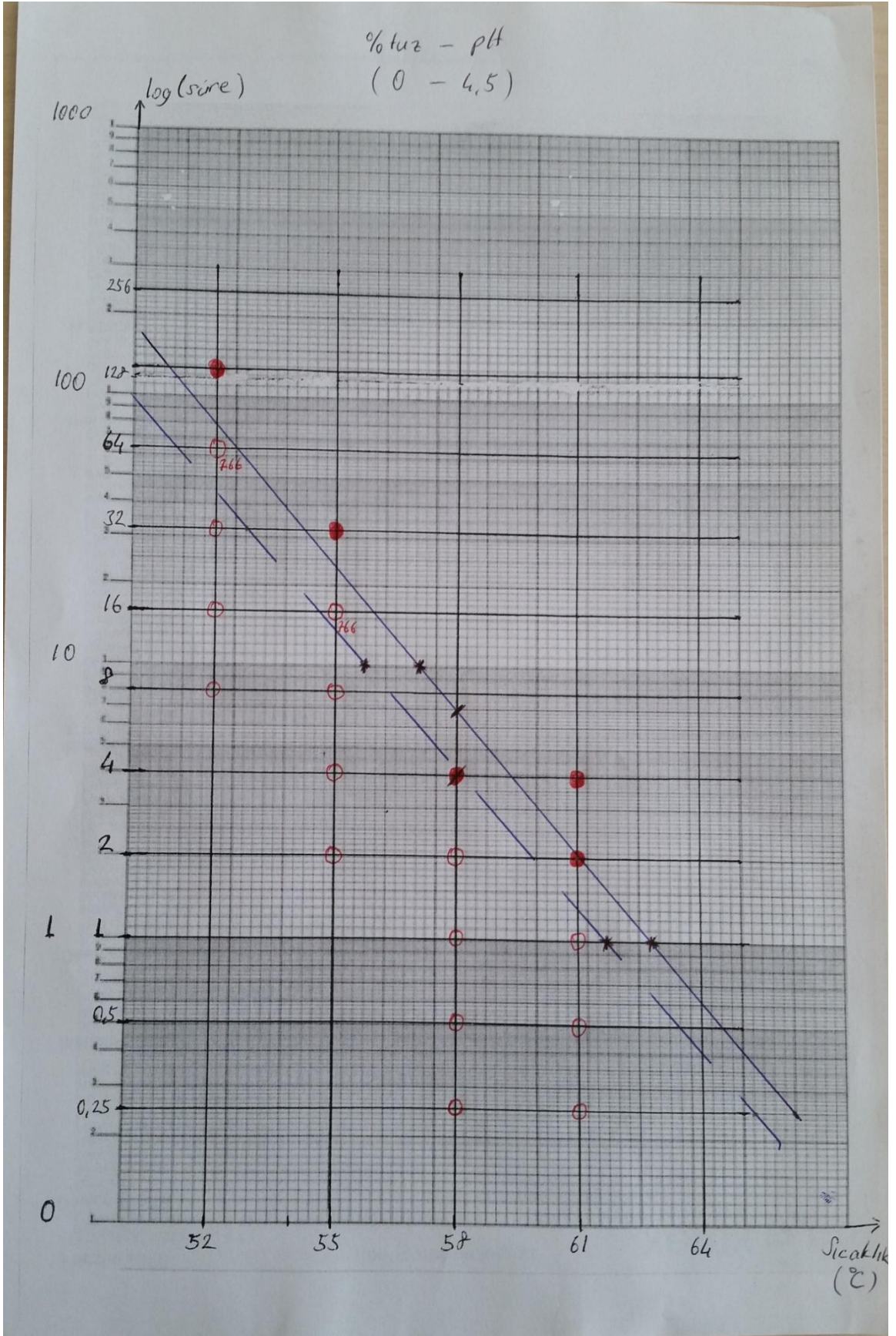
Şekil 4.22. % 3 tuz ve 4,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



Şekil 4.23. % 2 tuz ve 4,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



Şekil 4.24. % 1 tuz ve 4,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.



Şekil 4.25. % 0 tuz ve 4,5 pH' da *E. coli*'nin sıcaklıklara göre ölüm süresi.

4.4. Termal Ölüm Süresi Eğrilerinin Üzerinden z-Değerlerini ve Referans TÖS değerlerinin ve Referans D-Değerlerinin Belirlenmesi

Her iki eğride (kesikli ve devamlı çizgi ile gösterilen) 58°C dikey çizgisinin eğriyi kestiği noktanın karşılık geldiği TÖS değeri TÖS_{58°C} olarak kaydedildi. Ancak kabaca 3 log devre azalmayı temsil eden gölge TÖS eğrisinden elde edilen değer TÖS_{58°C(k)} olarak ve 4 log devre azalmayı temsil eden dolu çizi TÖS eğrisinden elde edilen değer TÖS_{58°C(d)} olarak grafikten okundu.

D-değerlerinin TÖS değerlerinden hesaplanması için TÖS değerinin kaç logaritmik devre azalmayı temsil ettiğini bilmek gerekir. Devamlı çizgi ile gösterilen TÖS_d eğrileri 4 logaritmik devre azalmayı temsil ettiğine göre örneğin Çizelge 4.27’de birinci satırda %0 tuz ve pH 4.5 için 58°C’deki referas TÖS_d değerinin 0.81 dakika olduğunu görüyoruz. TÖS_d değeri 4 log devre azalmayı temsil ettiğine göre devamlı çizgiden hesaplanacak D-değeri (%0 tuz ve pH 4.5 denemesi için 58°C’deki referas D-değeri) $0.81/4 = 0.2025$ dakika çıkacaktır. Aynı tuz ve pH kombinasyonu için kesikli çizgiden hesaplanan 58°C için TÖS_k değeri ise 0.6 dakikadır. TÖS_k değerleri 3 log devre azalmayı temsil ettiğine göre bundan hesaplanacak $D_{58°C(k)} = 0.6/3 = 0.2$ dakika olarak bulunur. Tüm D-değerleri hesaplandığında hesaplandığı bu derece aynı olacak veya deney hatalarının getirdiği küçük farklılıklar gösterebilecektir. Elde edilen verilerin çok fazla olması iki ayrı eğriden hesaplanan D-değerlerinin de bu yoğunluk içinde karışıklığa neden olacağı için D-değerleri tabloları hazırlanmamıştır. Bunun diğer bir nedeni ise bu çalışmada esas olanın *E. coli* ve benzeri patojen indikatörü ve patojen bakterilerin bir log azalması değil, etkili düzeyde (TÖS kadar azalmasıdır) bu nedenle D-değerlerinin referans TÖS değerlerinden nasıl hesaplanacağı burada belirtilmiş ayrıca D-değerleri tabloları yapılmamıştır.

Her iki eğriden TÖS değerlerinin 1 log devre azalmasına karşılık gelen sıcaklık farkı grafiğin x-ekseni üzerinde hesaplandı. Her iki eğrinin eğimi aynı olduğu için ikisinden de elde edilen z-değeri aynı oldu. Sonuçlar Çizelge 4.27’ de verilmiştir.

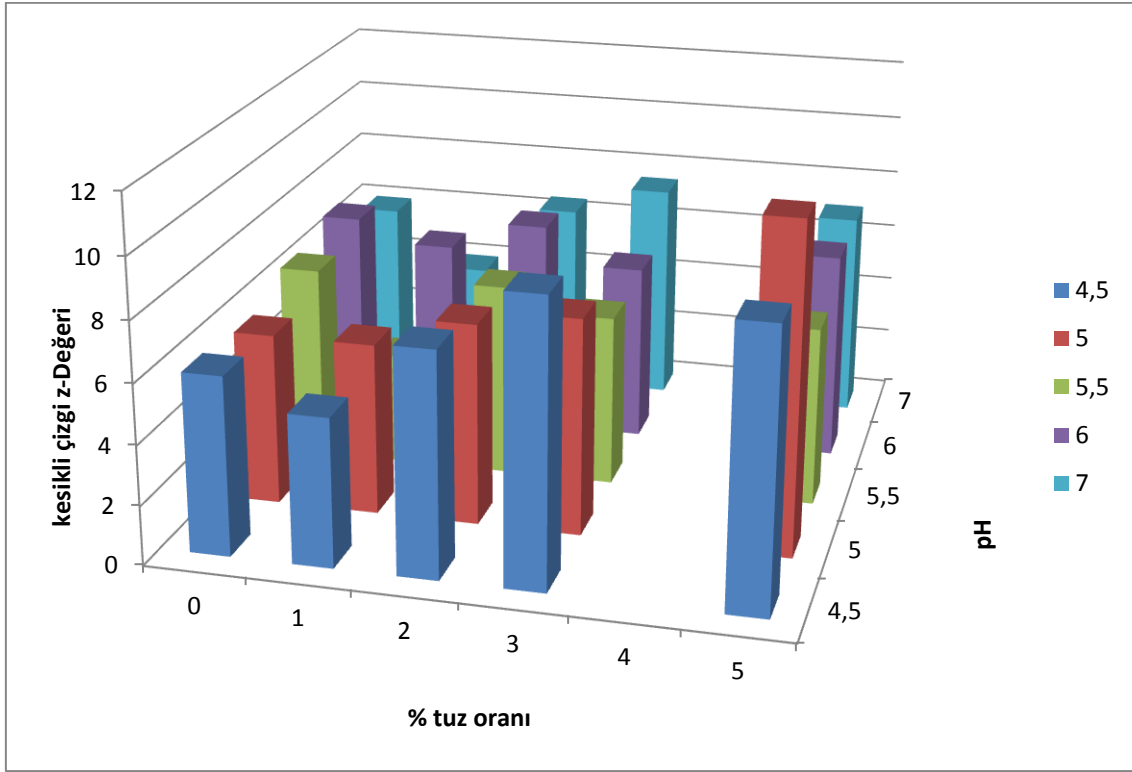
Çizelge 4.27. *E. coli.*'nin %0-5 tuz ve 4.5-7.0 pH'da Nutrient Broth ortamında z-değerleri ve referans TÖS değerleri

Tuz	pH	z	TÖS _{58°C}		Log(TÖS _{58°C(k)})	Log(TÖS _{58°C(d)})
			(k)	(d)		
0	4,5	6	4	6,5	0,6	0,81
1	4,5	5	5,5	10	0,74	1
2	4,5	7,5	7,5	19	0,88	1,28
3	4,5	10,25	11,5	24,5	1,06	1,39
5	4,5	9,25	11,5	25	1,06	1,4
0	5	5,75	11,5	11,5	1,06	1,06
1	5	5,75	7,5	17	0,88	1,23
2	5	6,75	10	13,5	1	1,13
3	5	7,25	13	17	1,11	1,23
5	5	10,5	18,5	25	1,27	1,4
0	5,5	6,5	19	28	1,28	1,45
1	5,5	3,75	13,5	17	1,13	1,23
2	5,5	6,5	10,5	13,5	1,02	1,13
3	5,5	5,75	26	45	1,41	1,65
5	5,5	6	27	57	1,43	1,76
0	6	7	14,5	38	1,16	1,58
1	6	6,5	14,5	22	1,16	1,34
2	6	6,25	12	24	1,08	1,38
3	6	8	21	32	1,32	1,51
5	6	6	23	29	1,36	1,46
0	7	6	11,5	25	1,06	1,4
1	7	4	15	15	1,18	1,18
2	7	6,5	11,5	24	1,06	1,38
3	7	7,25	18	30	1,26	1,48
5	7	7	19	27	1,28	1,43

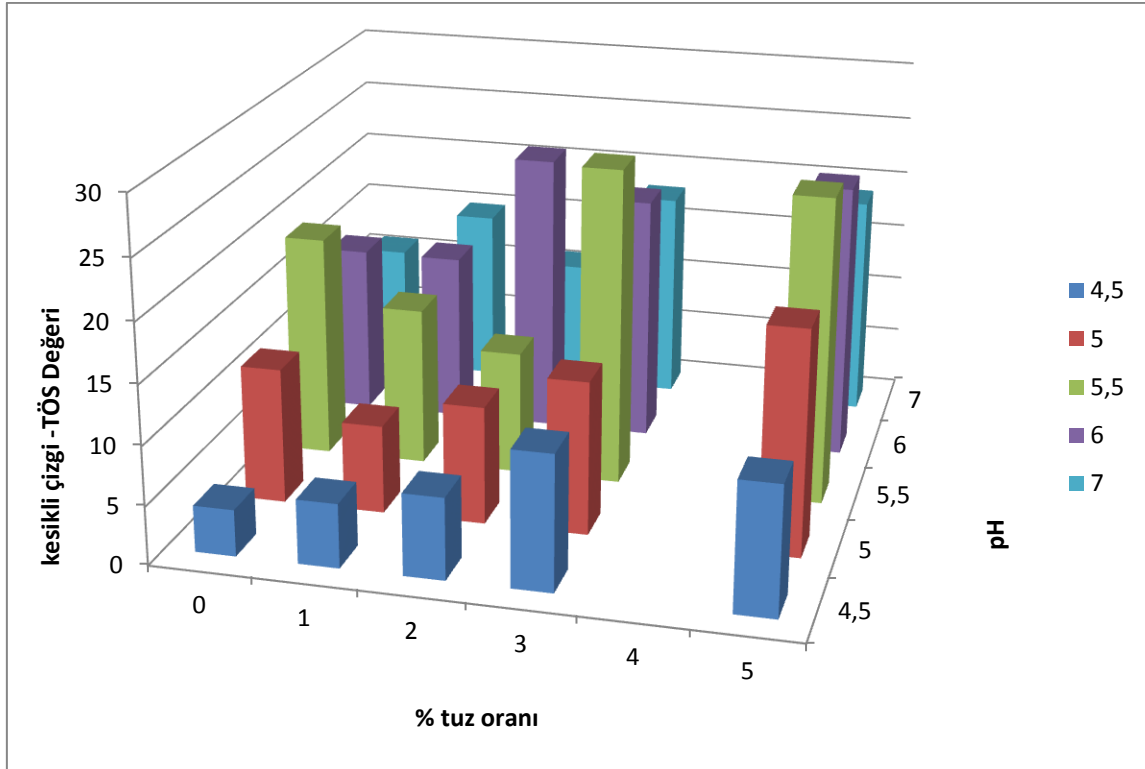
Çizelge 4.27'de görüldüğü gibi, eğrilerin her ikisinin de eğimleri aynı olduğu için her iki z-değeri de aynı oldu. Ancak devamlı çizgi ile çizilen TÖS eğrisi diğerinin yukarısında olduğu için iki eğri arasındaki yükseklik farkına bağlı olarak TÖS_{58°C(d)} değerleri TÖS_{58°C(k)} değerlerinden 2-5 kat daha yüksek olabildi.

4.5. *E. coli.*'nin %0-5 tuz ve 4.5-7.0 pH'da Nutrient Broth ortamında z-Değerlerinin değişimi

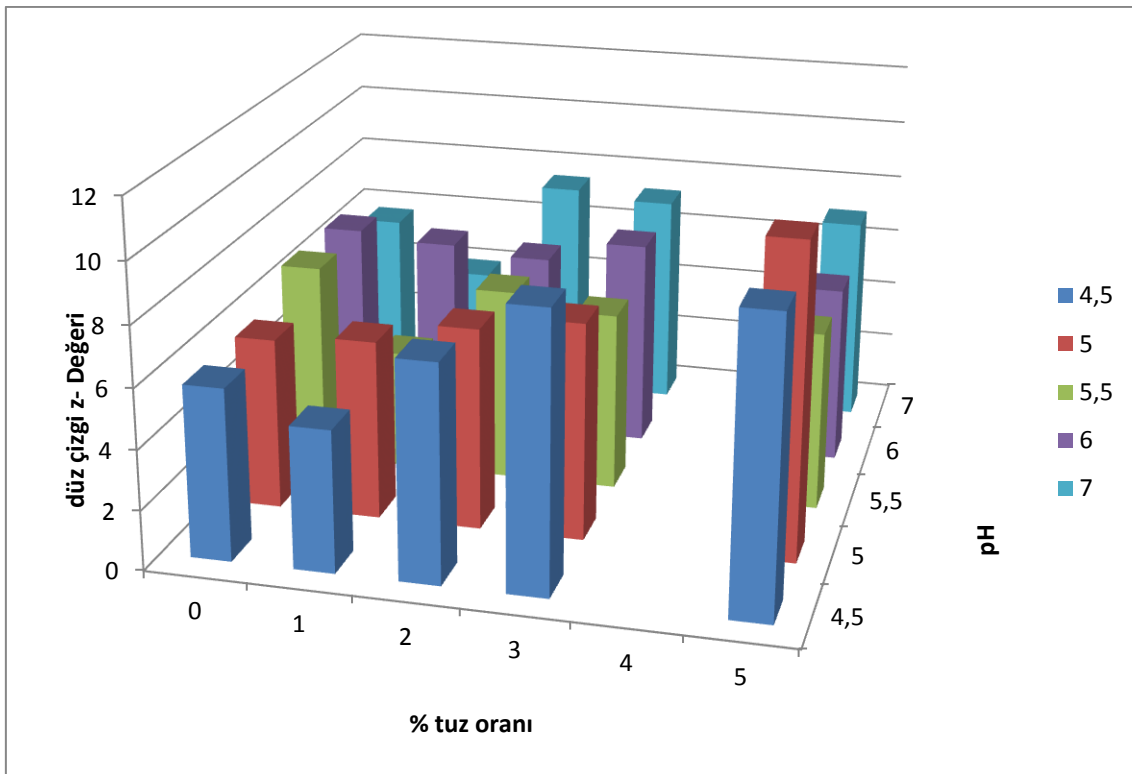
TÖS eğrileri üzerinden hesaplanan z-Değerlerinin tuz ve pH'ta bağlı değişimi Şekil 4.26'da grafik halinde verilmiştir.



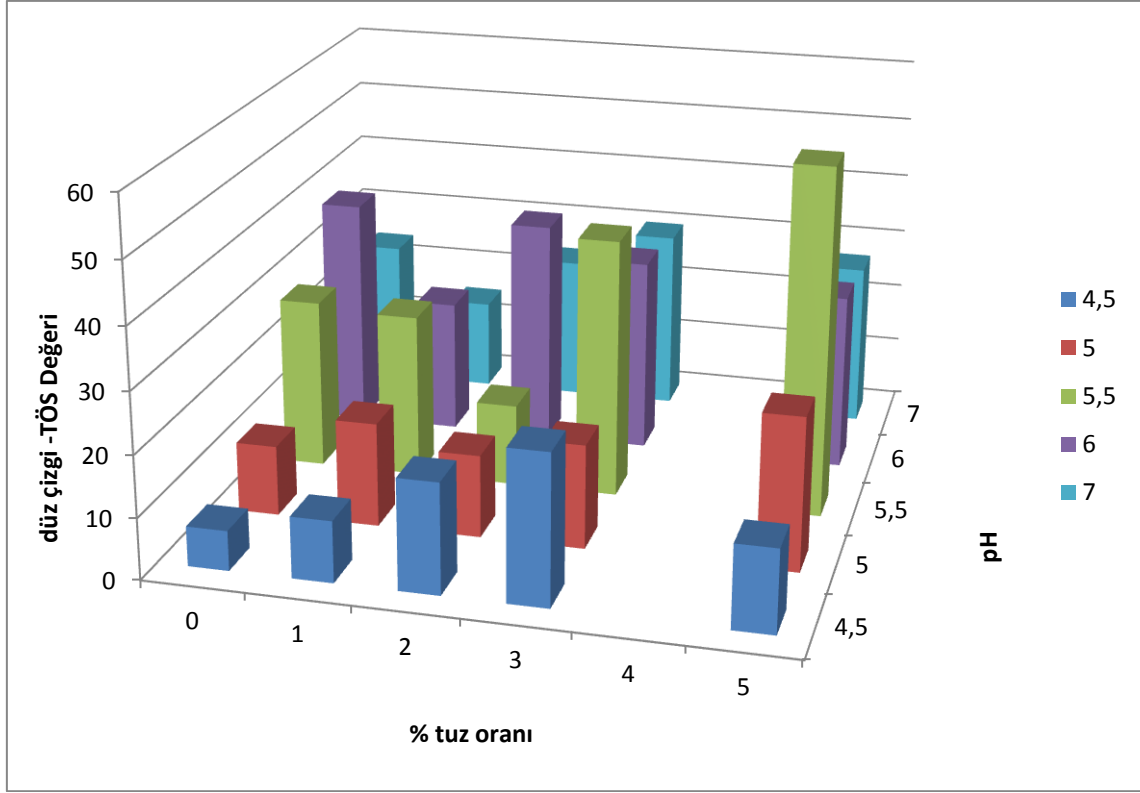
Şekil 4.26. Kesikli çizgi z-değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi.



Şekil 4.27. Kesikli çizgi TÖS değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi.



Şekil 4.28. Düz çizgi z-değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi.



Şekil 4.29. Düz çizgi TÖs değerlerinin tuz ve pH'ya bağlı değişimi.

Şekil 4.26'da tuz miktarı arttıkça z-değerlerinde de bir artış eğilimi görülmektedir. Bu trend pH'4.5 ve 5.0 çalışmalarında çok açık görülürken diğer pH'larda çok belirgin değildir.

Yine Şekil 4.28 incelendiğinde görüleceği üzere çok belirgin olmamakla birlikte düşük pH'lara ait z-değerleri yüksek pH'lara ait z-değerlerinden biraz daha yüksektir veya en azından pH'daki düşüğe bağlı olarak z-değerlerinde bir azalma görülmemektedir. Daha detaylı bir değerlendirme istatistiksel analiz verileri ile yapılabilir. *E. coli*'nin %0-5 tuz ve 4.5-7.0 pH'da Nutrient Broth ortamında z-değerlerinin değişiminin istatistiksel değerlendirilmesinde Doğrusal Regresyon kullanıldı.

4.6. Tuz ve pH'nın TÖs Değeri Üzerine Etkisi

Hem kesikli çizgi ile gösterilen gölge TÖs eğrisinden elde edilen ve 3 log devre azalmayı temsil eden $TÖs_{58^{\circ}C(k)}$ değeri, hem de düz çizgi ile gösterilen TÖs eğrisinden elde edilen ve 4 log devre azalmayı temsil eden $TÖs_{58^{\circ}C(d)}$ değerleri üzerine tuz ve pH'nın etkisi regresyon analizi ile ayrı ayrı ortaya konmaya çalışılmıştır. Ancak TÖs

eğrisinin doğası gereği, TÖS üzerine sıcaklığın etkisi logaritmik olduğu için $TÖS_{58^{\circ}C}$ değerleri logaritmaları alınarak regresyon analizine uygulanmışlardır.

Çizelge 4.28. Tuz ve pH'nın $TÖS_k$ üzerine etkisine ait Varyans Analizi tablosu^a

Model		Kareler		Kareler Ort.	F	p
		toplamı	S.D.			
1	Regresyon	,478	2	,239	11,012	,000 ^b
	Hata	,477	22	,022		
	Toplam	,955	24			

a. Bağımlı değişken: $\text{Log}TÖS_k$

b. Bağımsız değişkenler: (Constant), pH, Tuz

R-kare=0.500

Çizelge 4.28'de görüldüğü gibi tuz ve pH'nın kesikli TÖS eğrisi üzerinden elde edilen ve 3 log devre azalmayı temsil eden $TÖS_k$ değerleri üzerine etkisi önemlidir($p=0.000$) ve bu etkinin aşağıda gösterilen matematiksel modeli değişimin %50'sini açıklayabilmektedir.

Çizelge 4.29. Tuz ve pH'nın $TÖS_k$ üzerine etkilerine ait doğrusal modelin katsayıları ve onlara ait t ve p değerleri

Model		Standardize edilmemiş katsayılar		Standardize ed. katsayılar	t	p.
		B	Std.Hata	Beta		
1	(Sabit)	,376	,198		1,901	,070
	tuz	,059	,017	,522	3,461	,002
	pH	,109	,034	,478	3,169	,004

a. Bağımlı değişken: $\text{Log}_TÖS_k$

Çizelge 4.29'a göre; $TÖS_k$ değerleri üzerine tuz pH'nın birlikte etkisine ait doğrusal matematiksel model;

$$TÖS_{58^{\circ}C(k)}(\text{dak.}) = 0.376 + 0.109 * \text{pH} + 0.059 * \text{Tuz}(\%)$$

Çizelge 4.29'da ve model 30'da görüldüğü gibi %1 birimlik tuz artışı $\text{log}TÖS_{58^{\circ}C(k)}$ değerini 0.059 log birimi artırmaktadır. Bunun anlamı her %1 tuz artışında TÖS değerinin %11.5 kadar artacağı şeklindedir. Yine 1 birimlik pH artması $\text{log}TÖS_{58^{\circ}C(k)}$ değerini 0.109 log birimi artırmaktadır. Bunun anlamı her bir birim pH

artışında TÖS değerinin %12.8 kadar artacağı şeklindedir. Model tümü ile istatistiksel olarak önemli ($p=0.001$) tuz ile ilgili önemlilik katsayısı 0.05'den küçük çıkmıştır. Modele göre ortama ilave edilen tuz bakterinin dayanıklılığını artırmaktadır. Yaygın kanı tuzun mikrobiyolojik bozulmaya karşı bir dayanıklılık etkeni olduğu şeklinde olmakla birlikte, tuz, şeker, protein, vb. ortamda çözünür madde konsantrasyonunu artıran maddeler mikroorganizmaların dayanıklılığını da artırmaktadır.

TÖS_{58°C(k)} üzerine pH'nın etkisi: Kesikli TÖS eğrisi kabaca 3 log devre azalmayı göstermektedir. Buna göre bu düzeyde azalma için geçen süre her bir birim pH yükselmesinde %12.8 kadar artmaktadır. Bu bulgu da literatür ile uyumludur.

Devamlı çizgi ile çizilen TÖS eğrisi de hedef mikroorganizmamızın 4 log ünite azaldığı süreleri temsil etmektedir. Bu TÖS eğrisinin çizilmesinde eğimler paralel ama eğrilerin arasındaki mesafe bir miktar değişkendir. Bu nedenle varyans analizi sonuçlarında denklik katsayılarında bir miktar farklılıklar olmuştur.

TÖS_d değerleri üzerine tuz ve pH'nın etkisine ait varyans analizi tablosu Çizelge 4.30'da ve doğrusal model katsayıları ise Çizelge 4.31'de verilmiştir.

Çizelge 4.30. Tuz ve pH'nın TÖS_d değerleri üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu

Model	Kareler toplamı	S.D.	Kareler Ort.	F	p
1 Regresyon	,413	2	,206	7,130	,004 ^b
Hata	,637	22	,029		
Toplam	1,049	24			

a: Bağımlı

değişken: LogTÖS_d

b: Bağımsız değişkenler pH, tuz

r-kare: 0.393

Çizelge 4.30'da görüldüğü gibi doğrusal model tüm olarak istatistiksel olarak önemlidir ($p=0.004$). Bu ilişkiye ait R-kare değeri 0.393 olarak bulunmuştur. Başka bir deyişle model TÖS_d değerlerindeki değişmelerin %39.3'ünü açıklayabilmektedir.

Çizelge 4.31. Tuz ve pH'nın TÖS_d üzerine etkilerine ait doğrusal modelin katsayıları ve onlara ait t ve p değerleri

Model	Standardize edilmemiş katsayılar		Standardize ed. katsayılar	t	Sig.
	B	Std. hata	Beta		
1 (sabit)	,688	,228		3,013	,006
tuz	,059	,020	,495	2,979	,007
pH	,092	,040	,385	2,320	,030

a. Dependent Variable: LogTÖS_d

Çizelge 4.31.'de görüldüğü gibi tuz ve pH'nın TÖS_{58°C(d)} üzerine etkisine ait doğrusal model;

$\text{LogTÖS}_{58^\circ\text{C}(d)} = 0.688 + 0.092 * \text{pH} + 0.059 * \text{tuz}(\%)$ şeklindedir.

Bu denklik de TÖS_{58°C(d)} değerlerinin tuz içeriğinde her %1 artışta %11.5 kadar ve her bir birim pH yükselmesinde %12.4 kadar artacağını göstermektedir.

4.7. Tuz ve pH'nın z-Değerleri Üzerine Etkisi

Elde edilen z-değerleri her iki eğri içinde aynı olduğu için tek bir değerlendirme yapıldı. Tuz ve pH'nın z-değeri üzerine etkileri Doğrusal Regresyon ile değerlendirildi. Değerlendirmeye ait varyans analizi Çizelge 4.32'de ilişkiye ait varyans analiz tablosu görülmektedir. İlişki, yani tuzun ve pH'nın birlikte z katsayısının üzerine etkisi önemli bulunmuştur (p=0.000).

Çizelge 4.32. Tuz ve pH'nın z-değerleri üzerine etkisine ait Varyans Analizi tablosu

Model	Kareler toplamı	S.D.	Kareler Ort.	F	p
1 Regresyon	,478	2	,239	11,012	,000 ^b
Hata	,477	22	,022		
Toplam	,955	24			

a. Bağımlı değişken: Log_TÖS_k

b. Bağımsız değişkenler : pH, tuz

R-kare: 0.500

Bu ilişkiye ait R-kare değeri 0.500 olmuştur. Bu kurulan modelin z-değerlerindeki değişimin %50'sini açıkladığını göstermektedir.

Modelin katsayılarının değerleri ve istatistiksel olarak önemlilikleri Çizelge 4.32’de görülmektedir.

Çizelge 4.33. Tuz ve pH’nın z-üzerine etkilerine ait doğrusal modelin katsayıları ve onlara ait t ve p değerleri

Model	Standardize edilmemiş katsayılar		Standardize ed. katsayılar	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	8,610	1,809		4,759	,000
tuz	,457	,157	,506	2,918	,008
pH	-,524	,313	-,290	-1,673	,109

a. bağımlı değişken : z-değeri

Buna göre pH’da bir birimlik yükselme z-değerini 0.524 birim azaltmakta ve tuz konsantrasyonunda bir birimlik artış ise z-değerini 0.457 birim artırmaktadır. Buna göre doğrusal model aşağıdaki gibidir:

$$z\text{-değeri} = 8,610 - 0.524 * \text{pH} + 0.457 * \text{tuz}(\%)$$

Bu ilişkiye ait R-kare değeri 0.34’dür başka bir ifade ile bu çalışmada z-değerlerindeki değişimin sadece %34’i yukarıdaki modelle açıklanabilmektedir.

Mikrobiyal inaktivasyonda z-değerinin anlamı sıcaklığa karşı duyarlılıktır. Örneğin kimyasal bozulmalar, mikrobial inaktivasyona nazaran sıcaklık artışına çok duyarlı olmadıkları için modern pastörizasyon ve sterilizasyon mümkün olduğunca yüksek sıcaklıkta yapılır. Sıcaklık yükseldikçe sıcaklık nedeniyle kayıp az artarken mikroorganizma ölümü çok daha fazla olur ve bize bu durum süreyi kısaltma imkanı verir. Sonuçta kısalan süre ile ısı işlemin gıda üzerine olumsuz etkisi de azalmış olur. Yukarıdaki denklik incelendiğinde; tuzun her %1 artışında z-değerinin 0.457⁰C arttığı görülmektedir. Bu durum yukarıda TÖS değerlerinin tuz ilavesi ile artışı ile paralellik göstermektedir. Bunun yorumu ortamda tuz arttıkça, tuzun ısı işleme karşı mikroorganizmaları koruyucu etkisini artırdığını (TÖS değerlerinde görüldüğü gibi) ve inaktivasyon reaksiyonunun sıcaklığa duyarlılığının azaldığını ifade etmektedir. Bu sonuçta bu çalışma ile genel kanının aksine konulan bir kavram niteliğindedir.

Daha farklı bir eğilim, bu modelde, pH yükseldikçe, yani nötre yaklaştıkça bakteri inaktivasyon reaksiyonunun sıcaklığa duyarlılığının azaldığı şeklindedir. Ancak bu olgu istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p>0.05). Böyle bir olgu TÖS

değerlerinin pH düştükçe azalışına ters gibi düşmekte ise de TÖS eğrilerinin pH düştükçe başlangıç noktalarının çok önemli ölçüde artması ve deneme sıcaklıklarında eğim azalışının başlangıç değerleri artışı yanında önemsiz kalması ile açıklanabilir. İstatistiksel olarak önemli çıkmayan bu olgu mutlaka çok daha detaylı çalışmalar ile yeniden incelenmelidir.

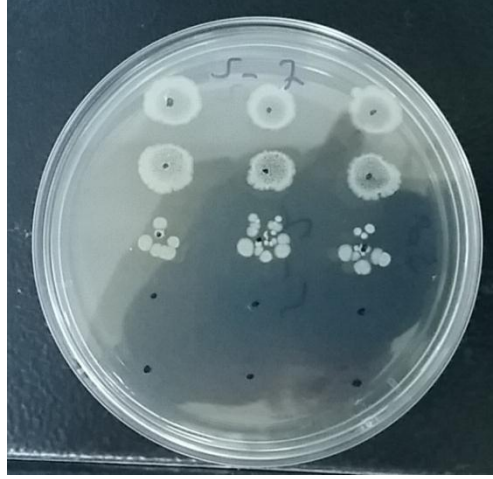
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Termal ölüm süresi kavramı ortamda var olan tüm mikroorganizmaların inaktive edilmesi ile ilgilidir. Bu nedenle hedef inaktivasyon düzeyi, ortamda var olan veya potansiyel olarak risk oluşturacak düzey veya o mikroorganizmanın azaltılması gereken düzey olarak belirlenir. Bu düzey *C. botulinum* gibi bakterilerin sporları için 10^{-12} kabul edilmiştir. Başka bir deyişle konserve kutusunun için de potansiyel olarak beklenen düzeyin 12 log devre azaltılması hedeflenmiştir. Çalışma şartları sonuçların üredi/üremedi şeklinde alınmasını daha kolay kılmaktadır. Böyle bir inaktivasyon çalışmasında hedef mikroorganizma azaltılması gereken düzeyde test ortamının içine ilave edilir ve bunlar 110-120 °C gibi yüksek sıcaklıklarda dayanacak şekilde kapatılır ve test sıcaklığında periyodik olarak alınıp içeriği besi yerine aktarılır. Ve sonuç üredi/üremedi şeklinde değerlendirilir. Bu çalışmadaki gibi grafiklere işlenen değerlerden TÖS eğrileri elde edilir. Kalitatif olan bu yöntemin yerine ileriki yıllarda canlı kalan hücre/spor sayıları üzerinden bir log devre azalmayı (D-değerini) hesaplayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu yaklaşım daha zor ama verilerin daha verimli değerlendirildiği bir yöntemdir.

Sporlu patojen bakteriler için önemli olan TÖS kavramı, günümüzde patojen sporsuz bakteriler için de önemli hale gelmiştir. Sporsuz patojen bakterilerde TÖS için 4, 5 (4D, 5D) logaritmik devre azalma esas olarak alınmaktadır (Çoksöyler ve Avşaroğlu, 2013). Yapılan bu çalışmada TÖS için 4D'lik bir azalma esas olarak alınmıştır.

Bu çalışmada kullanılan sıcaklık dereceleri 100°C'nin altında olduğu için bu sıcaklığı elde etmede basınç altında veya sızdırmaz kapalı kapılar tüplere ihtiyaç duyulmamıştır. Yağ banyosunda bekleyen kapılar tüpler yerine belli konsantrasyonda hücre içeren belli sıcaklıkta tutulan bir kültür veya inaktivasyon ortamı kullanılmış, aseptik şartlar altında buradan alınıp besi yerine ekilen hücre miktarı da belli olmaktadır. Bu çalışmanın kolaylığı ve pratikliği anlamında önemlidir. Bu sayede çok fazla sayıda pH ve tuz kombinasyonu çalışması, 3 paralel olarak kolayca yürütülebilmektedir.

Bu çalışmada belli sıcaklıkta tutulan inaktivasyon ortamından alınan örnekler, klasik yöntemde olduğu gibi sıvı besi yerine değil, katı besi yeri üzerinde önceden işaretlenmiş noktalara damla plaka tekniği kullanılarak ekilmiştir. Bu durumda üç ayrı görünüm ortaya çıkmaktadır. Birincisi; örnekleme anında kültür ortamında en az 4 log devre azalma meydana geldi ise ekim noktasında hiç koloni gelişmemektedir. İkinci durum ise örnekleme anında kültür ortamında en fazla 1-2 log devrelik bir azalma gelmiş olmasıdır. Bu durumda ekim noktasında muhtemelen mikro kolonilerin bileşiminden meydana gelen ve yaklaşık 0.5 cm çapında bir koloni oluşmaktadır. Bu sonuç üredi olarak kaydedilmektedir.



Şekil 34: İnkübasyon sonrası gelişen koloniler.

Üçüncü durum ise yaklaşık 3 log devre azalma meydana gelmesi durumudur. Bu durumda ekim noktasında sayıları 10'a varmayan birkaç toplu iğne başı koloni oluşmaktadır. Sayıları 10'u bulmayan sayılabilir miktarda koloni oluşumu bize, bu çalışmada yaklaşık 3 log devre azalmayı göstermektedir.

Eğer TÖS için hedeflenen düzey örneğin 7 log devre azalma olsaydı bu sayılabilir minik koloni oluşumları 6 log devre azalmayı gösterecekti. Bu durum klasik TÖS belirlemede yoktur. Bir iki yüksek lisans ve doktora tezinde ön deneme olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada iki TÖS eğrisi üretilmiştir. Birincisi tüm üreme olan noktaları eğri altında bırakan klasik TÖS eğrisi, devamlı çizgi ile gösterilmiştir ve bu eğri en az 4 log devre azalmayı işaret etmektedir. İkincisi ise sayılabilir mikro kolonilerin ürediklerini gösteren noktaların tam üzerinden yani bu noktalar eğri ile

çakışıyor ve/veya biraz altta biraz üstte kalıyorlar. Klasik TÖS eğrisi çiziminde olmayan bu yaklaşım bu çalışmada ortaya konmuştur. İki eğriden elde edilen TÖS 58°C değerlerine ait varyans analiz tabloları ve incelendiğinde 3 log devre azalmayı temsil eden kesikli TÖS eğrisinden elde edilen TÖS 58°C değerlerinin deneme verilerini daha iyi temsil ettiği görülmüştür.

Klasik TÖS eğrisi çizimine eklenmiş bezer bir kavram gölge TÖS eğrisidir (Çoksöyler, 2013). Gölge TÖS eğrisi 1 log devre azalmayı temsil eder. Eğer inaktivasyon çalışması TÖS değerleri elde edilerek değil de canlı kalma eğrileri üzerinden D- değerleri elde edilerek yapılmış ise, yarı logaritmik kağıda önce gölge TÖS eğrisi çizilir ve asıl TÖS eğrisi kaç logaritmik devre azalmayı temsil ediyorsa ona paralel ve o kadar azalmayı temsil edecek şekilde yukarıdan çizilir. Bu çalışmada da aynı mantık ile sayılabilir değerler üzerinden geçirilen bir çeşit gölge TÖS eğrisi bize asıl TÖS eğrisinden sadece 1 log devre daha düşük düzeyde azalmayı gösterecektir. Bu yaklaşımın başarısı tamamen buna yönelik daha detaylı çalışmalar ile pekiştirilmelidir. Bu çalışmada inaktivasyon ortamına ilave edilen tuzun etkisi hem TÖS değerlerini artırıcı, hem de z-değerini artırıcı yönde olmuştur. Çeşitli kaynaklarda tuzun mikroorganizmayı ısıl işleme karşı koruyucu da olabileceği, hassaslığını artırıcı da olabileceği belirtilmektedir(Cole ve ark., 1993).

Bu çalışmada pH'nın TÖS değerleri üzerine etkisi önemli bulunmuştur. pH düştükçe TÖS değerleri azalmaktadır. Farklı olarak pH'nın z-değeri üzerine etkisi, istatistiki olarak önemlilik sınırının altında olmamakla birlikte ($p=0.109$), genel beklentiden farklıdır. Genel olarak TÖS değerlerinde olduğu gibi, pH düştükçe sıcaklığa olan duyarlılığın artması ve TÖS değerlerinin bir logaritmik devre azalması için gereken sıcaklık farkının azalmasıdır. Ancak bu çalışmada tam tersi bir eğilim istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Çoksöyler, N., 2013. *Mikrobiyal İnaktivasyon Kinetiği Modelleri*. Gıda Mikrobiyolojisi 4.Baskı. Editör: Erkmen, O.(s.361-384)
- Çoksöyler, N., Avşaroğlu, M.D., 2013. *Isıl İşlemlerle Gıdanın Korunması*. Gıda Mikrobiyolojisi 4.Baskı. Editör: Erkmen, O. (s.207-222)
- Ekici, M., Aytaç, Z., Akan, H., Pınar, M., (2008). A new species of Astragalus L. (section Onobrychoidei DC.: Fabaceae) **Turkey. Bot. J. of the Lin. Soc., 157:(741-747).**
- Gayán, E., Mañas, P., Álvarez, I., Condón, S., 2013. Mechanism of the synergistic inactivation of Escherichia coli by UV-C Light at Mild Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **79** (14) p. 4465–4473
- Gayán, E., Serrano, M. J., Raso, J., Álvarez, I., Condón, S., 2012. Inactivation of *Salmonella enterica* by UV-C light alone and in combination with mild temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Dec; 78(23): 8353–8361.
- Halkman, A.K., Noveir, M.R., Doğan, H.B. (2001). *Escherichia coli O157:H7 Serotipi. Ankara Basılmamış 54s.*
- Halkman, A.K., Noveir, M.R., Doğan, H.B. (1998). *Çeşitli Hayvansal Gıda Ürünlerinde E. coli O157:H7 Aranması. Tübitak-Vhag-1192 Nolu Proje. Ankara Basılmamış 75 s.*
- Juneja, V.K., Bari, M.L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., Friedman, M., 2009. Thermal destruction of Escherichia coli O157:H7 in Sous-Vide cooked ground beef as affected by tea leaf and apple skin powders. *Journal of Food Protection*, **72** (4): 860–865.
- Lee, S.Y., Kang, D.H., 2009. Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating Escherichia coli O157:H7 in laboratory media. *Food Control*, **20**: 1006–1012.
- McQuestin, O.J., Shadbolt, C.T., Ross, T. 2009, Quantification of the relative effects of Temperature, pH, and Water Activity on Inactivation of Escherichia coli in Fermented Meat by Meta-Analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. 2009, p. 6963–6972

- Montville, T. J., Matthews, K. R., 2008. *Food Microbiology: An Introduction*, Second Edition. ASM Press, Washington DC. ISBN 987-1-55581-396-3
- Sorenson, S., 1994, pH-dependent processing of yeast procarboxypeptidase Y by proteinase A in vivo and in vitro, *Eur J Biochem* **220**(1):19-27
- Stringer, S. C., George, S.M., Peck, M.W. 2000. Thermal inactivation of Escherichia coli 0157:H7. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **88**, 798-898

ÖZ GEÇMİŞ

25 Nisan 1986 tarihinde Malatya ili Akçadağ ilçesinde dünyaya geldi. İlk, orta ve lise eğitimini Malatya'da tamamladı. 2006 yılında Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandı. 2010 yılında lisans eğitimini tamamladı. Bir sene kadar özel sektörde çalıştıktan sonra 2013 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında Gıda Mühendisi olarak çalışmaya başladı. 2013 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 21/12/2016

Tez Başlığı / Konusu:

Escherichia coli'nin Termal Ölüm Süresi (TÖS), D- ve z-Değerlerinin Ortama Eklenen Asetik Asit ve Tuz Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Belirlenmesi

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 88 sayfalık kısmına ilişkin, 21/12/2016 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 (üç) tür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Uğur KALAÇ

Öğrenci No: 139101022

Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Programı: Tezli Yüksek Lisans

Statüsü: Y. Lisans

Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Prof. Dr. F. Nafiz ÇOKSÖYLER

(Unvan, Ad Soyad, İmza)
İmza)

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad,