

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEYVE VE SEBZE SULARINDA *Alicyclobacillus* spp'nin
BELİRLENMESİ VE GELİŞMESİNİN ENGELLENMESİNDE
FARKLI YÖNTEMLERİN DENENMESİ**

İsmihan Sedef GÖKSU

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2012**

© 2012 [İsmihan Sedef GÖKSU]

TEZ ONAYI

İsmihan Sedef GÖKSU tarafından hazırlanan "Meyve ve Sebze Sularında Alicyclobacillus spp.'nin Belirlenmesi ve Gelişmesinin Engellenmesinde Farklı Yöntemlerinin Denenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Yrd.Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç.Dr. Fatma YILDIRIM
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Alper KUŞÇU
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Cengiz KAYACAN



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

İsmihan Sedef GÖKSU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. <i>Alicyclobacillus</i> 'un Tarihi ve Tür Sınıflandırması	4
2.2. <i>Alicyclobacillus</i> 'un Genel Özellikleri	5
2.3. <i>Alicyclobacillus</i> Türleri ve Özellikleri	7
2.3.1. Meyve ve sebze sularının bozulmasında rol oynayan başlıca türler.....	12
2.3.1.1. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	12
2.3.1.2. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	16
2.4. <i>Alicyclobacillus</i> 'un Bulaşı Kaynakları ve Patojenitesi	17
2.5. Çalışmada Kullanılan Koruyucu Katkı Maddeleri ve Enzimler	19
2.5.1. Lizozim	19
2.5.2. Ficin	20
2.5.3. Kırmızı pancar suyu.....	21
2.5.4. Sodyum benzoat.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. İzolasyon Kaynakları.....	23
3.2. Referans Kültürler	23
3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	23
3.4. Çalışmada Kullanılan Meyve ve Sebze Suları	24
3.5. Koruyucu Katkı Maddeleri, Enzimler ve Pancar Suyu	24
3.6. Yöntem	25
3.6.1. Doğadan <i>Alicyclobacillus spp.</i> elde edilmesi	25
3.6.2. Elde edilen mikroorganizmaların test edilmesi	26
3.6.3. Referans kültürlerin gelişimlerinin gözlenmesi.....	26
3.6.4. Deneme gruplarının oluşturulması ve depolama	27
3.6.5. İstatistiksel analizler	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	29
4.1. <i>Alicyclobacillus</i> Türlerinin Meyve Bahçesi Topraklarında Varlığının ve Meyvelere Geçişinin Belirlenmesi	29
4.2. Meyve Bahçesi Topraklarından İzole Edilen Mikroorganizmaların <i>Alicyclobacillus</i> Olduğunun Test Edilmesi	30
4.3. Referans Kültürlerin Gelişimlerinin Belirlenmesi	31
4.4. Depolama ve Depolama Sonrası Sonuçlar	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	52

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEYVE VE SEBZE SULARINDA *Alicyclobacillus* spp.'nin BELİRLENMESİ VE GELİŞMESİNİN ENGELLENMESİNDE FARKLI YÖNTEMLERİN DENENMESİ

İsmihan Sedef GÖKSU

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN

Alicyclobacillus spp. meyve suyu sanayinde önemli ölçüde sorunlara yol açmakta olan bir bakteridir. Termoasidofilik, gram pozitif ve sporlu olan *Alicyclobacillus* türlerine ait sporlar standart pastörizasyon işleminde canlı kalabilmektedir. Canlı kalan sporlar çimlenerek meyve suyunun tat ve kokusunu bozabilecek guaiacol (metil kateşol), 2,6-dibromofenol, 2,6- diklorofenol gibi bileşikler üretmektedir.

Bu çalışmada, öncelikle doğadan *Alicyclobacillus* türleri çeşitli kaynaklardan izole edilerek saflaştırılmıştır. Sonrasında referans kültürler üzerinde sodyum benzoat gibi ticari bileşikler, lizozim, ficin enzimleri ve kırmızı pancar suyu gibi doğal yapıda bulunan bileşikler kullanılarak meyve sularında *Alicyclobacillus* spp.'nin gelişmesinin engellenmesine çalışılmıştır.

Alicyclobacillus türlerinin bulunabileceği toprak, çeşitli meyve suları ve çeşitli meyve yüzeylerinden örnekler alınmış ve bunlarda *Alicyclobacillus* türleri aranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli izolatlar bulunmuş ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlara *Alicyclobacillus* türlerine ait ayırt edici özellikleri belirleyebilen bazı testler yapılmış ve bu izolatların *Alicyclobacillus* türlerine ait olup olmadığı belirlenmiştir. Sonrasında yapılan meyve suyu denemeleri referans kültürler kullanılarak (*Alicyclobacillus acidoterrestris* ve *Alicyclobacillus acidocaldarius*) gerçekleştirilmiştir. Sıvı ortamda geliştirilen bu kültürlerle ısı işlem uygulanmış ve sporlanması sağlanan kültürlerden örnekler alınarak petrilere ekim yapılmıştır. Sonrasında alınan örnekler, çalışmada kullanılan depolama sıcaklığı olan 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda *Alicyclobacillus acidocaldarius* türünün depolama sıcaklıklarında zayıf gelişme göstermesinden dolayı çalışmada yalnızca *Alicyclobacillus acidoterrestris* türü kullanılmıştır.

Depolama süresi sonunda, özellikle lizozim enziminin *A. acidoterrestris* gelişimini tamamen engellediği görülmüştür. İki farklı dozda uygulanan ficin enzimi de bakterinin gelişimini önemli ölçüde engellemiştir. Kırmızı pancar suyu enzim grubu kadar etki göstermese de, sebze suyunda gelişimin engellenmesinde alternatif olarak önerilmektedir. Sodyum benzoat'ın ise kullanılan dozlarda herhangi bir etkinliğe sahip olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Alicylobacillus spp.*, sodyum benzoat, lizozim, ficin, kırmızı pancar suyu.

2012, 52 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF *Alicyclobacillus* spp. IN FRUIT AND VEGETABLE JUICE AND USE DIFFERENT METHODS FOR PREVENTION OF THE DEVELOPMENT

İsmihan Sedef GÖKSU

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

Alicyclobacillus spp. is a bacterial species which can cause important problems in fruit juice industry. *Alicyclobacillus* spp. is the gram positive, thermoacidophilic and a spore forming bacteria which can survive by sporulation during the standard pasteurization procedure. Alive spores germinations and to produce taint and smell spoiling compound which are guaiacol (methly catechol), 2,6-dibromophenol, 2,6-dichlorophenol.

In this study isolation and purification of *Alicyclobacilli* from various sources was the primary intention. After that the prevention of reference cultures in fruit juices by using chemical preservative sodium benzoate, enzymes like lysozyme and ficin, and a natural product red beet juice was used.

Determination of *Alicyclobacilli* from natural sources like soil, various kinds of fruit juice and surface of the several fruits was also studied. As a result of the studies various isolates were found and purified. After purification step some determinative tests were applied for the identification of the isolates. After primary trials reference cultures (*Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius*) were tested in fruit juices. In order to implement sporulation, the liquid cultures were heat treated. Enumerations were done in petri dishes. Afterwards, the samples used in this study were incubated in storage temperature of 30 °C. Due to poor development of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in storage temperatures *Alicyclobacillus acidoterrestris* was used in storage experiments.

At the end of the storage period, particularly lysozyme enzyme completely blocked the growth of *A. acidoterrestris*. Two different doses of ficin are significantly inhibited the growth of bacteria. Red beet juice did not affect like enzymes, vegetable juice is recommended as an alternative for the prevention of the development. Sodium benzoate did not have any activity at doses which were used.

Keywords: *Alicyclobacillus* spp., sodium benzoate, lysozyme, ficin, red beet juice.

2012, 52 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca benden desteğini esirgemeyen ve lisansüstü kariyerime devam etme olanağı sunan, tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve tamamlanmasında her zaman yardımcı olan sayın danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN' a,

Tecrübe ve bilgisini esirgemeyen her konuda yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Sami ÖZÇELİK'e

Yüksek Lisansım süresince derslerini aldığım ve bana tezim sırasında destek olan Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki hocalarıma, Tezimin gerçekleşmesi için 2732-YL-11 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, Her zaman benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen sevgili aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İsmihan Sedef GÖKSU
ISPARTA, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Guaicol, 2,6-dibromophenol ve 2,6- dichlorophenol bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 4.1. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ' un 30 ve 45 °C' de gelişimleri	33
Şekil 4.2. Elma sularının depolama süresi (90 gün) sonundaki görüntüleri	36
Şekil 4.3. Portakal sularının depolama süresi (90 gün) sonundaki görüntüleri	37
Şekil 4.4. Sebze sularının depolama süresi (90 gün) sonundaki görüntüleri	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Alicyclobacillus</i> türleri ve bazı özellikleri	8
Çizelge 3.1. Eklenen kimyasalar ve dozları	28
Çizelge 4.1. Toprak örneklerinden elde edilen mikroorganizmalar.....	29
Çizelge 4.2. Elde edilen izolatlara uygulanan bazı testler	30
Çizelge 4.3. İzolatlara uygulanan sıcaklık denemeleri.....	31
Çizelge 4.4. Isıl işlem uygulanan suşların 30 °C’ de sayım sonuçları (kob/ml)	32
Çizelge 4.5. Meyve sularının depolama süresi (90 gün) sonrası özellikleri	34
Çizelge 4.6. Elma suyunda depolama süresince (90 gün) farklı uygulamalara ait mikroorganizma sayım sonuçları (log kob/ml).....	39
Çizelge 4.7. Portakal suyunda depolama süresince (90 gün) farklı uygulamalara ait mikroorganizma sayım sonuçları (log kob/ml).....	41
Çizelge 4.8. Sebze suyunda depolama süresince (90 gün) farklı uygulamalara ait mikroorganizma sayım sonuçları (log kob/ml).....	42
Çizelge 4.9. Uygulamaların ürün arasında günler bazındaki gelişim farklılıkları	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrad derece
cfu	Colony-forming unit
D değeri	Desimal azalma süresi
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
g	Gram
IU	International units
kob	Koloni oluşturan birim
ml	Mililitre
PCR	Polymerase chain reaction
ppb	Parts per billion
RNA	Ribonükleik asit
UHT	Ultra high temperature
Z değeri	Isıl işlemde D değerinde 1 logaritma birimi değişiklik için sıcaklıkta ne kadar değişme olması gerektiğini gösteren değer.
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Meyve sularındaki mikrobiyolojik bozulmaların büyük çoğunluğu mayaların, küflerin, laktik asit bakterilerinin ve sporlu bakterilerin gelişmesi sonucu olmaktadır. Yüksek asitliğe sahip meyve suları mikrobiyolojik bozulmalara karşı pastörize edilerek korunabilmektedirler. Pastörizasyon işlemi ile özellikle ısıya duyarlı vejetatif formdaki mikroorganizmaların inaktivasyonu sağlanabilmekte ancak bakteri sporları hayatta kalabilmektedirler. Bozulmalara yol açan pek çok bakteri sporu canlı kalmakla birlikte meyve suyunun asidik pH değerlerinde gelişmemektedir. Ancak *Bacillus coagulans* ve *Clostridium pasteurianum* gibi bazı sporlu bakteriler 3.8 pH değerinde gelişebilmekte ve meyve suyunda bozulmalara neden olabilmektedir (Acar ve Temiz 2000).

Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, termoasidofilik (aside ve sıcaklığa dayanıklı) karakterdeki bazı sporlu bakterilerin de meyve sularında bozulmaya neden olduğunu göstermiştir. Asidik ürünlerdeki bu yeni bozulma olayı ilk olarak 1984'te Almanya'da tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda bozulmadan sorumlu mikroorganizmanın *Alicyclobacillus acidoterrestris* olduğu belirlenmiştir (Silva ve Gibbs, 2001). Sıcaklık dayanımı üzerine yapılan çalışmalarda, normal pastörizasyon işleminde bu bakteriye ait sporların canlı kalabildiği ortaya çıkmıştır (Vieira vd., 2002). Asidofilik karakterlerinden dolayı canlı kalabilen bu endosporlar çimlendikleri zaman meyve suyunda tat ve aromayı bozucu bileşikler üretebilmektedirler (Göçmen vd., 2005).

Alicyclobacillus cinsi bakterilerin yol açtığı en dikkat çekici sorun Avrupa'da çok sıcak geçen 1994 ve 1995 yaz aylarında meyve sularında meydana gelen çok sayıdaki bozulmalar ve bunların yarattığı ciddi ekonomik kayıplar ile olmuştur. Bu tarihten sonra termoasidofilik özellikteki bu bakteriler ile ilgili araştırmalar artmış ve bu bakteriler bozulmuş ve bozulmamış meyve sularından da izole edilmiştir. Son yıllarda bozulma olayları artmış ve buzlu çay gibi farklı ürünlerde de sorunlara yol açabildiği görülmüştür (Walker ve Phillips, 2005).

Alicyclobacillus cinsine ait türler hem meyve üreticileri hem de meyve suyu endüstrisi açısından büyük önem kazanmış ve pastörizasyon standartları ayarlanırken, hedef mikroorganizmanın *Alicyclobacillus* olması gerektiği önerilmiştir (Silva vd., 1999; Vieira vd., 2002).

Meyve suyu üretim tesislerindeki kalite kontrol birimlerinin kontrol etmesi gereken en önemli iki husustan bir tanesi ürünlerin mikrobiyolojik güvenliğini garantiye almak, diğeri ise ürünün diğ kalite özelliklerinin ölçüm ve kontrolünün yapılmasıdır. Meyve suyundaki kaliteyi garanti altına almak genellikle hijyen kurallarına önem vermeyi ve olası bulaşları önlemeyi gerektirmektedir (Harichandparsad, 2007).

Meyve suları, genel gıda tüketimi içerisinde ve özellikle de diyet ürünler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Giderek artan biçimde rekabetçi ve dinamik olan meyve suyu sektörü üreticilere, müşterilerin güvenlik taleplerini karşılayacak yüksek kalitede meyve suyu üretimini zorunlu kılmaktadır. Terim olarak kalite; ürünün müşterilerin o ürün ile ilgili olarak taleplerini karşılayacak bütün özelliklere sahip olmasıdır. Bu özellikler genellikle algılanabilen özellikler olup görünüm ve renk başta olmak üzere bunu aroma, sonrasında kıvam, doku ve koku takip etmektedir (Harichandparsad, 2007).

Meyve sularında ısıt işlem ile birlikte yapay antibakteriyel katkı maddelerinin kullanılması, *Alicyclobacillus acidoterrestris* sporlarının engellenmesi bakımından 1990'lerden sonra dikkate alınan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak günümüzde, dünya genelinde doğal ürünlere yönelik eğilimden dolayı yapay katkılara olan tercih azalmakta, doğal koruma yöntemleri ile üretilmiş ürünlere olan talep artmaktadır. Bundan dolayı uçucu yağlar, bakteriyosinler ve bazı diğ doğal diğ bileşikler (lisozim vb.) *Alicyclobacillus* sporlarının çimlenmesinin engellenmesinde veya kontrolünde umut verici yöntemler olarak görülmektedir (Bevilacqua vd., 2008).

Bu çalışmada, ilk olarak hedeflenen konu *Alicyclobacillus* türlerinin topraktan meyveye geçtiğinin ispatlanması ve bölgemiz topraklarında var olup olmadığının tespit edilmesidir. Bu amaçla bölgemizde en çok elma yetiştiriciliği yapılan Eğirdir

Bölgesi’nde yer alan meyve bahçeleri topraklarından örnekler alınmış ve *Alicyclobacillus* türleri aranmıştır. Sonrasında ise *Alicyclobacillus* spor ve hücrelerinin sodyum benzoat gibi yaygın ancak yapay bir katkı maddesiyle ve lizozim, ficin ve kırmızı pancar suyu gibi geleneksel olmayan doğal enzim ve bileşiklerle gelişmesinin engellenmesi amaçlanmıştır. *Alicyclobacillus* türlerinin bulunabileceği toprak, çeşitli meyve suları ve çeşitli meyve yüzeylerinden örnekler alınmış ve bunlarda *Alicyclobacillus* türleri aranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli izolatlar bulunmuş ve saflaştırılmıştır. Sıvı besi ortamda geliştirilen *Alicyclobacillus acidoterrestris* örnekleri ısıtılma tabi tutularak sporlanması sağlandıktan sonra çalışmada kullanılan bileşiklerle (sodyum benzoat, ficin, lizozim, kırmızı pancar suyu) beraber 2 meyve ve 1 adet sebze suyuna ekilmiştir. 3 aylık depolama sonrasında kullanılan bileşiklerin etkisinin belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Çalışmada amaçlanan; kullanılan doğal bileşiklerin *Alicyclobacillus acidoterrestris* sporları üzerindeki etkilerinin saptanması ve meyve suyu endüstrisine tüketicilerin daha fazla tercih edebilecekleri doğal bileşiklerin katkı olarak kazandırılmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Alicyclobacillus*'un Tarihi ve Tür Sınıflandırması

İlk olarak bazı araştırmacılar Japonya'daki Tohoku sıcak su kaynaklarından termoasidofilik yapıda olan bazı mikroorganizmalar izole etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonrasında izole edilen bu mikroorganizmaların *Bacillus* cinsine ait olduğunu tanımlamışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda termofilik oldukları bilinen iki türden *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda izole edilen bu mikroorganizmalar *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus*'tan endospor şekillerinin farklı olduğunu ve onlardan daha asidofilik karakterde oldukları belirlenmiştir. Geçici olarak morfolojisine ve kültürel karakterizasyonuna dayanarak bu mikroorganizmaların *B. coagulans*'ın yeni bir alt türü olduğuna karar verilmiştir (Smit vd., 2010).

Amerika Yellowstone Milli Parkı, Miami Volcano Milli Parkı ve İtalya Piciarelli asidik termal su kaynaklarından ile toprağından alınan örneklerinden de benzer özelliklere sahip bazı mikroorganizmalar izole edilmiştir. Ancak izole edilen bu mikroorganizmaların optimum pH değerleri ve DNA dizilerinin daha önce elde edilen izolat olan *B. coagulans*'dan farklı bir tür olabileceği ihtimali ortaya koyulmuştur. Sonrasında yapılan araştırmalarda hücre zarındaki yağ tabakasında ω -sikloheksan yağ asidinin ana bileşen olduğu belirlenmiş ve bu mikroorganizmalar *B. acidocaldarius* adı altında yeni bir tür olarak belirlenmiştir (Smit vd.,2010; Harichandparsad, 2007).

Yapılan bir çalışmada *B. acidocaldarius* ve farklı ortamlardaki topraklardan izole edilen bazı termofilik yapıda olan mikroorganizmaların akrabalık derecelerini araştırılmıştır. Bu mikroorganizmaların *B. acidocaldarius* ile benzer özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur ancak tam olarak ilişkileri belirlenememiştir. Sonrasında yapılan çalışmalara dayanarak bu mikroorganizmalardan bir tanesinin yeni bir tür olduğu bulunmuş ve *B. acidoterrestris* olarak sınıflandırılmıştır (Smit vd., 2010). Sonrasında yapılan bir araştırmada *B. acidocaldarius* ve *B. acidoterrestris*'ten farklı üçüncü bir termofilik *Bacillus* tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmanın diğerlerinden farkı hücre zarında ω - cycloheptane yağ asidine sahip olmasıdır. Sonrasında bu

mikroorganizma *B. cycloheptanicus* olarak sınıflandırılmıştır (Deinhard vd., 1987). 16S ribozomal RNA' da karşılaştırmalı dizi analizi mevcut üç termofilik *Bacillus* türünün diğer *Bacillus* türlerinden farklı olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgulara dayanarak bu benzersiz bakteriler yeni bir cinsin ortaya çıkmasına yol açmıştır ve bu cins *Alicyclobacillus* olarak adlandırılmıştır (Smit vd., 2010).

Günümüzde *Alicyclobacillus* cinsi bakteriler, topraktan, bozulmuş meyve sularından ve çeşitli ekstrem ortamlardan izole edilmiş 19 farklı gram pozitif spor oluşturan türü içermektedir (Smit vd., 2010). Yapılan bir çalışma sonucunda *A. aeris* adlı yeni bir tür daha eklenmiştir (Guo vd., 2009). Bu türlerden biri olan *A. pomorum* hücre zarında ω - alicyclic yağ asiti içermemektedir. Bundan dolayı *Alicyclobacillus* türünün genel tanımlamasında bir karışıklığa yol açmıştır ancak yapılan analizler sonrası bu tür içinde değerlendirilmiştir (Goto vd., 2003).

2.2. *Alicyclobacillus*'un Genel Özellikleri

Alicyclobacillus cinsine ait türler; termoasidofilik, yuvarlak şekilli, endospor oluşturan bakterilerdir. *Alicyclobacillus* türleri *A. sendalensis* hariç gram pozitiflerdir. İstisnai olarak *A. sendalensis* gram negatiftir. Bazı türlerin olgun kültürleri ise değişkenlik gösterebilmektedir (Smit vd., 2010). *Alicyclobacillus* türlerinin çoğu hareketli olmakla beraber bazı türler (*Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmannii*, *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus sendaiensis*, *Alicyclobacillus tolerans*, *Alicyclobacillus disulfidooxidans*, *Alicyclobacillus fastidiosus* ve *Alicyclobacillus ferrooxydans*) hareketsizdir. Bütün *Alicyclobacillus* türleri, istisna türler hariç aerobik yapıdadır, *A. pohlia* türü bazen fakültatif anaerobik olabilmektedir (Imperio vd., 2008).

Gelişme sıcaklığı bütün türlerde istisna türler hariç 20- 70 °C arasındadır. Yapılan bir araştırmada üç türün (*Alicyclobacillus disulfidooxidans*, *Alicyclobacillus tolerans* ve *Alicyclobacillus ferrooxydans*) 20 °C'nin altında gelişebildiği saptanmıştır (Smit vd., 2010). Bu türlerin optimum gelişme sıcaklığı ise 35-65 °C arasında değişmektedir (Imperio vd., 2008).

Alicyclobacillus türleri genel olarak asidik ortamda yaşayan mikroorganizmalardır. Gelişme pH aralığı 2.0-6.5 arasındadır. *Alicyclobacillus disulfidooxidans* ve *Alicyclobacillus tolerans* türlerinin 1.5 pH değerinin altında gelişebildiği belirlenmiştir (Smit vd., 2010).

Alicyclobacillus cinsine ait türlerde bulunan ω - alisiklik yağ asitleri sadece ω - sikloheksan yağ asidi ile sınırlı değildir, aynı zamanda ω - sikloheptan yağ asidi de bulunmaktadır (Smit vd., 2010). Bugün bilinen *Alicyclobacillus* türlerinden birçoğu hücre zarlarında ağırlıklı olarak ω - sikloheksan yağ asidine sahiptir. Bu türlerden farklı olarak 4 tür (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus herbarius*, *Alicyclobacillus kakegawensis* ve *Alicyclobacillus shizuokensis*) ise hücre zarlarının yapısında ω - sikloheptan yağ asidine sahiptirler. İstisnai olarak, *Alicyclobacillus pomorum*, *Bacillus* türlerinin hücre zarında bulunan yağ asidinin yapısına sahiptir ve hücre zarının yapısında ω - alisiklik yağ asitleri bulunmamaktadır. Buna rağmen yapılan genetik analizler sonucunda bu tür *Alicyclobacillus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır (Goto vd., 2003).

Bütün *Alicyclobacillus* cinsinin hücre zarı yapısında bulunan ω - alisiklik yağ asitlerinin, bakterinin yaşamsal faaliyetleri açısından fonksiyonu tartışmalara neden olmuş ve bu konuda bazı araştırmalar yapılmıştır. Bazı araştırmacılar elde ettikleri bulgulara dayanarak; ω - alisiklik yağ asidinin bu mikroorganizmaların ısıya karşı dayanıklılığına ve ekstrem ortamlarda yaşayabilmelerine olanak sağlayan termoasidofilik yapısına katkı sağladığını savunmaktadır (Smit vd., 2010).

Alicyclobacillus sporlarının ısıya karşı olan direncinin yapısında bulunan yağ asitleri dışında bazı stabil ısıya dayanıklı protein ve enzimlerden de kaynaklanabilmektedir. Yapısında bulunan dipicolinic asit (DPA) özellikle iki değerlikli mineralere sahip kalsiyum dipicolinate (Ca-DPA) kompleksi sayesinde sporların ısısal direncinin arttığı belirtilmektedir (Steyn vd., 2011).

Ayrıca hücre yaşının, hücre sayısının, protoplast dehidrasyonunun ve sporlanma sıcaklığının da ısı direncini etkileyebileceği belirtilmektedir (Steyn vd., 2011).

2.3. *Alicyclobacillus* Türleri ve Özellikleri

Bugüne kadar termal su kaynakları, asidik sular, çeşitli topraklar ve bozulmuş veya bozulmamış meyve sularından izole edilip tanımlanan *Alicyclobacillus* cinsine ait 21 türün bazı kültürel, biyokimyasal, morfolojik ve koloni özellikleri çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *Alicyclobacillus* türleri ve bazı özellikleri

Alicyclobacillus türleri	İzole edildiği kaynak	Optimum pH değeri	Optimum gelişme sıcaklığı °C	Oksijen isteği	Gram türü	Hücre şekli	Koloni şekli	Koloni rengi	Kaynaklar
<i>Alicyclobacillus acidophilus</i>	Asidik içecekler	3.0	50	Aerobik	+	Yuvarlak	Yuvarlak,düzgün	Krem rengi, opak	Matsubara vd., 2002
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	Asidik termal sular	3.5-4.0	53-65	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel yassı veya tümsek,düzgün düzensiz kenar boşluklu	Renksiz, krem sarı	Wisotzkey vd., 1992; Smit vd., 2010
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Toprak, elma suyu	4.5-5.0	36-53	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Yuvarlak	Krem, sarımsı beyaz, opak	Wisotzkey vd., 1992; Smit vd., 2010
<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	Fuji şehri ekin alanı	4.0-4.5	50-55	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel	Renksiz, opak	Goto vd., 2007
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	Toprak	3.5-4.5	48	Aerobik	+	Yuvarlak	Yuvarlak, küçük, düzgün	Krem beyaz, opak	Wisotzkey vd., 1992; Smit vd., 2010

Çizelge 2.1. *Alicyclobacillus* türleri ve bazı özellikleri (Devam)

Alicyclobacillus türleri	İzole edildiği kaynak	Optimum pH değeri	Optimum gelişme sıcaklığı °C	Oksijen isteği	Gram türü	Hücre şekli	Koloni şekli	Koloni rengi	Kaynaklar
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	Atık su çamuru	1.5-2.5	35	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	-	-	Karavaiko vd., 2005
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	Elma suyu	4.0-4.5	40-45	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel, yası	Renksiz, opak	Goto vd., 2007
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	Solfatarik yopraklar	3.0	28	Aerobik	+	Yuvarlak/ Kok	Küçük nokta halinde dairesel	Renksiz	Jiang vd., 2008
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	Bitki çayı	4.5-5.0	55-60	Aerobik	+	Yuvarlak	Dairesel	Renksiz	Goto vd., 2002
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	Sao Miguel solfatarik toprakları, Azorlar	3.5-4.0	50-53	Aerobik	+	Yuvarlak	-	Renksiz	Albuquerque vd., 2000
<i>Alicyclobacillus kakegawensis</i>	Kakagawa şehri ekin alanı toprakları	4.0-4.5	50-55	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel, tam, yası	Renksiz, opak	Goto vd., 2007

Çizelge 2.1. *Alicyclobacillus* türleri ve bazı özellikleri (Devam)

Alicyclobacillus türleri	İzole edildiği kaynak	Optimum pH değeri	Optimum gelişme sıcaklığı °C	Oksijen isteği	Gram türü	Hücre şekli	Koloni şekli	Koloni rengi	Kaynaklar
<i>Alicyclobacillus macrosporangiidus</i>	Fujieda şehri ekin alanı toprakları	4.0-4.5	50-55	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel, tam, tümsek	Renksiz, opak	Goto vd., 2007
<i>Alicyclobacillus pohliae</i>	Melbourne dağlarındaki jeotermal topraklar, Antartika	5.5	55	Aerobik, fakültatif anaerob	+	Yuvarlak	Tam, tümsek	Krem rekli	Imperio vd., 2008
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	Karışık meyve suyu	4.0-4.5	45-50	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel	Renksiz	Goto vd., 2003
<i>Alicyclobacillus sacchari</i>	Likit şeker	4.0-4.5	45-50	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel tam	Renksiz, opak	Goto vd., 2007
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	Japonya toprakları	5.5	55	Aerobik	-	Yuvarlak	Dairesel, tümsek	Beyaz ve yarı saydam	Tsuruoka vd., 2003; Li vd., 2012; Smit vd., 2010
<i>Alicyclobacillus aeris</i>	Bakır madeni (Çin)	3.5	30	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel, tümsek	Kremsi beyaz	Guo vd 2009

Çizelge 2.1. *Alicyclobacillus* türleri ve bazı özellikleri (Devam)

Alicyclobacillus türleri	İzole edildiği kaynak	Optimum pH değeri	Optimum gelişme sıcaklığı °C	Oksijen isteği	Gram türü	Hücre şekli	Koloni şekli	Koloni rengi	Kaynaklar
<i>Alicyclobacillus shizuokensis</i>	Shizuoka şehri ekin alanı toprakları	4.0-4.5	45-50	Aerobik	+, değişken	Yuvarlak	Dairesel, tam, tümsek	Renksiz, opak	Goto vd., 2007
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Oksitlenmiş kurşun-çinko cevheri	2.5-2.7	37-42	Aerobik	+	Yuvarlak			Karavaiko vd., 2005
<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	Jeotermal havuz, Coso sıcak su kaynakları, Kaliforniya	4.0	55	Aerobik	+	Yuvarlak	Tümsek	Yarı saydam ile beyaz arası	Simbahan vd., 2004

2.3.1. Meyve ve sebze sularının bozulmasında rol oynayan başlıca türler

2.3.1.1. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Alicyclobacillus acidoterrestris, meyve sularında yaygın olarak bulunması ve bulunduğu gıdalarda yüksek oranda bozucu potansiyele sahip olmasından dolayı gıda mikrobiyolojisinde önemli bir yere sahiptir (Walker ve Philips, 2005). Bugüne kadar meydana gelen meyve suyu bozulma olaylarından çoğunlukla *Alicyclobacillus acidoterrestris* sorumlu tutulmuştur. Çeşitli topraklardan ve elma suyundan izole edilen yuvarlak şekilli, gram pozitif ve aerobik bir bakteridir. Vejetatif hücrelerinin uzunluğu 2.9-4.5 µm, genişliği ise 0.6-0.8 µm arasında değişmektedir. Sporlar terminal veya subterminal olarak yerleşim göstermekle beraber gelişimleri genellikle hızlı olmaktadır, 24 saatte sıvı, katı besin ortamlarında ve meyve suyu ortamında gelişme gösterebilmektedir (Harichandparsad, 2007). Gelişme sıcaklık aralığı 20-60 °C olup optimum gelişme sıcaklığı ise 42-53 °C arasındadır. *A. acidoterrestris* 2.5-6.0 pH değerleri arasında gelişebilmektedir ve optimum gelişim gösterdiği pH değeri 3.5-5.0 arasındadır. Bu bakteri türünün hücre zarının özel yapısının, yüksek sıcaklığa dayanımına katkı sağladığı gibi düşük pH değerlerinde de gelişmesine olanak sağladığı belirtilmektedir (Jensen, 1999). Yapılan çalışmalar *A. acidoterrestris* sporlarının 86-96 °C’ de 2 dakikalık pastörizasyon işleminde canlı kalabildiklerini göstermiştir (Harichandparsad, 2007; Steyn vd., 2011).

Toprak kökenli bir mikroorganizma olan *A. acidoterrestris*’ in meyve suyuna bulaşı kaynakları konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada hasat edilip üretim tesisine gelene kadar toprak üzerinde bekleyen ve bu temas sonrasında kontamine olan meyvelerin, üretim aşamasında yetersiz yıkanmasından kaynaklanan bulaşlar tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların meyvede oluşan yarı, çatlak ve yüzeydeki kesiklere yapıştığı ve bu kontaminasyonun yıkama ile ortadan kaldırılmasının çok zor olduğu belirtilmektedir (Harichandparsad, 2007). Bunun genellikle meyveler üzerinde bulunan doğal kütin tabakasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Kütin tabakası meyve yüzeyini hidrofobik hale getirmekte, yarı ve çatlaklardaki vejetatif hücre ve sporlara koruma sağlamaktadır. Yapılan diğer bir çalışmada, *A. acidoterrestris* meyve suyu üretiminde kullanılan sudan da izole edildiği belirtilmiştir. Kontaminasyon kaynağı her zaman toprak, meyve yüzeyi,

Üretim suyu veya yıkama suyu olmayabilir, istisnai olarak yeraltı suyunda meydana gelen bulaşılar da olabilmektedir (Harichandporsad, 2007).

A. acidoterrestris'in meyve sularında yol açtığı bozulmalar meyve suyunda oluşan kötü tat ve koku olarak kendisini göstermektedir. *A. acidoterrestris* sporlarının çimlenerek gelişmesi 5 gün kadar sürmekle beraber bu süre meyve suyunda aroma bozukluğunun ortaya çıkması için yeterli olmaktadır. Organizmanın gelişmesi sırasında gaz üretmemesi ve buna bağılı olarak ambalajlarda bombaj oluşturmaması nedenleriyle meyve sularında gözle görünür bozulmaların tespit edilmesi zordur (Karagözlü, 2004).

Depolanan meyve sularında *A. acidoterrestris*'in neden olduğı bozulmaların belirlenmesinde; depolama sıcaklık etkilerinin, meyve suyu ambalajlarında kalan tepe boşluğunun ve çalkalamanın etkisinin bozulma üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 35°C'de depolanan meyve sularında tepe boşluğunun *A. acidoterrestris* 'in vejetatif hücrelerinin ve sporlarının gelişmesinde önemli bir etkiye sahip olduğı bulunmuştur (Walker ve Phillips, 2005).

Pettipher vd. (1997) yaptıkları çalışmada 44 °C'de 24 saat süresince depolanan portakal suyunda 10⁶ koloni/ml düzeyinde *A. acidoterrestris* sporlarını tespit etmiş; ayrıca elma ve portakal suyundaki 10⁵-10⁶ koloni/ml sayısının duyuşal olarak bozukluğa neden olacak miktarda (ppb) guaiacol üretimi için yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Alicyclobacillus acidoterrestris'in ürettiğı bozulmadan sorumlu uçucu bileşiklerin saptanması amacıyla portakal suyunda yapılan bir çalışmada gaz kromatografisi kullanılarak kontamine olmuş ve olmamış örnekler kullanılarak bozulmayı erken tespit etmek amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda kullanılan örneklerdeki hem guaiacol hem de 2,6-dibomophenol oluşumu saptanabilmiştir (Bianchi vd., 2010).

Yapılan araştırmalar *Bacillus* cinsi bakterilere ait sporların düşük pH'larda ısıya karşı oldukça duyarlı olmalarına karşın *A. acidoterrestris* sporlarının ısıya karşı direncinin, pH'dan kısmen bağımsız olduğunu göstermiştir. Çeşitli meyve sularında *A.*

acidoterrestris sporlarının D değerlerinin 90°C’de 16-23 dakika, 95°C’de ise 2.4-2.8 dakika olarak belirlenmiştir (Smit vd., 2010).

Meyve suyu model sistemlerinde yapılan bazı araştırmalarda ise ısıya karşı gösterdiği dirençle ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu araştırmacılar bakterinin ısıya karşı direncinin çok daha fazla olduğunu belirtmişler ve yaklaşık 88-91°C sıcaklıklarda pH’nın ısı direnci oldukça etkilediğini bildirmişlerdir. pH değerindeki yaklaşık yarım derecelik artış aynı sıcaklıklardaki D değerlerinin ikiye katlanmasına neden olmuştur (Pontius vd., 1998). pH’sı 3.0 ve 4.0’e ayarlanmış greyfurt sularında yapılan denemelerde de pH değerinin azalmasıyla *A. acidoterrestris* sporlarının ısıya karşı daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Komitopoulou vd., 1999).

Farklı sıcaklık değerlerinin *A. acidoterrestris*’in ısısal direnci üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışmada; D- değerinin sıcaklık değişiminden etkilendiği ancak pH ve katı madde oranının *A. acidoterrestris*’in ısı dayanımı üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Ceviz vd., 2009). *Alicyclobacillus acidoterrestris* sporlarının termal inaktivasyon parametreleri üzerine yapılan bir çalışmada; askorbik asit ilave edilmiş ve edilmemiş elma suları ve elma farklı pH değerlerinde D ve Z değerleri belirlenmiştir. Sıcaklığın D-değerleri arasında en önemli faktör olduğu ve pH değerinden üç kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak askorbik asit varlığının *A. acidoterrestris* sporlarının sıcaklık direnci üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Bahçeci ve Acar, 2007).

Yapılan bir çalışmada portakal suyunda nisin enziminin *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 üzerindeki termal inhibisyon etkisine bakılmıştır. 0, 50, 75 ve 100 IU nisin/ ml meyve suyu konsantrasyonlarında ve 92, 95, 98, 102 sıcaklık derecelerinde çalışılmıştır. Sonuçlara göre nisin enziminin *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152’nin termal muamelesinde dayanıklılığın azaltılmasında alternatif olarak gösterilmektedir (Pena vd., 2010).

Ticari pastörize elma suyunda *Alicyclobacillus acidoterrestris* sporlarının seviyesini düşürmek amacıyla yüksek basınç ve sıcaklık kombinasyonunun kullanıldığı bir

Çalışmada elma suyundaki spor süspansiyonu makul yüksek basınç ve yüksek sıcaklıkta (45, 71 veya 90  C) başarıyla yok edilmiştir (Lee vd., 2002).

Isı direncinin engellenmesi üzerine yapılan çalışmalar dışında farklı yöntemler ve farklı katkılar kullanarak *A. acidoterrestris*'in vejetatif hücreleri veya endosporlarını engellenmeye çalışılmıştır. Örneğin; rneğin pek çok bakteri tarafından üretilen bakteriyosinler kullanılmıştır. *Lactococcus lactis spp.* tarafından üretilen nisin gram pozitif bakteriler üzerinde oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Nisinin *A. acidoterrestris* zerindeki etkisinin tre, meyve suyu çeşidine ve pH değerlerine bağlı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca nisinin *A. acidoterrestris*'in vejetatif hücrelerinde spora nazaran daha etkili olduğu bulunmuştur (Walker ve Phillips, 2008).

Alicyclobacillus acidoterrestris gelişmesinin kontrolünde öjenol ve cinnemaldehit kombinasyonu ile yapılan bir çalışmada bu iki bileşiğin bakterinin gelişiminin engellenmesinde etkili olduğu bulunmuştur. Çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanılarak cinnemaldehitin en etkili mikrobiyal olduğu diğer yandan janoln güçlendirici element olarak hareket etmekte olduğu bulunmuştur. Çalışmada elde edilen verilere göre bu dozlarda bileşiklerin beraber kullanımının spor çimlenmesinin engellenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Bevilacqua vd., 2010).

Alicyclobacillus acidoterrestris'in inaktivasyonu üzerine elma suyunda ultrasonik dalgalar kullanarak yapılan bir çalışmada hücrelerin inaktivasyonun uygulanan güç seviyesi ve süresinin etkili olduğu bulunmuştur (Yuan vd., 2009). şeker bileşimindeki değişiklikler; asitlik, bulanıklık ve meyve suyundaki esmerleşme ultrasonik muameleden sonra kaydedilmiştir ve meyve suyu kalitesinde olumsuz bir değişim görülmemiştir.

Gobbi vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. acidocaldarius* ve *A. acidoterrestris* ile inokule edilmiş şeftali, portakal ve elma sularında Metal Oksit Yarı iletken (Metal Oxide Semiconductor) sensör donanımlı bir elektronik burun uygulaması yapmışlardır. Genel olarak sistem tüm test meyve sularındaki *Alicyclobacillus spp.*'nin inokulasyonundan 24 saat sonra tespitini başarabilmiştir. Elektronik burun bakteriyel konsantrasyon 10² koloni/ml seviyesine ulaştığında tespit

edilebilmektedir ve *Alicyclobacillus* türlerinde bağımsız olarak kontaminasyonu sınıflandırabilmektedir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, portakal sularındaki uçucu profilin karakterizasyonunda kontamine olmuş ve olmamış örneklerde nicelik olarak farklılık belirlenebilmiştir.

Elma sularında yapılan bir başka çalışmada süperkritik karbondioksit (sıcaklık: 65,70 °C, basınç; 80, 100, 120 bar, zaman: 10-40dk) kullanılarak *Alicyclobacillus acidoterrestris* sporlarının inaktive olup olmadığına bakılmıştır. Sonuçlara göre; SC-CO₂ (süper kiritik karbondioksit) elma suyundaki *A. acidoterrestris* sporlarını etkili bir şekilde öldürmüş ve meyve suyunun kalitesinde bir değişiklik meydana gelmemiştir (Bae vd., 2009).

A. Acidoterrestris sporlarının engellenmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada ticari sapanin ve *Sapindus saponaria* meyvelerinden ekstakt olarak elde edilmiş sapanin ısıtılış işlemle beraber bakterinin inaktivasyonunda kullanılmıştır. Sonuç olarak *S. Saponaria* ekstratının *A. acidoterrestris*'in meyve suyundaki gelişiminin kontrolünde alternatif bir yol olabileceği bulunmuştur (Alberice vd., 2012).

Yüksek basınç uygulaması ticari meyve suyu üretiminde aroma, tat ve biyoaktif bileşenleri koruyarak raf ömrünü uzatmada kullanılan ısısal işleme alternatif yeni bir teknoloji olarak görülmektedir. Bu konu üzerine yapılan bir çalışmada; yüksek basınç uygulamasının, normalde uygulanan yüksek sıcaklık değerleri olmadan düşük sıcaklıklarda *A. acidoterrestris* sporlarının inaktivasyonunu sağlamakta olduğu ve ayrıca yüksek basınç uygulaması yapılan meyve sularının kalitesinin ve tazeliğinin korunduğu bulunmuştur (Silva vd., 2012).

2.3.1.2. *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Mutlak aerobik olan *Alicyclobacillus acidocaldarius* gram pozitif veya gram değişken bir bakteri olarak tanımlanmaktadır. Gelişme sıcaklığı 45-71 °C arasında olup optimum gelişme sıcaklığı ise 53-65 °C değerleri arasındadır. Optimum gelişme pH'sı 3.5-4.0 arasında olup 2.0-6.0 aralığında da gelişebilmektedir. Yuvarlak şekilli olmakla beraber hücre uzunluğu 1.5-3.0 µm genişliği ise 0.5-0.8 µm değerleri

arasında değişmektedir. Hareketlidir ve endosporları terminal ile subterminal olarak yerleşmektedir (Smit vd., 2010).

Tanımlanmasında hücre zarında bulunan ω - alisiklik yağ asitlerinin bulunması ve karbon kaynağı olarak nişastayı kullanabilmesi ayırt edici özelliklerindendir (Scheffel vd., 2004). *Alicyclobacillus acidocaldarius*'un birçok şeker türünü karbon enerji kaynağı olarak kullanabildiği kanıtlanmıştır. Bu şeker kaynakları; L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, mannitol, melibiyoz, selobiyoz, laktoz, maltoz, sükroz, trehaloz, tagatose ve polisakkarit olarak selüloz, nişasta, glikojen ve ksilan olarak belirtilmektedir (Lauro vd., 2006).

UHT mango suyu üzerinde *A. acidocaldarius* aranması üzerine PCR ve dizi analiz yöntemleri kullanılarak yapılan bir mango suyundan *A. acidocaldarius* izole edilmiş ve tanımlanmıştır. *A. acidocaldarius* gelişiminin engellenmesi amacıyla uygulanan düşük pH, pastörizasyon ve aseptik şartlarda depolama koşullarına rağmen *A. acidocaldarius*'un mango suyundaki gelişimini engellemede yeterli olmamıştır (Gouws vd., 2005).

Elma ve portakal suyu kullanılan çalışmada *Enterococcus faecalis* A-48-32 suşundan elde edilen enterosin AS-48 ile ilgili yapılan bir çalışmada, enterosin *Alicyclobacillus acidocaldarius* ve *Alicyclobacillus acidoterrestris* üzerinde test edilmiştir. *A. acidocaldarius*'un vejetatif hücreleri inaktive edilebilmiştir. Gözlenen meyve sularında 14 gün boyunca gelişme olmamıştır. Sonrasında meyve sularına enterosin ve vejetatif hücreler veya endosporlar eklenerek 90 gün inkübe edilmiştir. İnoküle edilerek inkübasyona bırakılmış elma, şeftali ve üzüm sularında ve 60 gün koruma sağlanmıştır. Bakteriyosin eklendikten 15 dk sonra meyve sularında hiçbir hücre tespit edilememiştir. Endosporlar ise enterosin ilavesinden çok kısa bir süre sonra (1 dk) inaktive olmuşlardır. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemede enterosin ilavesinden sonra hücrelerde hasar, endosporların yapısında ise lizise bağlı düzensizlik görülmüştür (Grande vd., 2005).

2.4. *Alicyclobacillus*'un Bulaşı Kaynakları ve Patojenitesi

Alicyclobacillus türlerinin başlıca izole edildiği yerlerden biri topraktır ve asidik ürünlerdeki kontaminasyonun en önemli kaynağının toprak olduğu düşünülmektedir

(Imperio vd., 2008). Meyve yere düştüğünde toprak meyveye yapışmakta ve çalışanlar tarafında üretim tesisine taşınabilmektedir.

Groenwald vd. (2008) Güney Amerika'daki elma ve şeftali bahçesi topraklarından *A. acidoterrestris* ve *A. acidocaldarius* izole etmişlerdir. Parish ve Goodrich (2005) portakal suyundaki *Alicyclobacillus* oluşumunu gözlemlemek için iki turunçgil işleme tesisi olan bir çevrede inceleme yapmışlardır ve *Alicyclobacillus* yaygın bulunmasına rağmen kontamine olmuş portakal örneklerinin % 30'unun yerden alınarak tesise getirilen portakallardan olmadığı belirlenmiştir.

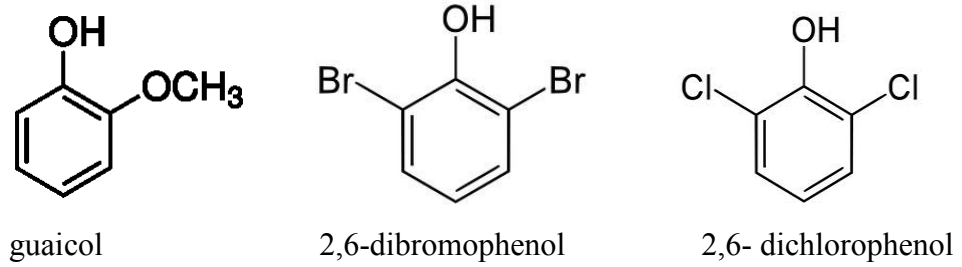
Suyun da kontaminasyonun önemli kaynaklarından olduğu tanımlanmıştır. *Alicyclobacillus*'un yıkanmış veya yıkanmamış meyvenin yüzeyinde bulunabileceği ve yoğunlaşma sırasında meyve konsantresinde bulunabileceği belirtilmiştir. Bir çalışmada elma suyu konsantre üretim tesisinde *Alicyclobacillus* türlerini; yıkama suyundan, destile sudan, elma suyundan ve elma konsantresinden izole etmişlerdir (Smit vd., 2010).

Alicyclobacillus türleri bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar grubuna girince patojeniteye olan ilgi de artmıştır. Bunun için de *A. acidoterrestris* ve *A. acidocaldarius*' un birkaç türünün patojenitesini saptamak için bir çalışma yapılmıştır. Farelere intraperitanel olarak Orange Serum Broth (OSB)'da geliştirilmiş hücre karışımı enjekte edilmiş ve bir hafta hastalık belirtileri gözlenlenmiştir. Guinea domuzları 5×10^6 cfu ml⁻¹ *A. acidoterrestris* elma suyu ile beslenerek bir hafta gözlenmiştir. Bu süre sonunda ne farelerde ne de domuzlarda hiçbir semptom, hastalık veya ölüm gözlenmemiş ve test edilen seviyelerde *Alicyclobacillus*' un patojenik olmadığına karar verilmiştir. *Alicyclobacillus*' un meyve suyu üretim endüstrisinde ekonomik tehdit doğurmasına rağmen insan sağlığını veya güvenliğini tehdit oluşturmamaktadır (Smit vd., 2010).

Bozulma olayları ilkbaharda veya yazın meydana gelmekle birlikte bozulma genellikle tat veya kokuda oluşmakta ve bazı ürünlerde renksizleşme ve bulanıklaşma meydana gelmektedir. *Alicyclobacillus*' un sebep olduğu tat ve koku bozukluğu genellikle guaiacol adlı ilaca benzeyen, dezenfektan benzeri, antiseptik, fenolik bir kimyasal olarak tanımlanmıştır. Guaiacol bozulmaya sebep olan başlıca

bileşik gibi görünse de, halofenol olan 2,6- dichlorophenol ve 2,6-dibromophenol' de bozulmalardan sorumlu görülmektedir (Smit vd., 2010).

Bozulma olaylarında dominant etkiye sahip olan guaiacol, kokuda meydana gelen bozulmada önemli bir etkiye sahiptir. Meyve suyunda is kokusuna benzer bir koku oluşturmaktadır. İs kokulu/fenolik yapısından dolayı bazı gıdalarda katkı maddesi olarak da kullanımına rastlanmaktadır. Örneğin; dondurmalarda, bazı közlenmiş gıdalarda, bazı yoğurt çeşitlerinde ve bazı şaraplarda katkı maddesi olarak guaiacol kullanılmaktadır. Ancak meyve sularında ve süt ürünlerinde guaiacol varlığı, mikrobiyal metabolizma ürünü olarak bulunduğundan bozulma bileşiği olarak adlandırılmaktadır. Guaiacol vanilik asitin nonoksidatif dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır (Merle ve Montville, 2012).



Şekil 2.1. Guaicol, 2,6-dibromophenol ve 2,6- dichlorophenol bileşiklerinin kimyasal yapısı

2.5. Çalışmada Kullanılan Koruyucu Katkı Maddeleri ve Enzimler

2.5.1. Lisozim

Bakteri hücre duvarında yer alan mureini parçalayan enzime lisozim enzimleri adı verilmektedir. Ticari lisozim tavuk yumurtasının beyazından elde edilmektedir. Bu enzime bazı kaynaklarda N-asetil muromidaz, mukopeptid glukohidraz adları da verilmektedir. Gram (+) bakterilerde hücre duvarında peptidoglikanlar Gram(-) bakterilere göre daha fazla açık olduğu için daha kolay bağlanmaktadır. Bu nedenle Gram (+) bakterilerde daha çok etkili olmaktadır. *Clostridium*, *Bacillus* ve *Monococcus* türlerinde ve *Listeria monocytogenese* de etkili olmaktadır. Yapılan deneylerde lisozim enzimi biyokoruyucu olarak kullanıldığında ısıya dirençli

Bacillus sporlarının ısı dirençlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Yumurtanın doğal bir bileşeni olduğu için toksikolojik açıdan bir tehlikesi yoktur (Anonim, 2012). Lizozim 4.0-7.0 pH değer aralığında aktivite göstermektedir (Chung ve Robert, 2000).

Lizozim enziminin *A.acidoterrestris* ve sporları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, 0.25–2.0 g/l düzeyinde kullanılan lizozim enziminin vejetatif hücrelerin inhibisyonunda lizozimin etkili olduğu ve ayrıca sporlarının lizozime vejetatif hücrelerden daha hassas olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada ortam koşullarının da lizozimin biyoaktivitesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda lizozimin *Alicyclobacillus* gelişimini önlemede kullanılabilecek bir bileşik olduğu belirtilmiştir (Bevilacqua vd., 2008).

A. acidoterrestris hücrelerine karşı lizozimin inhibitör etkisi, hücre duvarındaki peptidoglukan yapıda bulunan N-asetilglukozamin ve N-acetylmuramic asit arasındaki β 1-4 bağlarında gerçekleştirdiği hidroliz ile açıklanabilmektedir (Bevilacqua vd., 2008).

Yapılan bir başka çalışmada lizozimin bakteriler üzerindeki etkisinin iki şekilde olabileceğini savunulmaktadır. Birinci etki şekli, bakterinin hücre duvarını oluşturan bağların kopartılması ve bakteri bütünlüğünün bozulmasıdır. Savunulan ikinci etki ise lizozimin hücre duvarı yüzeyindeki bazı olası moleküllere bağlanarak hücrelerin bütünlüğünü bozmaksızın inhibe ettiği şeklindedir. Bu hipotez farklı bir araştırmacının yaptığı araştırmalar sonucunda da desteklenmektedir. Lizozimin anti bakteriyel etkisinin enzimin hücre duvarı bileşenleriyle etkileşimine de bağlı olduğu savunulmaktadır. (Bevilacqua vd., 2008).

2.5.2. Ficin

Ficin, 1800 farklı türü içinde barındıran *Moraceae* bitki ailesine ait incir (*Ficus*) cinsi ağacının özütünden elde edilen endoproteolitik aktivite gösteren bir enzim olarak tanımlanmaktadır. Farklı incir türlerinden elde edilen ficin enzimlerinin farklı karakteristik özellikler gösterdiği belirlenmiştir. En kapsamlı olarak çalışılan ficinler, *Ficus glabrata* ve *Ficus carica* türlerinden elde edilenlerdir (Devaraj vd., 2008).

Ficin, ilk olarak 1938 yılında izole edilmiştir. Sülfihidril yapısı içeren enzimler grubu olarak bilinen enzimlerden olmasına karşın stabilitesi bu grubun diğer üyelerinden daha kuvvetli bir enzim olarak tanımlanmıştır. Enzimatik aktivitesinde esansiyel rol oynayan sistein içermektedir (Englund vd., 1968).

Ficin, ilaçlarda ve çeşitli endüstrilerde özel bir önem taşımaktadır. Çünkü geniş bir sıcaklık ve pH değer aralığı (4.0-7.0) boyunca aktivite gösterebilmektedir (Huang vd., 2008).

Ficin, karboksimetiselüloz dolgu maddesi içeren kromatografik kolonlarda farklı tuz konantrasyonu ile fraksiyone edilerek izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında birkaç aktif bileşik bulunmuş ancak bunlardan sadece bir tanesi sınıflandırılabilmiştir (Englund vd., 1968).

2.5.3. Kırmızı pancar suyu

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris var. cruenta*), toz veya sıvı olarak kullanılan bir renk hammaddesidir. Kırmızı pancar rengi aslında karamel, melanin, melanoidin içeren bileşiklerin karışımından meydana gelmiş olup, şeker kristalleri yüzeyinde dağılmıştır. Kırmızı-menekşe rengi ise daha çok betaninden kaynaklanmaktadır. Bu bileşik, endüstriyel pigment olarak kullanılmaktadır. Birçok gıdada pancar ekstratı olarak kullanım, renk gücü ve saflık açısından toz forma tercih edilmektedir. Betanin pH, ışık ve sıcaklığa hassastır ve 3-7 pH aralığında rengin stabil olduğu belirtilmiştir. Pancar ekstratı, % 0.3-1.0 betanin taşıyabilmektedir ve genellikle antioksidanla korunmaktadır. Yaygın kullanım miktarı; %0.2-1.0 olup, yoğurt, dondurma, şekerleme, puding, tatlı vb. ürünlerde kullanılmaktadır. Sıvı veya toz ticari ürünlerde renklendirme gücünün farklı olabileceği belirtilmektedir. Kırmızı pancar ekstratının soğukta veya dondurularak depolanması gerekmektedir (Özcan ve Akgül, 1995).

2.5.4. Sodyum benzoat

Gıda koruyucusu olarak kullanılan sodyum benzoat, benzenkarboksilik asit sodyum tuzu ve Fenilkarboksilik asit sodyum tuzu olarak da adlandırılmaktadır. Molekül ağırlığı 144,11 g/mol olup, kimyasal formülü $C_7H_5NaO_2$ şeklindedir. Sodyum

benzoat E211 kodu ile gıda katkı kimyasalları arasında yer almaktadır. Beyaz renkli, hemen hemen kokusuz, kristal toz ya da granüller şeklindedir. Antimikrobiyel koruyucu olarak kullanılmaktadır. Suda kolay çözünmekle birlikte etanolde ise eser miktarda çözünmektedir (FAO, 2012).

Na-benzoat'ın düşük pH'larda daha yüksek aktivite göstermesinden dolayı asidik pH ortamlarında yaşayan *A. acidoterrestris*'e karşı koruyucu olarak kullanımı önerilmiştir. Ancak sodyum benzoatın inhibitör etkisi doza bağlı olduğundan kullanım sınırları içerisinde spor canlılığını etkilemediği görülmüştür (Bevilacqua vd., 2008).

Sodyum benzoat düşük düzeyde kontamine olmuş meyve sularında *Alicyclobacillus* türlerinin gelişimini engellemede başarılı olmuştur. Ancak bakteri yoğunluğu fazla olduğu zaman etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Walker ve Phillips, 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. İzolasyon Kaynakları

Çalışmanın ilk aşaması olan *Alicyclobacillus* türlerinin doğadan izole edilmesi amacıyla çeşitli materyallerden örnekler alınmıştır. Öncelikli olarak meyve sularında bozulma yaptığı için piyasadan satın alınan elma, portakal ve domates sularından izolasyonların yapılmasına çalışılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda meyvelerin yüzeyinde olabileceği bilgisine dayanılarak elma, portakal, nar gibi çeşitli meyvelerden de izolasyon amacıyla örnekler alınmıştır. Son olarak *Alicyclobacillus*' un en önemli bulaşma kaynağı olarak belirtilen topraktan çeşitli örnekler alınmıştır. Toprak örnekleri, Isparta İli, Eğirdir ilçesinden çeşitli meyve bahçelerinden meyve ağaçlarının altından, yol kenarından ve su kuyusu kenarından alınmıştır.

3.2. Referans Kültürler

Bu çalışmada meyve suyunda en çok sorun yaratan ve genellikle üzerinde çalışılan iki tür olan *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906 ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510 suşları kullanılmıştır. *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Belgian-Coordinated Collection of Microorganism BCCM-LMG) Belçika Gent Üniversitesi'nden, *Alicyclobacillus acidocaldarius* (United States Department of Agriculture NRRL ARS Culture Collection) Amerika Birleşik Devletlerinden temin edilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmanın ilk aşamasında APDA (Asitlendirilmiş patates dekstrozu agar, pH'sı % 10'luk tartarik asit çözeltisi ile pH 3.5'e ayarlanmış patates infüzyonu 4 g/l, glukoz 20 g/l, agar 15 g/l) besiyeri kullanılmıştır. İzolatlardaki gelişmenin yeterli olmadığı gözlemlendiğinden dolayı bu besiyeri değiştirilerek ikinci aşamada KM (Maya ekstraktı 2.5 g/l, peptone 5 g/l, glukoz 1 g/l, tween 80 1g/l, agar 15g/l, %10' luk malik asit çözeltisi 15 ml/l) besiyeri kullanılmıştır. Katı KM besiyerinde iyi gelişme gösteren izolatlar sıvı KM besiyerinde aynı başarıyı gösterememiştir ve bu nedenle çalışmanın

geri kalan kısmında BAT agar (maya ekstraktı 2 g/l, glukoz 5 g/l, CaCl₂ 0.25 g/l, MgSO₄ 0.5 g/l, amonyum sülfat 0.2 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, çinkosülfat 0.00018 g/l, CuSO₄ 0.00016 g/l, MnSO₄ 0.00015 g/l, CoCl₂ 0.0018 g/l, borik asit 0.0001 g/l, Na-Molibdat 0.003 g/l, agar 18 g/l, 1N H₂SO₄ çözeltisinden 1.7 ml/l) besiyeri kullanılmıştır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Meyve ve Sebze Suları

Bu çalışmada piyasadan hazır olarak temin edilen %100 ve katkısız meyve ve sebze suları kullanılmıştır.

Sebze suyu içindekiler: Su, sebze püre ve konsantreleri (domates, havuç, biber, pancar, salatalık, kereviz, siyah havuç, limon, lahana, soğan, marul), tuz, sirke, baharak karışımı, doğal aromalar, bitkisel sıvı yağ, fesleğen ekstratı. Elma suyu içindekiler: Su, elma suyu konsantresi (meyve suyu miktarı %100), asitliği düzenleyici (askorbik asit). Portakal suyu içindekiler: Su, portakal suyu konsantresi (meyve suyu miktarı %100), doğal portakal aroması, vitamin C, antioksidan (askorbik asit).

3.5. Koruyucu Katkı Maddeleri, Enzimler ve Pancar Suyu

Bu çalışmada *Alicyclobacillus* bakterisinin meyve sularındaki aktivitesini önlemek amacıyla lizozim ve ficin olmak üzere iki farklı enzim ile gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan koruyuculardan sodyum benzoat ve doğal bir ürün olan kırmızı pancar suyu kullanılmıştır.

Lizozim, Ficin enzimleri ile Na-Benzozat hazır halde ticari firmalardan (Merck, Almanya) satın alınmıştır. Kırmızı pancarlar iyi bir şekilde yıkandıktan sonra kabukları soyularak rendelenmiş, sonrasında sıkılarak suyu çıkarılmıştır. Sonrasında elde edilen pancar suyu otoklavlanabilen kapaklı şişeye alınarak 121 °C’ de 15 dk sterilize edilmiştir.

3.6. Yöntem

Bu çalışmada ilk aşama doğadan mikroorganizmaların elde edilmesi işlemidir. Çeşitli mataryellerden alınan örneklerin APDA (asidik patates dekstroza agar) ve KM besi ortamlarına ekimleri yapılmıştır. 45 °C’ de 5-7 gün inkübasyona bırakılarak gelişme olup olmadığı gözlenmiştir. Örnek alma işlemi şu şekilde yapılmıştır; meyveler bütün halde yıkanmaksızın sıvı KM ortamına daldırılmış ve çalkalanmıştır. Sonrasında besiyeri sıvısından alınan örnekler KM katı besiyerine ekilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda herhangi bir gelişme görülmemiştir. Alınan toprak örnekleri cam şişelere koyulup üzerine steril saf su eklenerek belirli bir süre bekletilmiştir. Bekletilen toprak solüsyonundan alınan örnekler KM katı besi ortamına ve APDA ortamına ekilmiştir. Gerekli inkübasyon sıcaklığında gelişimleri gözlenen örneklerde inkübasyon süresi sonunda KM ortamında koloniler gözlenirken APDA ortamında gelişme gözlenmemiştir ve APDA ortamı sonraki ekimlerde kullanılmamıştır. KM ortamında gelişen koloniler iki farklı elma bahçesinden alınan toprak örnekleridir. Yapılan gözlemler sonucunda tanıma uyan mikroorganizmalar seçilerek saflaştırma işlemi yapılmıştır. Yapılan saflaştırma işleminden sonra 10 farklı izolat elde edilmiştir.

Gelişme gözlenen mikroorganizmalar saflaştırılarak, *Alicyclobacillus* türünden olup olmadığının belirlenmesi için çeşitli testler yapılmıştır. *A. acidoterrestris* LMG-16906 ve *A. caldarius* NRRL B-14510 suşlarının meyve suyuna ekimleri yapılarak gelişmesi takip edilmiştir. Sonrasında bu suşların ısıl işleminden geçirilip (80 °C’ de 12 dk) petrilere normal depolamada ulaşılabilecek bir sıcaklık olan 30 °C de inkübasyona bırakılarak gelişip gelişmedikleri gözlenmiştir. Son olarak gelişme gözlenen suş olan *A. acidoterrestris* LMG-16906 ve katkı maddelerinin meyve suyuna ilaveleri yapılarak 3 ay süre ile depolamaya bırakılmıştır.

3.6.1. Doğadan *Alicyclobacillus* spp. elde edilmesi

Alicyclobacillus türlerinin doğadan elde edilmesi amacıyla piyasadaki meyve sularından, meyvelerden ve topraktan örnekler alınmıştır. Öncelikli olarak meyve sularında bozulma yaptığı için piyasadaki hazır elma, portakal ve domates suları alınarak bunlardan APDA ve KM ortamlarına ekim yapılmıştır. Petriler 45 °C’ de 5-7

gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gözlemlenen petrilere herhangi bir gelişme görülmemiştir. Sonrasında meyvenin kendisinde olabileceği sonuçlarına dayanılarak; elma, portakal, nar gibi meyvelerden örnekler alınmıştır. Meyveler KM sıvı besi ortamına daldırılmıştır ve sonrasında KM sıvı besi ortamından alınan örnekler KM katı besi ortamına ekilmiştir. Petriler 45 °C’ de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır ve İnkübasyon süresi sonunda gözlenen petrilere herhangi bir gelişme görülmemiştir. Son olarak *Alicyclobacillus*’ un en önemli bulaşma kaynağı olan topraktan örnek alınmıştır. Alınan toprak örnekleri steril saf suda belirli bir süre bekletildikten sonra bunlardan alınan örnekler KM besiyerine ekilmiştir. Petriler 45 °C’ de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır ve gelişimleri gözlenmiştir.

3.6.2. Elde edilen mikroorganizmaların test edilmesi

İnkübasyon süresi sonunda gelişen mikroorganizmalardan *Alicyclobacillus* türlerinin koloni yapısına benzeyen koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Sonrasında gram boyama yapılarak hem hücre şekillerine hem de gram türüne bakılmıştır. *Alicyclobacillus* türleri katalaz pozitif olarak tanımlandığından dolayı elde edilen izolatlara katalaz testi yapılmıştır. Asidik koşullarda ve yüksek sıcaklıklarda gelişebildiklerinden dolayı asitliği ayarlanmış katı ve sıvı BAT besiyerlerine ekimleri yapılarak 30, 35, 45, 55, 60 °C’ de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak meyve sularına ekimleri yapılarak 45 °C’ de 5-14 gün inkübasyona bırakılarak bu sıcaklıklardaki gelişimleri gözlenmiştir.

3.6.3. Referans kültürlerin gelişimlerinin gözlenmesi

Belçika Gent Üniversitesinden alınan *A. acidoterrestris* LMG-16906’nın ve (United States Department of Agriculture NRRL ARS Culture Collection) Amerika’dan alınan *A.acidocaldarius* NRRL B-14510 suşlarının ekimi yapılarak 45 °C’ de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu suşların çalışmada kullanılacak olan elma, portakal ve sebze sularına ekimi yapılarak gelişimleri gözlenmiştir. Sıvı BAT besiyerinde geliştirilen bu iki suşa 80 °C’ de 12 dk ısıtma işlemi uygulanmıştır. Isıtma işlemi uygulanmasındaki amaç klasik pastörizasyon işlemi bu bakterilerin sporlanmasını sağlamak ve depolama sıcaklığında tekrar vejetatif hücre haline gelip gelmediklerini

belirlemektir. Sporlanması sağlanan bakterilerden örnek alınarak petrilere ekim yapılmıştır ve depolama sıcaklığı olan 30 °C’de 5-7 gün inkübasyona bırakılarak, gelişme gösteren petrilere sayım yapılmıştır.

3.6.4. Deneme gruplarının oluşturulması ve depolama

Deneme deseni oluşturulurken öncelikle kullanılacak olan katkı gruplarının miktarı belirlenmiştir. Bu miktarlar belirlenirken daha önce yapılan çalışmalar ve Gıda Kodeksi’de yer alan katkıların kullanıldığı limitler göz önüne alınmıştır. Daha önce *Alicyclobacillus* türlerinde denenmemiş olan ficin enzimi için iki doz belirlenmiştir. Sonuç olarak kontrol grubu da dahil olmak üzere 6 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Piyasadan temin edilen %100 ve katkısız elma, portakal ve sebze suları 100 ml ve 250 ml olacak şekilde kapaklı otoklavlanabilen şişelere doldurularak hazırlanmıştır. Hazırlanan şişeler 121 °C’de 15 dk sterilize edilerek içinde *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906 dışında yabancı bir mikroorganizmanın olmaması sağlanmıştır. Sıvı BAT ortamında 2-4 gün geliştirilen *A. acidoterrestris* LMG-16906’ya 80 °C’de 12 dk ısıtma işlemi uygulanmıştır. Böylece vegetatif formdaki bakterilerin inhibisyonu sağlanmıştır. Sadece sporların bırakıldığı süspansiyondan 100 ml’ lik şişelere 100 µl, 250 ml’ lik şişelere 250 µl örnek alınarak hazırlanan steril meyve sularına ekim yapılmıştır. Bir başka deyişle litreye 1 ml spor süspansiyonu konmuştur. Aynı zamanda başlangıçta koyulan bakteri sayısını belirlemek amacıyla meyve sularına eklenen bakteri solüsyonundan örnek alınarak BAT ortamında geliştirilmiştir. Sonrasında dozları belirlenen ficin, lizozim, sodyum benzoat ve kırmızı pancar suyu meyve sularına eklenmiştir. Kontrol grubuna hiçbir katkı maddesi eklenmemiştir. Steril koşullarda *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906 ve katkılar eklenerek hazırlanan şişeler 30 °C’de 3 ay süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İlk başta koyulan bakteri miktarını belirlemek amacıyla yapılan ekimlerin sonuçları kaydedilmiştir ve 15 günlük ve aylık sayımlar yapılarak gelişen koloni sayıları kaydedilmiştir.

Çizelge 3.1. Eklenen kimyasalar ve dozları

Elma suyu	Portakal suyu	Sebze suyu
Kırmızı pancar 10ml/100ml	Kırmızı pancar 10ml/100ml	Kırmızı pancar 25ml/250ml
Lisozim 0.25 g/100 ml	Lisozim 0.25 g/100 ml	Lisozim 0.625 g/250 ml
Sodyum benzoat 0.5 g/100 ml	Sodyum benzoat 0.5 g/100 ml	Sodyum benzoat 0.125 g/250 ml
Ficin 1,25 IU/100 ml	Ficin 1,25 IU/100 ml	Ficin 3,75 IU/250 ml
Ficin 2.5 IU/100 ml	Ficin 2.5 IU/100 ml	Ficin 7.5 IU/250 ml
Kontrol	Kontrol	Kontrol

3.6.5. İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen sonuçların karşılaştırılması Minitab® istatistik programında (Versiyon 15.0 Minitab, ABD) tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Yapılan varyans analizleri daha belirgin farklılıkların gösterilmesi açısından % 5 ($P \leq 0,05$) hassasiyetinde yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Alicyclobacillus* Türlerinin Meyve Bahçesi Topraklarında Varlığının ve Meyvelere Geçişinin Belirlenmesi

Meyve sularından, meyvelerden ve çeşitli topraklardan izole edilerek inkübasyona bırakılan örneklerden yalnızca 2 toprak örneğinde gelişme gözlenmiştir. Piyasadan temin edilen meyve sularından ve çeşitli meyvelerin yüzeylerinden alınan örneklerde ise herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Toprak örneklerinden alınan ve gelişme elde edilen petrilere bulunan *Alicyclobacillus* türlerine ait olduğu düşünülen koloniler seçilerek izole edilmiştir. Koloniler seçilirken *Alicyclobacillus* türlerinin koloni yapısının morfolojik özellikleri dikkate alınmıştır. *Alicyclobacillus* türlerinden bazıları yuvarlak (*A. acidophilus*, *A. acidoterrestris*), bazıları dairesel (*A. contaminans*, *A. herbarius*, *A. pomorum*, *A. sacchari*), bazıları da dairesel yassı veya tümsek (*A. fastidiosus*, *A. kakagawensis*, *A. macrosporangiidus*, *A. acidocaldarius*, *A. sandaiensis*, *A. shizuokensis*), koloni şekli göstermektedir (Smit vd., 2010). Koloni şeklinden sonra ikinci seçme kriterini koloni rengi oluşturmuştur. *Alicyclobacillus* türlerinin koloni renkleri bazılarında renksiz opak (*A. contaminans*, *A. fastidiosus*, *A. kakagawensis*, *A. macrosporangiidus*, *A. sacchari*, *A. shizuokensis*) bazıları da krem rengi (*A. acidiphilus*, *A. pohliae*), sarımsı beyaz (*A. acidoterrestris*), krem sarı (*A. acidocaldarius*), krem beyaz (*A. cycloheptanicus*) ve beyaz yarı saydam (*A. sandaiensis*) şeklindedir (Smit vd., 2010). Bu özelliklere göre seçilip izole edilen bu koloniler sonrasında saflaştırılarak birbirinden tamamen ayrılmıştır. Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra birbirinden farklı 10 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Toprak örneklerinden elde edilen mikroorganizmalar

Eğirdir Elma bahçesi 1	Eğirdir Elma bahçesi 2
S1	S2y
S1A	S2z
S1C	Ss
S1D	S6
S1E	Y

4.2. Meyve Bahçesi Topraklarından İzole Edilen Mikroorganizmaların *Alicyclobacillus* Olduğunun Test Edilmesi

Elde edilen mikroorganizmalar öncelikli olarak boyamaya tabi tutularak hücre şekillerine ve gram boyamalarına bakılmıştır. Sonrasında *Alicyclobacillus* türlerinin gelişmesine en uygun iki besi ortamında ve elma suyunda gelişme durumlarına bakılmıştır ve katalaz testi yapılmıştır. Son olarak *Alicyclobacillus* türlerinin gelişme sıcaklıklarının yüksek olmasından dolayı 30, 35, 45, 55, 60 °C’ de gelişimleri gözlenmiştir. Bu testlerin sonuçları Çizelge 4.2.’de ve Çizelge 4.3.’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Elde edilen izolatlar uygulanan bazı testler

Bakteri çeşidi	Hücre şekli	Gram durumu	K ortamında gelişimi	BAT ortamında gelişimi	Meyve suyunda(elma) gelişimi	Katalaz durumu
S1	Basil	+	+	+	+	+
S1A	Basil	+	+	+	+	+
S1C	Basil	+	+	+	+	+
S1D	Basil	+	+	+	+	+
S1E	Basil	+	+	+	+	+
S6	Basil	+	+	+	+	+
S2y	Basil	+	+	+	+	+
S2z	Basil	+	+	+	+	+
Ss	Basil	+	+	+	+	+
Y	Basil	+	+	+	+	+

Çizelge 4.2.’de çıkan sonuçlara göre elde edilen izolatlar *Alicyclobacillus* türlerinin genel özellikleri olan gram pozitif, aerobik ve basil olma durumuna benzer özellikler göstermektedir. Ayrıca *Alicyclobacillus* türlerine özel asidik besi ortamlarında ve en çok bozulma olaylarının yaşandığı elma sularında da gelişim gözlenmiştir (McKnight vd., 2010).

Çizelge 4.3. İzolatlara uygulanan sıcaklık denemeleri

Bakteri çeşidi	30 °C' de gelişme	35 °C' de gelişme	45 °C' de gelişme	55 °C' de gelişme	60 °C' de gelişme
S1	-	-	+	+	+
S1A	-	-	+	+	+
S1C	-	-	+	+	+
S1D	-	-	+	+	+
S1E	-	-	+	+	+
S6	-	-	zayıf	+	+
S2y	-	-	+	+	+
S2z	-	-	+	+	+
Ss	-	-	zayıf	+	+
Y	-	-	+	+	+

Alicyclobacillus türlerinin tanımlayıcı özelliklerinden olan termoasidofilik yapısını belirlemek için yapılan sıcaklık denemesinin sonuçlarında da (Çizelge 4.3.) görüldüğü gibi izolatlar termofilik bakterilerin gelişim gösterdiği 30-60 °C aralığında gelişim göstermişlerdir. Çıkan bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen izolatların *Alicyclobacillus* türlerine ait olduğu düşünülmektedir.

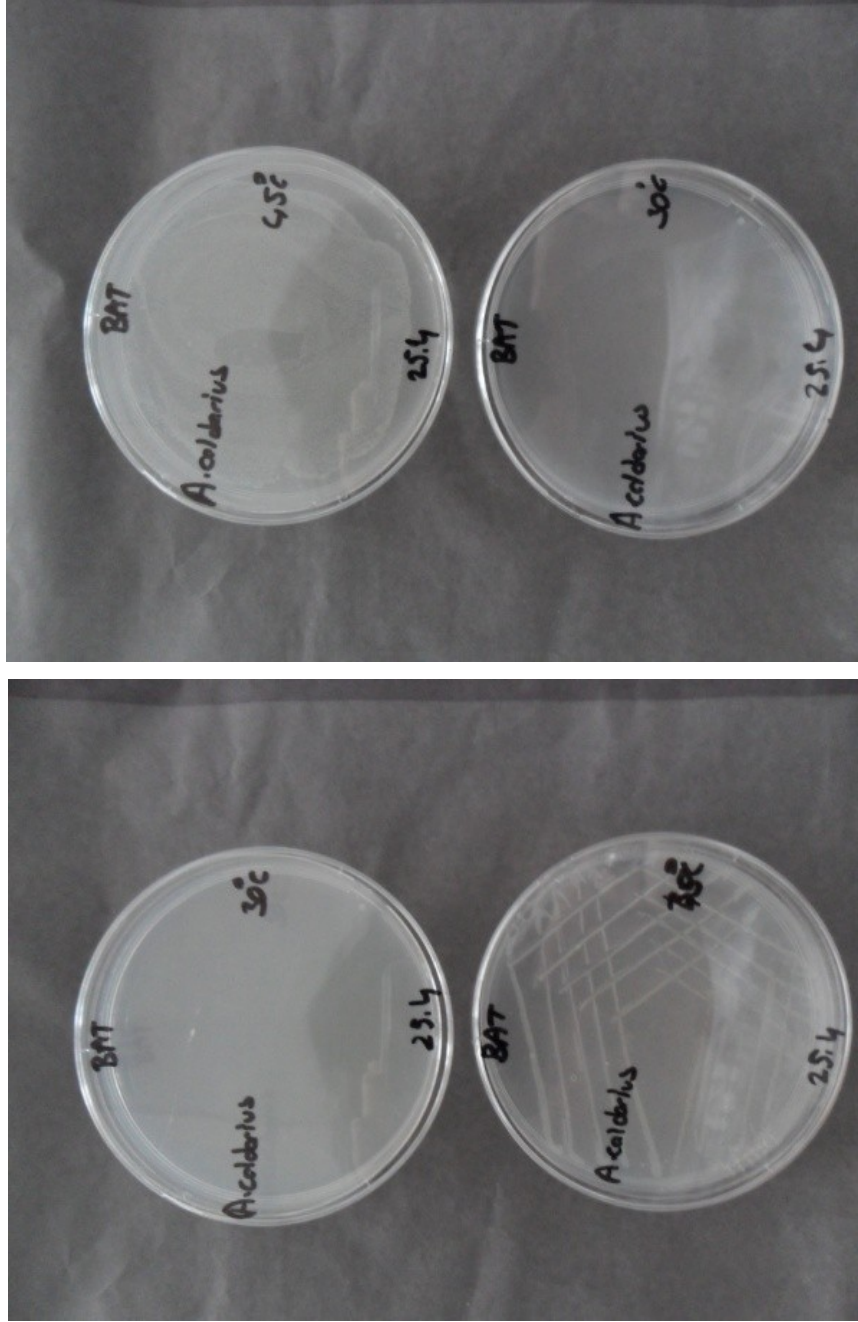
4.3. Referans Kültürlerin Gelişimlerinin Belirlenmesi

Ticari kültür koleksiyonlarından alınan *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906 ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510 suşları katı ve sıvı BAT ortamlarında geliştirilmiştir. Sıvı kültürde geliştirilen mikroorganizmalar 80 °C' de 12 dk ısıtma işlemine tabi tutularak sporlanması sağlanmıştır. Spor solüsyonlarından alınan örneklerin petrilere ekimi yapılarak çalışmada depolamada sıcaklığı olarak kullanılan 30 °C' de 5-7 gün inkübasyona bırakılarak gelişimleri gözlenmiştir. Yapılan sayımlar sonucunda *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906'nın bu sıcaklıkta iyi gelişim gösterdiği ancak *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510'un ise oldukça az gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Sayım sonuçları Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Isıl işlem uygulanan suşların 30 °C’ de sayım sonuçları (kob/ml)

	<i>A.acidoterrestris</i>	<i>A.acidocaldarius</i>
0	>300	>300
-1	>300	110
-2	>300	10
-3	66	0
-4	23	0

Sonuçların bu şekilde çıkması *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510’ nun gelişme sıcaklığının 45-71 °C arasında olmasından, *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906’nın ise gelişme sıcaklığının 20-70 °C olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510’nun çalışmada kullanılıp kullanılmayacağına karar vermek amacıyla bir sıcaklık denemesi daha yapılmıştır. 80 °C’ de 12 dk ısıl işleme tutulan *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510’ dan örnek alınarak petrilere ve sıvı kültürlerle ekimi yapılmıştır. 30 ve 45 °C’ de 5-7 gün inkübasyona bırakılan örneklerin gelişimleri gözlenmiştir. Yapılan sayım ve gözlemler sonucunda 30 °C’ de gelişimin çok zayıf olduğu, 45 °C’ de ise bütün kültürlerin geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *Alicyclobacillus acidocaldarius* 'un 30 ve 45 °C' de gelişimleri

Çıkan sonuçlar doğrultusunda *Alicyclobacillus acidocaldarius* NRRL B-14510'un çalışmada kullanılan depolama sıcaklığında gelişiminin çok zayıf olacağından dolayı denemelerde kullanılmamasına karar verilmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan depolama sıcaklığında iyi gelişme gösteren *Alicyclobacillus acidoterrestris* LMG-16906'nın kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4. Depolama ve Depolama Sonrası Sonuçlar

Deneme desenine uygun olarak hazırlanmış ve depolama sıcaklığı olan 30 °C’de depolanmış meyve sularında ilk gün, 15.gün, 30.gün, 60.gün ve 90.gün sayımları yapılmıştır. Çıkan sonuçlar kendi içlerinde karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.6., Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9.).

90 günlük depolama süresi sonucunda meyve sularında herhangi bir değişiklik olup olmadığını belirlemek amacıyla bazı özelliklerine bakılmıştır. Bunlar; renklerinde bozulma olup olmadığı, dibe çökme durumu ve pH değişimi gibi özellikler olmaktadır. Bulunan sonuçlar çizelge 4.5.’te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Meyve sularının depolama süresi (90 gün) sonrası özellikleri

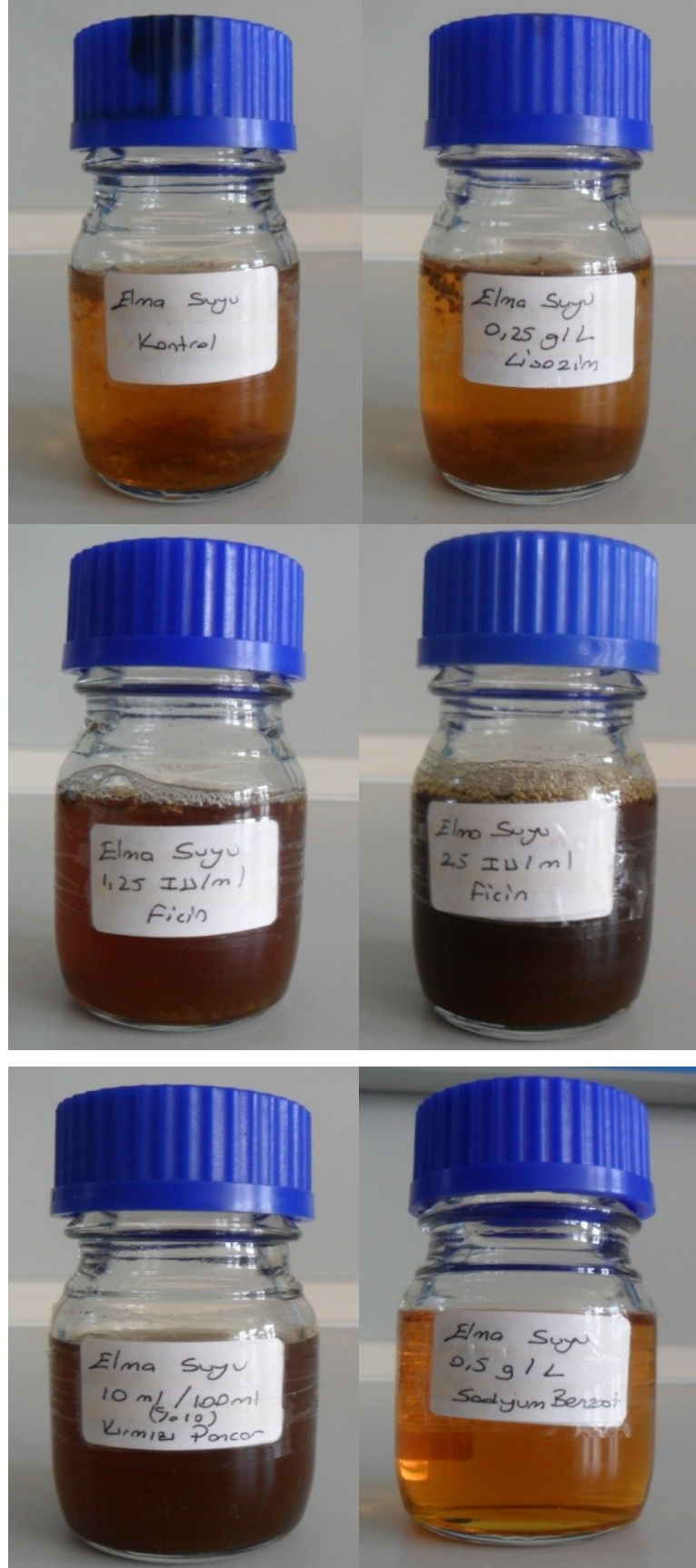
	Elma suyu			Portakal suyu			Sebze suyu		
	Renk değişimi	Çökme	pH	Renk değişimi	Çökme	pH	Renk değişimi	Çökme	pH
Kontrol	Yok	Yok	3.16	Yok	Var	3.30	Yok	Yok	4.19
Lisozim	Yok	Var	3.17	Koyu	Var	3.33	Koyu	Yok	4.18
Ficin 1.25 IU	Koyu	Var	3.24	Koyu	Var	3.41	Yok	Yok	4.21
Ficin 2.5 IU	koyu	Var	3,32	Koyu	Var	3.45	Yok	Yok	4.25
Kırmızı pancar	koyu	Var	3.31	Koyu	Var	3.44	Koyu	Yok	4.32
Sodyum benzoat	Yok	Yok	3.26	Koyu	Var	3.41	Koyu	Yok	4.21

Elma suyunda meydana gelen renk değişimi incelendiği zaman, lisozim ve sodyum benzoat eklenen elma sularında renkte değişim gözlenmezken diğer katkı gruplarında özellikle kırmızı pancar suyu eklenen elma sularında koyulaşma meydana gelmiştir. Elma suyunda renk ve berraklık önemli kriterler olmaktadır ve renkteki koyulaşma ürünün kabul edilebilirliğini etkileyebilmektedir. Meydana gelen çökme ise protolitik aktiviteler sonucunda enzimlerin proteinlerle birleşmesi sonucu çökme meydana getirdiği şeklinde açıklanabilmektedir. Piyasada satışa sunulan elma sularının ortalama pH değeri 4.0 civarındadır. Depolama sonrası gözlenen elma suyu

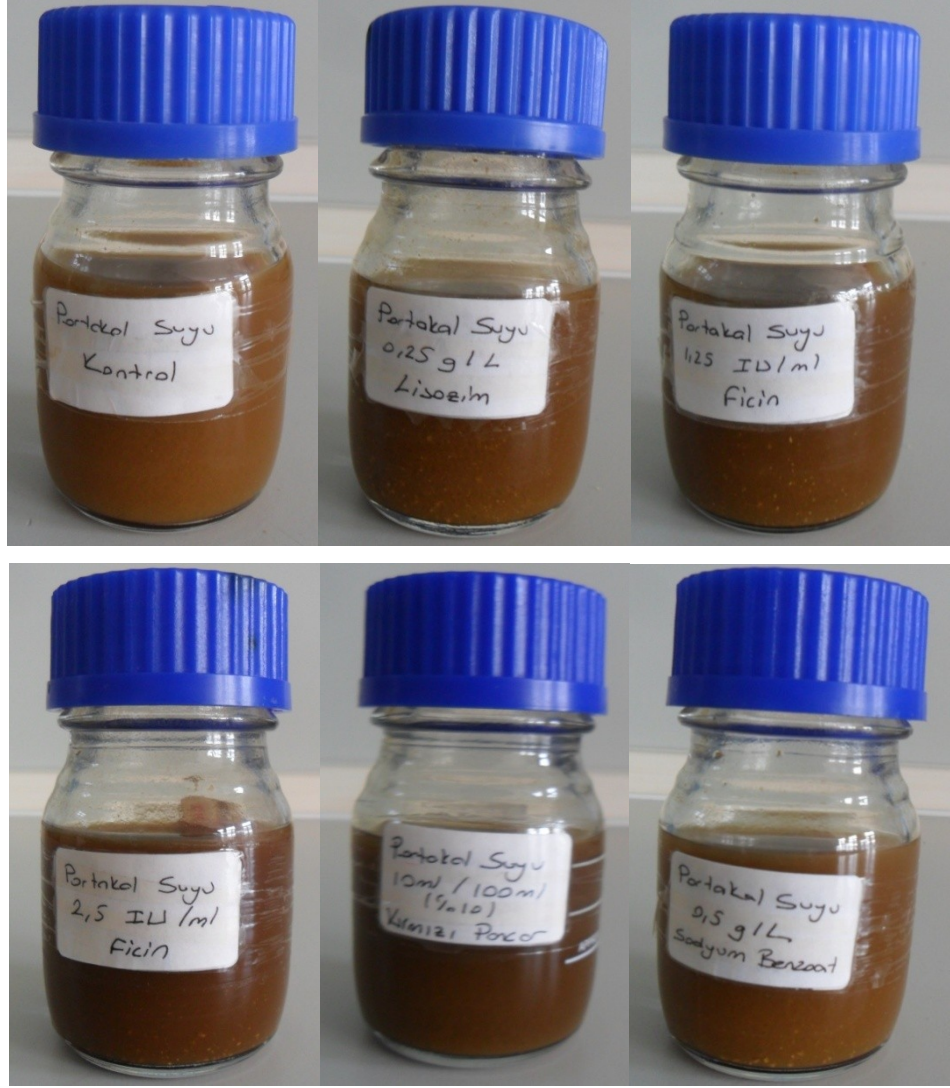
gruplarında gözlenen pH değeri de standart pH değerine yakın olmakla beraber kabul edilebilir seviyededir.

Portakal suyunda bütün katkı gruplarında renkte koyulaşma meydana gelmiştir. Özellikle kırmızı pancar suyunun kendine has rengi meyve suyuna geçmiştir. Bu nedenle kırmızı pancar suyu renkli ürünler için uygun olmaktadır. Elma ve portakal sularında ancak karışım meyve suları olarak veya kan portakalı suyunda kullanılabileceği düşünülmektedir. Oluşan çökme ise meyve suyunun yapısında bulunan pulpların dibe çökmesinden kaynaklanmaktadır. Piyasada satışa sunulan portakal sularının ortalama pH değeri 4.0 civarındadır. Depolama sonrası gözlenen portakal suyu gruplarında gözlenen pH değeri de standart pH değerine yakın olmakla beraber kabul edilebilir seviyededir.

Sebze suyunda ise renkte önemli bir koyulaşma gözlenmemiştir. Ayrıca içerisinde birçok kırmızı sebze grubunu barındırdığı için kırmızı pancar suyu eklenmesi renginde biraz koyuluğa yol açmıştır ancak ürünün kabul edilebilirliğini etkilemeyeceği düşünülmektedir. Piyasada satışa sunulan sebze sularının ortalama pH değeri 4.0-4.5 civarındadır. Depolama sonrası gözlenen sebze suyu gruplarında gözlenen pH değeri de standart pH değerine yakın olmakla beraber kabul edilebilir seviyededir.



Şekil 4.2. Elma sularının depolama süresi (90 gün) sonundaki görüntüleri



Şekil 4.3. Portakal sularının depolama süresi (90 gün) sonundaki görüntüleri



Şekil 4.4. Sebze sularının depolama süresi (90 gün) sonundaki görüntüleri

Çizelge 4.6. Elma suyunda depolama süresince (90 gün) farklı uygulamalara ait mikroorganizma sayım sonuçları (log kob/ml)

Uygulamalar	Elma Suyu kontrol	Elma Suyu lizozim	Elma Suyu ficin (1,25 IU)	Elma Suyu ficin (2,50 IU)	Elma Suyu Kırmızı Pancar	Elma Suyu Na-Benzoat
Günler						
0	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A
15	2,57±0,05 a,A	0 b,B	1,63±0,13 b,C	1,42±0,10 b,C	2,41±0,54 ab,A	2,63±0,17 a,A
30	2,56±0,10 b,A	0 b,B	1,74±0,24 b,A	1,16±0,28 b,C	2,43±0,62 bA	2,27±0,34 b,A
60	2,40±0,13 bc,A	0 b,B	1,73±0,05 b,C	1,10±0,17 b,D	2,51±0,07 b,A	2,58±0,19 a,A
90	2,17±0,12 c,AC	0 b,B	1,64±0,19 b,CD	1,20±0,17 b,DE	1,72±0,37 b,CE	2,32±0,13 a,A

a,b,c,d harfleri; uygulamaların günlere göre farklılıklarını;

A, B,C,D,E harfleri; uygulamaların birbirlerine göre farklılıklarını göstermektedir.

Çeşitli uygulamaların depolama süresince etkinlikleri belirlenmiştir. Çizelge 4.6 da görüldüğü üzere elma suyunda yapılan uygulamalar kendi aralarında kıyaslandığı zaman lizozimin *A. acidoterrestis* LMG-16906 gelişiminin engellenmesinde en etkili katkı maddesi olduğu bulunmuştur. Lizozimin günler arasındaki etkisi incelendiği zaman, 15. günden itibaren *A. acidoterrestis* LMG-16906 gelişimini tamamen engellediği görülmüştür. Lizozimin gram pozitif bakterilerde çok etkili olması (Düring vd., 1999) ve hücre duvarındaki peptidoglukan yapıda bulunan N-asetilglukozamin ve N-acetylmuramic asit arasındaki β 1-4 bağlantılarında gerçekleşen lizozim hidrolizi (Chung ve Hancock, 2000; Barbiroli vd., 2012) *A. acidoterrestis* LMG-16906 hücrelerine karşı lizozimin bu etkisini açıklayabilmektedir (Bevilacqua vd., 2008). Lizozimin hücre bütünlüğüne zarar vererek bakteri hücrelerine verdiği zarar ile birçok ürünün (peynir, inek sütü, bira, taze meyve ve sebze, et, balık ve şarap gibi) patojenik ve zararlı bakterilerden korunmasında etkili olmaktadır (Tribst vd., 2008). Aynı zamanda Avrupa’da nitratlara alternatif olarak gösterilmektedir (Maki ve Durance, 1996). Lizozim enzimatik olmayan daha çok bakteriyostatik etkiye sahip proteolitik aktivitesiyle öne çıkan bir enzimdir. Yapılan bazı çalışmalarda bu özelliğinden dolayı beyaz ve kırmızı şaraplarda malolaktik fermentasyonu engellemede kullanılmaktadır (Roldan vd., 2012). Yine benzer bir çalışmada *E. coli* ile lizozim arasındaki bakteriyostatik etkileşim incelenmiş ve optimal koşullar ayarlandığı zaman lizozimin *E.coli*

hücrelerini lize ettiği belirlenmiştir (Sedov vd., 2011). Lizozimin *Clostridium tyrobutyricum* gibi bütirik asit bakterilerinin yarı sert peynirlerde sebep olduğu laktat oluşumu gibi sorunları engellediği belirlenmiştir (Nattress vd., 2001). *Bacillus subtilis*'in gelişiminin kontrolünde lizozimin denendiği bir çalışmada, lizozimin antibiyotiklerden daha etkili olduğu belirlenmiştir (Eudes vd., 1995).

Diğer bir enzim olan ficinin özellikle 2.5 IU oranında ficin uygulamasının elma suyunda *A. acidoterrestris* gelişimini önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Ficinin etkisi 15. günden itibaren görülmekte ve depolama süresi boyunca *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini engellediği görülmektedir. Ficinin *Alicyclobacillus* türlerinde etkisini araştıran herhangi bir yayına rastlanmadığından, ficinin bu etkisinin lizozim gibi bir enzim olmasından kaynaklandığı d ş n lmekte ve çalışmadaki etkisi bu şekilde açıklanmaktadır.

Kırmızı pancar suyunun elma suyundaki *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişiminin engellenmesi üzerinde önemli bir etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde ticari bir katkı maddesi olan ve gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan sodyum benzoatın da önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin sodyum benzoatın düşük seviyelerdeki kontaminasyonlarda etkili olmasıdır. Çalışmamızda olduğu gibi kontaminasyon dozu yüksek olduğu zaman fazla bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Walker ve Phillips, 2008). Sodyum benzoatın etkisi doza bağımlı olmakla beraber, sporlar üzerinde fazla bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (Bevilacqua vd., 2008). Genel olarak sodyum benzoatın bakterilerden çok, maya ve küfler üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Hwang and Beuchat, 1995).

Çizelge 4.7. Portakal suyunda depolama süresince (90 gün) farklı uygulamalara ait mikroorganizma sayım sonuçları (log kob/ml)

Uygulamalar Günler	Portakal Suyu kontrol	Portakal Suyu lizozim	Portakal Suyu Ficin (1,25 IU)	Portakal Suyu ficin (2,50 IU)	Portakal suyu Kırmızı Pancar	Portakal Suyu Na-Benzoat
0	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A
15	3,67±0,03 b,A	0 b,B	1,63±0,13 b,C	1,20±0,17 ab,B	2,62±0,09 ab,D	2,70±0,17 a,D
30	3,61±0,02 b,A	0 b,B	1,64±0,55 b,CD	0,87±0,81 b,CD	2,55±0,21 ac,ED	2,77±0,10 a,E
60	3,37±0,20 bc,A	0 b,B	1,40±0,17 b,C	0,83±0,75 b,C	2,41±0,09 bcd,E	2,55±0,05a b,AE
90	3,25±0,08 c,A	0 b,BD	1,23±0,40 b,CE	0,93±0,81 b,D	2,05±0,19 d,E	2,42±0,14 b,AE

a,b,c,d harfleri; uygulamaların günlere göre farklılıklarını;

A, B,C,D,E harfleri; uygulamaların birbirlerine göre farklılıklarını göstermektedir.

Portakal sularında yapılan uygulamaların günler bazında karşılaştırıldığı Çizelge 4.7. de verilen veriler incelendiği zaman portakal suyunda da en etkili uygulamanın lizozim olduğu görülmektedir. *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini 15. Günden itibaren tamamen engellemiştir.

Ficinin etkisine bakıldığı zaman, ficinin her iki dozunun da *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini 15. günden itibaren önemli ölçüde azalttığı özellikle 2.5 IU ficin uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür.

Kırmızı pancar suyu enzimler kadar başarılı olmasa da portakal suyundaki *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini engellediği görülmüştür. Ticari katkı olan sodyum benzoat ise ilk ay içerisinde etkisi gözlenmesine rağmen üç aylık depolama süresi sonunda etkisini yitirdiği görülmüştür.

Çizelge 4.8. Sebze suyunda depolama süresince (90 gün) farklı uygulamalara ait mikroorganizma sayım sonuçları (log kob/ml)

Uygulamalar	Sebze Suyu kontrol	Sebze Suyu lizozim	Sebze Suyu Ficin (1,25 IU)	Sebze Suyu ficin (2,50 IU)	Sebze suyu Kırmızı Pancar	Sebze Suyu Na-Benzoat
Günler						
0	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A	2,82±0,02 a,A
15	3,59±0,08 b, A	0 b, B	1,97±0,12 b,C	1,58±0,27 b,C	2,88±0,10 a,D	3,04±0,52 a,AD
30	3,44±0,29 b,A	0 b,B	1,97±0,03 b,C	1,53±0,21 b,C	2,89±0,02 a,D	2,77±0,07 a,D
60	3,64±0,29 b,A	0 b,B	1,95±0,16 b,C	1,36±0,32 b,C	2,88±0,01 a,D	2,73±0,11 a,D
90	3,81±0,13 b,A	0 b,B	1,91±0,19 b,C	1,84±0,10 b,C	3,11±0,07 b,D	2,68±0,06 a,E

a,b,c,d harfleri; uygulamaların günlere göre farklılıklarını;

A, B,C,D,E harfleri; uygulamaların birbirlerine göre farklılıklarını göstermektedir.

Sebze suyunda günler bazında uygulamaların karşılaştırıldığı Çizelge 4.8. de verilen bilgiler incelendiği zaman diğer meyve sularında da olduğu gibi en etkili uygulama lizozim olmuştur. Lizozimin 15. günden itibaren *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini tamamen engellediği görülmüştür. Aynı şekilde ficinin iki farklı dozunun da aynı ölçüde etkili olduğu ve sebze suyunda *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini önemli ölçüde engellediği görülmüştür.

Kırmızı pancar suyunun da sebze suyunda *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişimini engellediği belirlenmiştir. Sodyum benzoatta benzer bir şekilde sebze suyunda *A. acidoterrestris* LMG-16906 gelişiminin engellenmesinde etkisi diğer meyve sularına nazaran daha fazla olmuştur.

Çizelge 4.9. Uygulamaların ürün arasında günler bazındaki gelişim farklılıkları

Uygulama	Aylar	0	15	30	60	90
Kontrol	Elma Suyu	2,82±0,02 A	2,57±0,05 A	2,56±0,10 A	2,40±0,13 A	2,17±0,12 A
	Portakal Suyu	2,82±0,02 A	3,67±0,03 B	3,61±0,02 B	3,37±0,20 B	3,25±0,08 B
	Sebze Suyu	2,82±0,02 A	3,59±0,08 B	3,44±0,29 B	3,64±0,29 B	3,81±0,13 C
Lisozim	Elma Suyu	2,82±0,02 A	0 A	0 A	0 A	0 A
	Portakal Suyu	2,82±0,02 A	0 A	0 A	0 A	0 A
	Sebze Suyu	2,82±0,02 A	0 A	0 A	0 A	0 A
Ficin (1,25)	Elma Suyu	2,82±0,02 A	1,63±0,13 A	1,74±0,24 A	1,73±0,05 AB	1,64±0,19 A
	Portakal Suyu	2,82±0,02 A	1,63±0,13 A	1,64±0,55 A	1,40±0,17 BC	1,23±0,40 A
	Sebze Suyu	2,82±0,02 A	1,97±0,12 B	1,97±0,03 A	1,95±0,16 AD	1,91±0,19 A
Ficin (2,50)	Elma Suyu	2,82±0,02 A	1,42±0,10 A	1,16±0,28 A	1,10±0,17 A	1,20±0,17 A
	Portakal Suyu	2,82±0,02 A	1,20±0,17 A	0,87±0,81 A	0,83±0,75 A	0,93±0,81 A
	Sebze Suyu	2,82±0,02 A	1,58±0,27 A	1,53±0,21 A	1,36±0,32 A	1,84±0,10 A
Pancar Suyu	Elma Suyu	2,82±0,02 A	2,41±0,54 A	2,43±0,62 A	2,51±0,07 A	1,72±0,37 A
	Portakal Suyu	2,82±0,02 A	2,62±0,09 A	2,55±0,21 A	2,41±0,09 A	2,05±0,19 A
	Sebze Suyu	2,82±0,02 A	2,88±0,10 A	2,89±0,02 A	2,88±0,01 B	3,11±0,07 B
Na-Benzot	Elma Suyu	2,82±0,02 A	2,63±0,17 A	2,27±0,34 A	2,58±0,19 A	2,32±0,13 A
	Portakal Suyu	2,82±0,02 A	2,70±0,17 A	2,77±0,10 A	2,55±0,05 A	2,42±0,14 AB
	Sebze Suyu	2,82±0,02 A	3,04±0,52 A	2,77±0,07 A	2,73±0,11 A	2,68±0,06 B

Yapılan bütün bu uygulamalardan elde edilen veriler ışığında farklı meyve suları arasında günler bazında herhangi bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Çizelge 4.9. da verilen bilgiler arasında kıyaslama yapılmıştır.

Uygulamalar elma, portakal ve sebze sularında günler bazında kıyaslandığı zaman lizozim ve 2.5 IU ficin uygulamasında üç ürün arasında da bir farklılık gözlenmemiştir. 1.25 IU ficin uygulamasında ise 2. ay sayımlarında ufak farklılıklar görülse de depolama süresi sonunda (90 gün) üç ürün arasında bir farklılık görülmemiştir.

Kırmızı pancar suyu uygulamasında günler bazında elma ve portakal suları arasında bir fark gözlenmezken, sebze suyunda 60. günden sonra farklılıklar oluşmuştur. Sodyum benzoat uygulamasında ise 60. güne kadar bir farklılık görülmezken depolama süresinin bitiminde üç ürün arasında farklılıklar belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Alicyclobacillus türlerinin dünya genelinde neden olduğu bozulma olayları asidik içeceklerde özellikle de elma ve portakal sularında ve tropik içeceklerde yaygın olarak görülmektedir.

‘Ticari steril’ olarak üretilen meyve sularında *Alicyclobacillus* türleri önemli sorunlara neden olmaktadır ve pastörizasyon işleminin yeterli koruma sağlamadığı görülmektedir. Pastörizasyon işleminde canlı kalabilen bu bakteriler meyve suyu endüstrisini sıkıntıya sokmaktadır.

Isıl işlemin yeterli olmadığı görüldükten sonra *Alicyclobacillus* türlerinin engellenmesinde yeni metotlar aranmaya başlanmıştır. Çeşitli ticari katkıları denenmiştir ancak günümüzde doğal ürünlere olan talep arttığından dolayı doğal katkıları aranmaya başlanmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında, meyve sularında en fazla sorun yaratan *Alicyclobacillus* türü olan *A. acidoterrestris* gelişiminin engellenmesinde doğal bileşikler kullanılarak meyve suyu sanayinin bu ihtiyacına bir cevap aranmıştır. Lisozim, ficin ve kırmızı pancar suyu gibi doğal bileşikler kullanılarak yapılan bu çalışmada aynı zamanda gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sodyum benzoat gibi ticari bir katkı maddesi de kullanılarak doğal ürünlerle karşılaştırılmalı bir deneme yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar ışığında; lisozim ve ficin enzimlerinin *A. acidoterrestris* gelişiminin engellenmesinde önemli ölçüde etkili olduğu bulunmuştur. Kırmızı pancar suyu enzimler kadar etkili olmamasına rağmen *A. acidoterrestris* gelişimini dikkate değer bir şekilde azaltmıştır. Sodyum benzoat ise önemli derecede bir etki göstermemiştir.

Sonuç olarak; lisozim, ficin ve kırmızı pancar suyunun *A. acidoterrestris*’in meyve suyu endüstrisinde yarattığı sorunların çözümünde önemli bir alternatif olduğu bulunmuştur. Böylece tüketicilerin arzu ettiği doğal katkılara olan ihtiyaç karşılanarak sentetik katkıların yerini alabilecektir. Meyve suyu üretim basamaklarına bu doğal katkılara uygun ekipmanlar eklenerek *Alicyclobacillus* türlerinin yarattığı sorunlar engellenebilecektir.

KAYNAKLAR

- Acar, J., Temiz, A. 2000. *Alicyclobacillus* türleri ve meyve suları açısından önemi. Gıda Bilimi ve Teknolojisi, 5, 33-37.
- Alberice, J.V., Huacca, M.E.F., Guterres, S.B., Carrilho, E., 2012. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-treatment. International Journal of Food Microbiology, 159, 130–135.
- Albuquerque, L., Rainey, F. A., Chung, A. P., Sunna, A., Nobre, M. F. Grote, R., Antranikian, G. and Costa, M. S., 2000. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 451–457.
- Anonim, 2012. Enzim ve mikroorganizma. Erişim tarihi: 01.06.2012. http://www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu809/enzim_ve_mikroorganizma.pdf.
- Bae, Y.Y., Lee, H.J., Kim, S.A., Rhee, M.S., 2009. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. International Journal of Food Microbiology, 136, 95–100.
- Bahçeci, K. S., Acar, J., 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. International Journal of Food Microbiology, 120, 266–273.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L., Rollini M., 2012. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. Food Control, 26, 387-392.
- Bevilacqua, A., Sinigaglia M., Corbo, M.R., 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: new methods for inhibiting spore germination. International Journal of Food Microbiology, 125, 103–110.
- Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2010. Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Control, 21, 172–177.
- Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., Gobbi, E., 2010. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Chemistry, 123, 653–658.
- Ceviz, G., Tulek, Y., Con, A.H., 2009. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media. International Journal of Food Science and Technology, 44, 1770–1777.

- Chung, W., Hancock, R.E.W., 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 25–32.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E., 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a New Thermotolerant Acidophile Isolated from Different Soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 47-53.
- Devaraj, K.B., Gowda, L.R., Prakash, V., 2008. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, 69, 647–655.
- Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O., Gieffers, W., 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Letters*, 449, 93-100.
- Englund, P.T., King, T.P., Craig, L.C., Walti, A., 1968. Studies on Ficin. I. Its Isolation and Characterization. *Biochemistry*, 7, 163-175.
- Eudes, F., Comeau, A., Collin, J., Asselin, A., 1995. Use of hen lysozyme for protection against bacterial contamination of *in vitro* embryo cultures. *Plant Cell Reports*, 15, 30-33.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2012. Sodium benzoate. Erişim tarihi: 01.06.2012. www.fao.org/ag/agn/jecfaadditives/specs/Monograph1/Additive393.
- Gobbi, E., Falasconi, M., Concina, I., Mantero, G., Bianchi, F., Mattarozzi, M., Musci, M., Sberveglieri, G., 2010. Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. *Food Control*, 21, 1374–1382.
- Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Mochida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki M., Tanaka, H., Inagaki, K., 2002. Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles*, 6, 333–340.
- Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., Yokota, A., 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess v-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1537–1544.
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.Y., Kasai, H., Yokota, A., 2007. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangioidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1276–1285.

- Gouws, P.A., Gie, L., Pretorius, A., Dhansay, N., 2005. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 789–792.
- Göçmen, D., Elston, A., Williams, T., Parish, M., Rouseff, R.L., 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC–olfactometry and GC–MS. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 172–177.
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel H., Omar, N.B., Maqueda, M., Martí'nez-Bueno, M., Martí'nez-Can'amero, M., Valdivia, E., Ga'lvez, A., 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 289–297.
- Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn, R C., 2008. Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles*, 12, 159–163.
- Guo, X., You, X.Y., Liu, L.J., Zhang, J.Y., Liu S.J., Jiang, C.Y., 2009. *Alicyclobacillus aeris* sp. Nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2415–2420.
- Harrichandparsad, Z., 2007. Evaluation of bacteriological techniques, sensory evaluation, gas chromatography and electronic nose technology for the early detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juice. Durban University of Technology, Durban, M.Sc. Thesis, 106 p, South Africa.
- Huang, Y., Humenik, M., Sprinzl, M., 2008. Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as a reporter and affinity tag for expression and single step purification of polypeptides. *Protein Expression and Purification*, 54, 94–100.
- Hwang, C., Beuchat, L.R., 1995. Efficacy of a lactic acid/sodium benzoate wash solution in reducing bacterial Contamination of raw chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 91–98.
- Imperio, T., Viti, C., Marri, L., 2008. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 221–225.
- Jensen, N., 1999. *Alicyclobacillus* –a new challenge for the industry. *Food Aust.*, 51, 33–36.
- Jiang, C.Y., Liu, Y., Liu, Y.Y., You, X.Y., Guo, X., Liu, S.J., 2008. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2898–2903.

- Karagözlü, N., 2004. Meyve sularında bozulma etmeni: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 8, 15-21.
- Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.I., Tourova, T.P., Kondrat'eva, T.F., Tsaplina, I.A., Egorova, M.A., Krasil'nikova, E.N., Zakharchuk, L.M., 2005. Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. thermotolerans' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 941–947.
- Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science & Technology, 34, 81–85.
- Lauro, B.D., Rossi, M., Moracci, M., 2006. Characterization of a *b*-glycosidase from the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Extremophiles, 10, 301–310.
- Lee, S.Y., Dougherty, R.H., Kang, D.H., 2002. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in Apple Juice. Applied and environmental microbiology, 68, 4158–4161.
- Li, D., Sheng, J., Yang, J., Yang, C., Zeng, Z., Sheng, L., 2012. Characterization of an acidophilic and thermostable α -amylase from *Alicyclobacillus sendaiensis* NUST. Starch/Starke, 00, 1–7.
- Maki, F., Durance, T.D., 1996. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. Food Research International, 29, 635-645.
- Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa M., Yamasato, K., 2002. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermoacidophilic, alicyclic fatty acidcontaining bacterium isolated from acidic beverages. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1681–1685.
- McKnight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'Ana A.S., Massaguier, P.R., 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Food Microbiology, 27, 1016-1022.
- Merle, J., Montville, T.J., 2012. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: the organism, the challenge, potential interventions. Journal of Food Processing and Preservation, 10, 1745-4549.
- Nattress, F.M., Yost, C.K., Baker, L.P., 2001. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, 70, 111–119.

- Özcan, M., Akgül, A., 1995. Gıdalar için doğal renk maddeleri. *Gıda*, 20, 209-213.
- Parish, M.E.; Goodrich, R.M., 2005. Recovery of Presumptive *Alicyclobacillus* Strains from Orange Fruit Surfaces. *Journal of Food Protection*, 68, 2196-2200.
- Pena, W.E.J., De Massaguer, P.R., Zuniga, A.A.G., Saraiva, S.H., 2010. Modeling the growth limit of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 in apple juice: effect of pH, brix, temperature and nisin concentration. *Journal of Food Processing and Preservation*, 10, 1745-4549.
- Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., Murphy, J.M., 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 185-189.
- Pontius, A.J., Rushing, J.E., Foegeding, P.M., 1998. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores as Affected by Various pH Values and Organic Acids. *Journal of Food Protection*, 61, 41-46.
- Roldán, A., Lasanta, C., Caro, I., Palacios, V., 2012. Effect of lysozyme on “flor” velum yeasts in the biological aging of sherry wines. *Food Microbiology*, 30, 245-252.
- Scheffel, F., Fleischer, R., Schneider, E., 2004. Functional reconstitution of a maltose ATP-binding cassette transporter from the thermoacidophilic gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1656, 57– 65.
- Sedov, S.A., Belogurova, N.G., Shipovskov, S., Levashov, A.V., Levashov, P.A., 2011. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: Discrimination between adsorption and enzyme action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 131– 133.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P., Vieirac, M.C., Silva, C.L.M., 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 95–103.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P., 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 68–74.
- Silva, F.V.M., Tan, E.K., Farid, M., 2012. Bacterial spore inactivation at 45-65 °C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. *Food Microbiology*, 32, 206-211.
- Simbahan, J., Drijber, R., Blum, P., 2004. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs,

- California, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1703–1707.
- Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., Witthuhn, R.C., 2010. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation e A review. *Food Microbiology*, 1-19.
- Steyn, C. E., Cameron, M., Witthuhn, R.C., 2011. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 1–11.
- Tribst, A.A.L., Franchi, M.A., Cristianini M., 2008. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 265–271.
- Tsuruoka, N., Isono, Y., Shida, O., Hemmi, H., Nakayama, T., Nishino, T., 2003. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1081–1084.
- Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, F.M., Gaspar, N., Silva, C.L.M., 2002. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 71–81.
- Walker, M., Phillips, C.A., 2005. The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 557–562.
- Walker, M., Phillips, C.A., 2008. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control* 19, 974–981.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk J.R., P., Fox, G.E., Deinhard, G., Porolla, K., 1992. Comparative Sequence Analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Union of Microbiological Societies*, 42, 263-269.
- Yuan, Y., Hu, Y., Yue, T., Chen, T., Lo, Y.M., 2009. Effect of ultrasonic treatment on thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 370–383.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sedef GÖKSU

Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : yl0930119014@sdu.edu.tr



Eğitim Durumu

Lise : Isparta Gazi Lisesi, 2005

Lisans : ADÜ, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği

Mesleki Deneyim

Algen Tarım, 2011-.....(halen)