

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİMON OTU YAĞININ ELMA SUYUNDA *ESCHERICHIA*
COLI O157:H7 ve *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN
ISIL DİRENCİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice EREN

Enstitü Anabilim Dalı

: GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR

Temmuz 2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİMON OTU YAĞININ ELMA SUYUNDA *ESCHERICHIA*
COLI O157:H7 ve *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN
ISIL DİRENCİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice EREN

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Hatice EREN

04.07.2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim konusunda yardımcı olup her konuda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Kamuran AYHAN ve Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm hayatım boyunca beni destekleyen ve hep yanımda olan annem Gülsen EREN ve babam Mehmet EREN, kardeşlerim Gökçen EREN ve Ahmet EREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın maddi olarak desteklenmesini sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2020-9-33-92) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin Özellikleri ve Önemi	5
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Özellikleri ve Önemi	8
2.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Gıdalarda Kullanımı.....	12
2.4. Limon otu (<i>Cymbopogon</i> spp.)	12
2.4.1. Limon otu bitkisinin özellikleri, yetiştirilmesi ve bileşimi.....	12
2.4.2. Gıda alanında kullanımı ve uygulanması.....	15
2.4.3. Limon otu yağı içeriği, özellikleri ve minimum inhibitör konsantrasyonu	16
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem.....	20

3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler	20
3.2.2. <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> inokulumlarının hazırlanması	21
3.2.3. Elma suyu örneklerinin hazırlanması ve inokülasyonu	21
3.2.4. Isıl işlem.....	22
3.2.5. <i>E. coli</i> O157:H7 ve <i>L. monocytogenes</i> sayımı.....	22
3.2.6. Membranı zarar görmüş hücre sayısının belirlenmesi	23
3.2.7. Log-Lineer ve Weibull inaktivasyon modellerine uyumlama ve D değerinin hesaplanması	23
3.2.8. z değerlerinin hesaplanması	24
3.2.9. Tahmini D değerlerinin hesaplanması.....	25
3.2.10. pH ölçümü.....	25
3.2.11. İstatistiki analizler	25
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	26
4.1. Elma suyunun pH'ının belirlenmesi	26
4.2. Elma suyundan SMAC ve PALCAM agar besiyerlerine ekim yapılması	27
4.3. <i>E. coli</i> O157:H7'ye Ait Araştırma Sonuçları	27
4.3.1. Termal inaktivasyon denemelerine ait sonuçlar	27
4.3.2. <i>E. coli</i> O157:H7'nin inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması	30
4.3.3. <i>E. coli</i> O157:H7'nin elma suyundaki D değerleri	39
4.3.4. <i>E. coli</i> O157:H7'nin elma suyundaki z değerleri.....	43
4.3.5. <i>E. coli</i> O157:H7'nin elma suyundaki tahmini D değerleri	46
4.3.5.1. <i>E. coli</i> O157:H7'nin Log-Lineer modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri	46
4.3.5.2. <i>E. coli</i> O157:H7'nin Weibull modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri	48
4.3.6. <i>E. coli</i> O157:H7'nin membranı zarar görmüş hücre sayısı.....	50
4.4. <i>L. monocytogenes</i> ' e Ait Araştırma Sonuçları.....	56

4.4.1. Termal inaktivasyon denemelerine ait sonuçlar	56
4.4.2. <i>L. monocytogenes</i> eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması.....	58
4.4.3. <i>L. monocytogenes</i> ’in elma suyundaki D değerleri	66
4.4.4. <i>L. monocytogenes</i> ’in elma suyundaki z değeri	69
4.4.5. <i>L. monocytogenes</i> ’in elma suyundaki tahmini D değerleri.....	71
4.4.5.1. <i>L. monocytogenes</i> ’in Log-Lineer modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri	71
4.4.5.2. <i>L. monocytogenes</i> ’in Weibull modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri.....	73
4.4.6. <i>L. monocytogenes</i> ’in membranı zarar görmüş hücre sayısı	75
BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	97

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
L	: Litre
LGO	: Lemon grass oil
log	: Logaritma
LOY	: Limon otu yağı
mL	: Mililitre
NaCl	: Sodyum klorür
PALCAM	: Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Ceftazidime Esculin Mannitol
ppm	: Milyonda bir
RMSE	: Kök ortalama kare hata
SMAC	: Sorbitol MacConkey
ss	: Standart sapma
TSA	: Tyryptic Soy Agar
TSB	: Tyryptic Soy Broth
TSBYE	: Tyryptic Soy Broth +Yeast Extract
δ	: Ölçek parametresi
ρ	: Şekil parametresi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Limon otu (<i>Cymbopogon spp.</i>) bitkisi	13
Şekil 4.1. Dört farklı sıcaklıktaki (55°C; 57,5°C; 60°C; 62,5°C ısıtma işlemi uygulanan elma suyundaki <i>E. coli</i> O157:H7 popülasyonunun zamana bağlı değişimi	28
Şekil 4.2. 55°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması.....	33
Şekil 4.3. 57,5°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması.....	34
Şekil 4.4. 60°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması.....	35
Şekil 4.5. 62,5°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması.....	36
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> O157:H7’nin Log-Lineer modele göre hesaplanan z değerleri...	44
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> O157:H7’nin Weibull modele göre hesaplanan z değerleri	45
Şekil 4.8. <i>E. coli</i> O157:H7’nin Log-Lineer modele göre hesaplanan tahmini D değerleri	47
Şekil 4.9 <i>E. coli</i> O157:H7’nin Weibull modele göre hesaplanan tahmini D değerleri	48
Şekil 4.10. 55°C’ de ısıtma işlemi tabi tutulmuş elma suyundaki <i>E. coli</i> O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (p<0,05; n=2).	51
Şekil 4.11. 57,5°C’ de ısıtma işlemi tabi tutulmuş elma suyundaki <i>E. coli</i> O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar	

görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).	52
Şekil 4.12. 60°C’ de ısıtılma işlemi tabi tutulmuş elma suyundaki <i>E. coli</i> O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).	53
Şekil 4.13. 62,5°C’ de ısıtılma işlemi tabi tutulmuş elma suyundaki <i>E. coli</i> O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).	54
Şekil 4.14. Dört farklı sıcaklıktaki (55°C; 57,5°C; 60°C; 62,5°C) ısıtılma işlemi uygulanan elma suyundaki <i>L. monocytogenes</i> popülasyonunun zamana bağlı değişimi	57
Şekil 4.15. 55°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması	60
Şekil 4.16. 57,5°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması	61
Şekil 4.17. 60°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması	62
Şekil 4.18. 62,5°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması	63
Şekil 4.19. <i>L. monocytogenes</i> ’in Log-Lineer modele göre hesaplanan z değerleri .	70
Şekil 4.20. <i>L. monocytogenes</i> ’in Weibull modele göre hesaplanan z değerleri.....	70
Şekil 4.21. <i>L. monocytogenes</i> ’in Log-Lineer modele göre hesaplanan tahmini D değerleri	72
Şekil 4.22. <i>L. monocytogenes</i> ’in Weibull modele göre hesaplanan tahmini D değerleri	73
Şekil 4.23. 55°C’ de ısıtılma işlemi tabi tutulmuş elma suyundaki <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ’in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı	

zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).....	76
Şekil 4.24. 57,5°C de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki <i>L. monocytogenes</i> 'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).....	77
Şekil 4.25. 60°C de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki <i>L. monocytogenes</i> 'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).....	77
Şekil 4.26. 62,5°C de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki <i>L. monocytogenes</i> 'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayısı arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).	78

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1. Elma suyuna LOY ilave edilmesi ile ölçülen pH değeri	26
Tablo 4.2. <i>E. coli</i> O157:H7'ye ait verilerin Log-Lineer modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları.....	32
Tablo 4.3. <i>E. coli</i> O157:H7'ye ait verilerin Weibull modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları.....	32
Tablo 4.4. <i>E. coli</i> O157:H7 için Weibull modeline uyumlanan literatür çalışmaları	38
Tablo 4.5. <i>E. coli</i> O157:H7'nin Log-Lineer ve Weibull modele göre hesaplanan D değerleri	40
Tablo 4.6. <i>E. coli</i> O157:H7 Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması ile hesaplanan z değerleri	44
Tablo 4.7. <i>E. coli</i> O157:H7'nin z değeri ile ilgili literatür verileri	45
Tablo 4.8. <i>E. coli</i> O157:H7'nin Log-Lineer modeline uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri	49
Tablo 4.9. <i>E. coli</i> O157:H7'nin Weibull modeline uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri	49
Tablo 4.10. <i>L. monocytogenes</i> 'e ait verilerin Log-Lineer modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları.....	59
Tablo 4.11. <i>L. monocytogenes</i> 'e ait verilerin Weibull modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları.....	59
Tablo 4.12. <i>L. monocytogenes</i> 'e ait inaktivasyon verilerinin Weibull modele uyumlandığı çalışmalar	64
Tablo 4.13. <i>L. monocytogenes</i> 'in Log-Lineer ve Weibull modele göre hesaplanan D değerleri	68
Tablo 4.14. <i>L. monocytogenes</i> 'in Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması ile hesaplanan z değerleri.....	69

Tablo 4.15. <i>L. monocytogenes</i> 'in z değeri ile ilgili literatür verileri.....	71
Tablo 4.16. <i>L. monocytogenes</i> 'in Log-Lineer modele uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri.....	72
Tablo 4.17. <i>L. monocytogenes</i> 'in Weibull modele uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri	74



ÖZET

Anahtar kelimeler: *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* limon otu yağı, elma suyu, ısıt işlem, D değeri, z değeri

Limon otu yağının (LOY) elma suyunda *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*'in ısıt direnci üzerine etkisi araştırılmıştır. LOY (%0,1 ve 0,2) ilave edilmiş elma suyu örneklerine 7-8 log kob/mL düzeyinde *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inoküle edilmiş, dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60; 62,5°C) ısıt işlem uygulanmış ve belirli sürelerde örnekleme yapılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler GInaFit yazılımında Log-Lineer ve Weibull modeline uyumlanarak D ve z değerleri hesaplanmıştır. Buna göre *E. coli* O157:H7'nin 55; 57,5; 60; 62,5°C'deki Log-Lineer ve Weibull modeline uyumlanarak hesaplanan D değerleri sırasıyla kontrol örneklerinde (%0 LOY) 10,84-11,18; 2,06-2,00; 1,39-1,53; 0,82-0,85 dak., %0,1 LOY ilave edilmiş örneklerde 10,78-9,90; 1,86-1,86; 1,25-1,28; 0,48-0,60 dak. ve %0,2 LOY ilave edilmiş örneklerde 9,11-8,32; 1,19-1,19; 1,10-1,06; 0,48-0,54 dakikadır. Veriler her iki modele de uyumlu bulunmuştur ($r^2 > 0,95$). *E. coli* O157:H7'nin %; 0,1 ve 0,2 içeren elma suyu örneklerindeki z değerleri Log-Lineer modele göre sırasıyla 7,09°C ($r^2=0,89$), 5,92°C ($r^2=0,93$) ve 6,45 ($r^2=0,85$), Weibull modele göre ise sırasıyla 7,19°C ($r^2=0,87$), 6,53°C ($r^2=0,92$) ve 6,89°C ($r^2=0,84$) olarak hesaplanmıştır. *L. monocytogenes*'in 55; 57,5; 60; 62,5°C'deki Log-Lineer ve Weibull modeline uyumlanarak hesaplanan D değerleri sırasıyla kontrol örnekleri için 12,71-11,63; 1,80-1,87; 1,56-1,62; 0,62-0,66 dak., %0,1 LOY ilave edilmiş örneklerde 11,57-10,95; 1,24-1,31; 1,14-1,17; 0,61-0,58 dak. ve %0,2 LOY ilave edilmiş örneklerde 10,41-7,73; 1,18-1,16; 0,94-0,90; 0,53-0,49 dakikadır. *L. monocytogenes*'in inaktivasyon eğrileri Log-Lineer modele göre ($r^2=0,91$) Weibull modele ($r^2=0,95$) daha uyumlu bulunmuştur. *L. monocytogenes*'in %; 0,1 ve 0,2 içeren elma suyu örneklerindeki z değerleri Log-Lineer modele göre sırasıyla 6,27°C ($r^2=0,87$), 6,46°C ($r^2=0,80$) ve 6,28 ($r^2=0,82$), Weibull modele göre ise sırasıyla 6,57°C ($r^2=0,88$), 6,43°C ($r^2=0,83$) ve 6,74°C ($r^2=0,86$) olarak hesaplanmıştır. Her iki patojende de sıcaklık ve LOY konsantrasyonu arttıkça membranı zarar görmüş hücre sayısı artmıştır. Çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda LOY'nın elma suyunda *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in ısıt direncini azalttığı, bu nedenle ısıt işlemle dayanıklı hale getirilen meyve sularında koruyucu olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

EFFECT OF LEMON GRASS OIL ON THE HEAT RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN APPLE JUICE

SUMMARY

Keywords: *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, lemongrass oil, apple juice, heat treatment, D value, z value

The effect of lemongrass oil (LGO) on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in apple juice was investigated. *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were inoculated (7-8 log cfu/ml) into apple juice samples added with LGO (0.1 and 0.2%). Then samples were heat treated at isothermal temperatures (55, 57.5, 60, 62.5°C) and the viable counts were determined after sampling at predetermined time intervals. D and z values were calculated by curve fitting to Log-Linear and Weibull models using GInaFit software. According to the Log-Linear model, the D values of *E. coli* O157:H7 at 55, 57.5, 60 and 62.5°C were 10.84, 2.06, 1.39 and 0.82 min, respectively, in control samples (0% LGO); 10.78, 1.86, 1.25 and 0.48 min, respectively, in 0.1% LGO added samples; and 9.11, 1.19, 1.11 and 0.48 min, respectively, in 0.2% LGO added samples. While, according to the Weibull model, they were 11.18, 2.00, 1.53 and 0.85 min, respectively, in control samples; 9.90, 1.86, 1.28 and 0.60 min, respectively, in 0.1% LOG added samples; and 8.32, 1.19, 1.06 and 0.54 min, respectively, in 0.2% LOG added samples. The survival curves were well fitted to both models ($r^2 > 0.95$). The z values of *E. coli* O157:H7 in apple juice with 0, 0.1 and 0.2% LOG were calculated as 7.09°C ($r^2 = 0.89$), 5.92°C ($r^2 = 0.93$) ve 6.45 ($r^2 = 0.85$), respectively, according to Log-Linear model, while they were calculated 7.19°C ($r^2 = 0.87$), 6.53°C ($r^2 = 0.92$) ve 6.89°C ($r^2 = 0.84$), respectively, by fitting to Weibull model. When the data were fitted to the Log-Linear model, the D values of *L. monocytogenes* at 55, 57.5, 60 and 62.5°C were 12.72, 1.80, 1.56 and 0.62 min, respectively, in control samples, 11.57, 1.24, 1.14 and 0.61 min, respectively, in 0.1% LOG added samples, and 10.41, 1.18, 0.94 and 0.53 min, respectively, in 0.2% LOG added samples. On the other hand, by fitting to the Weibull model, they were 1.63, 1.87, 1.62 and 0.66, respectively, in the control samples, 10.95, 1.31, 1.17 and 0.58, respectively, in 0.1% LOG added samples, and 7.73, 1.16, 0.90 and 0.49 min, respectively, in 0.2% LOG added samples. The survival curves were better fitted to the Weibull model ($r^2 > 0.95$) than the Log-Linear model ($r^2 > 0.91$). The z values of *L. monocytogenes* in apple juice with 0, 0.1 and 0.2% LOG were calculated as 6.27°C ($r^2 = 0.87$), 6.46°C ($r^2 = 0.80$) ve 6.28 ($r^2 = 0.82$), respectively, according to Log-Linear model, while they were 6.57°C ($r^2 = 0.88$), 6.43°C ($r^2 = 0.83$) ve 6.74°C ($r^2 = 0.86$) according to Weibull model. The number of membrane-damaged cells of both pathogens increased with the increasing temperature and LOG concentration. Based on the finding obtained in this study, it was concluded that LOG reduces the thermal resistances of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in apple juice; therefore, it can be used as a preservative in fruit juices preserved by heat treatment.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Meyve ve sebzede bulunan faydalı besinlerin alınmasında bunlarının sularının tüketilmesi alternatif bir yöntemdir (WHO, 2004). Meyve suları içerdiği biyoaktif bileşikler; vitamin, fenolik bileşikler, antosiyanin, karatoneidlerden dolayı önemli bir besin kaynağıdır (Sung ve ark., 2013). Fakat son yıllarda tüketicilerin lezzet, vitamin vb. kayıpların olmadığı minimal düzeyde işlem görmüş taze gıdalara olan taleplerinde artış olmaktadır (Kisko ve Roller 2005). Günümüzde meyve suyu tüketimi incelendiğinde; yapılan araştırmalara göre her yıl bir öncekine göre taze ve soğuk meyve suyuna olan talepte %3 artış beklenmektedir (AIJN, 2019).

Özellikle elma suyu tüketiminde en önemli risk faktörü *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenlerin sebep olduğu gıda kaynaklı salgınlardır. Gıda kaynaklı patojenlerin varlığının temel nedeni tarlada üretim sırasında ve sonrasında ürünlerin işlenmesinde meydana gelen kontaminasyondur (Lapena ve ark., 2022). *E. coli* O157:H7 sığır, yabani kuş vb. hayvanların dışkılarında bulunur. Bu dışkıların gübre olarak kullanılması kontaminasyon için risktir. Ayrıca elma suyu üretiminde çoğu üreticinin rüzgardan düşen küçük elmaları kullandığı belirtilmiştir (Besser ve ark., 1993; Janisiewicz ve ark., 1999). Böylece düşerek hasar gören elmalarda *E. coli* O157:H7 kontaminasyon riski bulunmaktadır. Bu da meyve sinekleri tarafından diğer elmalara yayılır. Eğer elmalar işlenmeden önce yetersiz yıkanıp herhangi bir dezenfeksiyon işlemine tabi tutulmazsa presleme sırasında *E. coli* O157:H7 meyve suyuna aktarılır (Folsom ve Frank, 2000; Baskaran, 2010). İyi tarım uygulamaları ve iyi üretim uygulamaları kullanılarak bu kontaminasyon en aza indirilebilir. Ancak bu uygulamalar ürün güvenliğini sağlamada yeterli olmayabilir (Lapena ve ark., 2022). Çünkü sonradan üründe kontaminasyon meydana gelebilir. Bu nedenle başka uygulamaların üretim sürecine eklenmesi ile kontaminasyonu engelleyebilmek mümkündür.

Amerika Birleşik Devletlerinde, elma üretimi, hasat edilmesi, hammaddenin depolanması, uygun sanitasyon prosesi ve düşük sıcaklıklarda depolanması aşamalarında güvenlik kalite kriteri olarak riski minimize etmek için tüm meyve sularında en dirençli patojen mikroorganizma sayısının 5 log kadar azaltılacak ısı işlem uygulanması gerektiği bildirilmiştir (FDA, 1998; 2002; 2004).

Geleneksel meyve suyu işleme sırasında pastörizasyon sıcaklığında patojenlerin vejetatif formları ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar etkisiz hale getirilir. Kalan çoğu mikroorganizma ise meyve sularının asidik yapısından dolayı gelişme gösteremez (Splittstoesser ve ark., 1994; CDC, 1997). Eğer meyve sularına uygun koşullar, kritik kontrol noktalarına dikkat edilerek pastörizasyon işlemi yapılabilirse patojen bakteri riski kolayca ortadan kaldırılabilmektedir. Bu durumda raf ömrü daha uzun meyve suları tüketime sunulabilmektedir.

Pastörizasyon uygulaması alternatifler arasında yer alabilir fakat bu da meyve sularında vitamin, fenolik bileşik vb., maddelerin kaybına yol açarken duyuşal profilinin hasar görmesine sebep olabilir (Achir ve ark., 2016; Petrucci ve ark., 2017). Fakat üreticiler için pastörizasyon ekipmanlarının maliyetli oluşu ve ürünlerdeki duyuşal değişiklikler nedeniyle talebin azalması nedeniyle yeni yöntemler araştırılmaktadır.

Patojenik bakterilerin gelişimini önlemek için en önemli etkenlerden birisi sıcaklık kontrolüdür. Fakat gıda kaynaklı patojenler üretim süresi boyunca kullanılan ölümcül olmayan sıcaklık ve pH değerlerine yaygın şekilde maruz kalırlar (Coşansu, 2018). Bu şekilde de sıcaklık ve pH'a karşı direnç kazanabilirler. Wang ve Doyle (1998) yaptığı çalışmada *E. coli* O157:H7'ye yetersiz ısı işlem uygulamasının asidik ortama karşı toleransını artırdığını tespit etmişlerdir. *E. coli* O157:H7 aside karşı dirençli olması sebebiyle elma suyunda faaliyet göstererek zehirlenmelere sebep olmaktadır.

Meyve sularının gıda güvenliğini sağlamak ve raf ömrünü uzatmak için yeni metotlara ihtiyaç vardır. Alternatif bir yöntem olarak gıdanın duyuşal profilinde herhangi bir değişikliğe sebep olmayacak bileşen ilave edilmesi kullanılabilir (Roller, 2003). Bunlardan biri olan kimyasal antimikrobiyal maddelerin kullanılması insan sağlığı için

risk oluşturabilmektedir. Doğal antimikrobiyal maddelerin eklenmesi ise diğer bir yöntem olarak değerlendirilebilir (Kisko ve Roller, 2005). Yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen antimikrobiyallerin *E. coli* O157:H7 üzerine etkili olduğu laboratuvar ortamında görülmüştür (Dorman ve Deans, 2000; Moreira ve ark., 2005; Holley ve Patel 2005). Fakat doğal antimikrobiyal seçiminde gıdaya ilave edildiğinde duyuşal profilinde meydana getireceğı değişikliklere dikkat edilmelidir (Moon ve ark., 2005).

E. coli O157:H7 pH'ı 4'ten daha düşük gıdalarda gıdanın diğer faktörlerine bağlı olarak gelişim gösterebilir (Meng ve ark., 2013). *E. coli* O157:H7'nin aside karşı toleransı en önemli virölans faktörü olarak kabul edilmektedir, bu şekilde mide asidinde olduğu gibi gıdalarda da hayatta kalabilir (Wang ve Doyle, 1998). Elma suyunda *E. coli* O157:H7'in doğal asit direnciyle hayatta kalabildiğı deneysel olarak kanıtlanmıştır (Uljas ve Ingham, 1999; Roering ve ark., 1999).

Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 ile kontamine olmuş elma sularının pastörize edilmeden tüketilmesi gıda kaynaklı salgınların ciddi bir nedenidir (Kisko ve Roller, 2005). *E. coli* O157:H7 ile kontamine olmuş pastörize edilmemiş elma sularının tüketilmesi enterohemorajik hastalıklar olan hemorojik kolit ve hemolitik üremik sendroma sebep olabilir (Nguyen ve Sperandio, 2012, Moon ve ark., 2005).

L. monocytogenes düşük sıcaklıklar dahil olmak üzere çevresel faktörler, yüksek tuz konsantrasyonu gibi durumlara karşı dirençli olup, pH bakımından incelendiğinde 4,4 ve 9,4 aralığında gelişebilirken pH 4,3'ten küçük değerde çoğalmadan hayatta kalabildiğı tespit edilmiştir. Bu özellikleri incelendiğinde *L. monocytogenes* toplum sağlığı için önemli derecede risk oluşturan patojen mikroorganizmalardan birisidir (Gandhi ve Chikindes, 2007; Kumar ve ark., 2016; Bell ve Kyriakides, 2009).

Şifalı bitkiler, baharatlar, otlar vb. doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıdalarda kullanılması özellikle son yıllarda artış göstermektedir. Bu tip bitkilerin antimikrobiyal etkilerinden faydalanılmak için ticari olarak üretilen 400 ile 500 arasında değişen esansiyel yağlar mevcuttur (Tisserand ve Young, 2013).

Esansiyel yağların etkisi; uygulandığı gıdadaki antimikrobiyal etkisi, gıdanın bileşimi, etki ettiği mikroorganizma, seçilen metot ve yönteme bağlı olarak farklılık göstermektedir (Zaika, 1988).

Esansiyel yağlar 60 kadar bileşene sahip olabilirler (Russo ve ark., 1998). Bu yüzden bakteri hücrelerine karşı birçok farklı etki göstermektedirler (Burt, 2004). Bunlar; hücre duvarının yapısının bozulması, hücre membranının ve membran proteinlerinin hasar görmesi (Ultee ve ark., 1999), membran geçirgenliğinde artış ile hücre bileşenlerinde sızıntı (Ultee ve ark., 2002), sitoplazmanın pıhtılaşması (Gustafson, 1998), proton hareket kuvvetinin azalması (Ultee ve ark., 1999), temel enzimlerin inaktivasyonu ve genetik materyalin bozulmasıdır (Ayala-Zavala ve ark., 2008).

Latince adı *Cymbopogon citratus* olan bitki yaygın olarak limon otu olarak bilinmektedir. İnsanların tüketimi için gıdalara aroma verici ve katkı maddesi olarak kullanılması FDA tarafından kabul edilen bitkiler arasında yer almaktadır (FDA 2015a, FDA 2015b). Yapılan bir çok çalışmada limon otu yağının hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere, maya ve mantarlara karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Adukwu, 2016; Naik ve ark., 2010; Negrelle ve Gomes, 2007; Shigeharu ve ark., 2001; Hammer ve ark., 1999). Limon otu yağının gıdalardaki güçlü antimikrobiyal etkisi sitral içeriğinden kaynaklanmaktadır (Kumar ve ark., 2013; Sivakumar ve ark., 2014; Kpoviessi ve ark., 2014). Limon otu yağının kimyasal bileşiminin %85'i sitraldır (Silva ve ark., 2008).

Bu çalışmada, limon otu yağının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in ısıl direnci üzerine etkisinin elma suyu ortamında belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların ısıl işlem uygulanan elma sularında *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'i kontrol altına alarak risk faktörlerinin ortadan kaldırılması ve mikrobiyal güvenliğin sağlanmasına katkıda bulunabilmesi hedeflenmektedir.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Escherichia coli* O157:H7'nin Özellikleri ve Önemi

E. coli O157:H7 dünya üzerinde gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet veren başlıca patojenlerden biridir. Çeşitli yaşam koşullarına uyum sağlama konusunda gelişmiş olması, büyükbaş hayvanların bağırsaklarında yerleşip çoğalmalarına olanak sağlar. Gram negatif olan bakteri, çubuk şeklindedir, fakültatif, anaerobiktir (Desmarchelier ve ark., 2004).

E. coli'nin diğer suşları arasında serolojik olarak ilişki olduğu ilk kez 1921 yılında tespit edilmiş ve 1937 yılında ise kapsül ve somatik olmak üzere iki farklı antijeninin olduğu bulunmuştur. Kaufmann 1943 yılında bu iki antijenin yanı sıra flagella antijeninin de olduğunu ortaya koymuştur. Günümüze kadar tespit edilen ve listeden çıkarılan bir çok antijen bulunmakta olup son olarak 174 O, 56 H ve 80 K antijeni olduğu tespit edilmiştir (Doyle ve ark., 2019).

E. coli O157:H7 serotipinin patojen olarak; ilk izolasyonu 1975 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Kaliforniya eyaletinde bir kadının kanlı ishal olması sonucunda olmuştur (Fernandez, 2008). O157:H7 serotipi 1982 yılında patojen olarak tanımlandığında ise Amerika Birleşik Devletleri'nin Oregon ve Michigan eyaletlerinde meydana gelen kanlı ishal salgınının kaynağı olarak saptanmıştır (Riley ve ark., 1983).

Çalışmalar sonucunda O157:H7 serotipinin, kendisinden daha az tehlikeli ve insan metabolizmasına daha az zararlı olan O55:H7 serotipinden evrimleştiği görülmüştür (Lim ve ark., 2010). O157:H7 serotipi diğer *E. coli* serotipleri gibi 37 °C'de ve nötre yakın pH değerlerinde gelişim göstermektedir (Lim ve ark., 2010). Buna rağmen düşük

pH değerlerine karşı zaman içerisinde direnç kazanmış olan bakteri, mide ortamında da hayatta kalabilmekte ve buradan bağırsaklara geçerek koloni oluşturabilmektedir. Bu özelliği ile bakteri 4°C gibi sıcaklık değerlerinde uzun süre hayatta kalabilir ve gıda endüstrisi açısından önemli derecede riskli görülen mikroorganizma olarak değerlendirilmesine neden olur (Arocha ve ark., 1992).

Amerika Birleşik Devletleri'nde elde edilen verilerde, *E. coli* O157:H7 kaynaklı salgın ve vakalarda en yaygın nedenin kontamine olmuş su ve gıdalardan kaynaklandığı ortaya çıkmıştır. Bunun yanında insandan insana ya da hayvandan insana kontaminasyon yoluyla yayıldığı da bilinmektedir. 1982 ve 2002 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelen 350 salgının %52'sinin gıda kaynaklı, %14'ünün kişiden kişiye bulaşı yoluyla, %9'unun su kaynaklı ve %3'ünün hayvandan insana bulaşı kaynaklı olduğu tespit edilmişken vakaların %21'inin nedeni saptanamamıştır (Rangel ve ark., 2005). Gıda kaynaklı olarak meydana gelen hastalıklarda en büyük neden sığır kıymasıdır. Et ürünleri kesim sırasında ya da parçalama sırasında bulaş olabilmekte ve etten kıyma çekilmesi durumunda bakteri etin dış yüzeyinden iç kısımlarına geçebilmektedir. Bu durumda kıymanın iyi pişirilmemesi durumunda bakteri yaşam fonksiyonlarını kaybetmez. Et ürünlerinin yanı sıra pastörize edilmemiş süt, içme suları, marul, ıspanak, turp ve elma suyu gibi gıdalar da kontamine olması durumunda insanlarda hastalıklara neden olmaktadır (Lim ve ark., 2010).

E. coli O157:H7 serotipinin kaynağı olduğu kayıtlara geçen en büyük salgın ise turp nedeniyle ortaya çıkmıştır. 1996 yılında Japonya'da Sakai şehrinde okullarda tüketilen beyaz turp sonucu şehrin toplam nüfusunun %0,5'ini oluşturan 5727 kişi hastalığa yakalanmıştır (Michino ve ark., 1999). Bu gibi salgınlardan korunmak için dikkat edilmesi gereken başlıca husus mezbahalarda ve besi çiftliklerinde temizlik konusudur. Süt sağımı sırasında hayvanların temizliğine dikkat edilmelidir. Ayrıca hayvanlara verilen yemlerin ve suların kontamine olmamasına özen gösterilmeli, kesim sırasında karkasa fekal bulaşma olmamalıdır (Tosun ve Gönül, 2003).

Gıdalarda özellikle iyi yıkanmamış ve dışkı ile kontamine olmuş elmaların, elma suyu olarak tüketimi sonucu kayıtlara geçen birçok vakaya rastlanılmıştır. Pastörize edilmeden üretilen elma şaraplarında da aynı tehlike söz konusudur. Bu şekilde üretilen elma şaraplarında alkol oranının da yüksek olmaması (%4) mikrobiyal faaliyeti kısıtlama konusunda yetersiz kalmaktadır (Doyle ve ark., 2019).

Geleneksel meyve suyu işleme sırasında pastörizasyon sıcaklığında patojen ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmaların vejetatif formları etkisiz hale gelir. Meyve suyunda kalan çoğu mikroorganizma ise meyve suyunun asidik yapısı sebebiyle gelişme gösteremez. Fakat elma sularında *E. coli* O157:H7 aside karşı dirençli olması sebebiyle gelişme göstererek zehirlenmelere sebep olabilir.

E. coli O157:H7 serotipinin neden olduğu salgınlarda elma ve portakal suyu gibi asit içeren meyve suları, 1990'lı yıllara kadar aracı gıda olarak görülüyordu. Elma suyu kaynaklı, 1991 yılında meydana gelen salgından sonra bu gibi içecekler üzerine yapılan mikrobiyolojik çalışmalar artmıştır (Besser ve ark., 1993). Kontaminasyon parçalama işlemi sırasında veya sonrasında olabilmektedir. Patojen mikroorganizmalar meyve suyunun düşük pH'ından dolayı çoğalamamasına rağmen hayatta kalabilirler ve ortama uyum sağlayabilirler (Leyer ve ark., 1995). Mazzotta (2001) elma suyu üzerine yaptığı çalışmada, asitliğe karşı uyum sağlamış *E. coli* O157:H7 suşlarının diğer *E. coli* O157:H7 suşlarıyla arasındaki farkı incelemiştir. Çalışmada elma suyundan kaynaklanan bir salgından enfekte olmuş bir hastadan izole edilmiş *E. coli* O157:H7 suşu asit direnci kazanmış grup olarak kullanılmıştır. Bakterilerin D değerleri kıyaslandığında; asit direnci kazanmış olanların 56°C'de D değeri 7,0±0,21 dak. hesaplanırken diğer grubun D değeri ise 4.1±0.7 dak. olarak belirlenmiştir. 58°C'de asit direnci kazanmış olan *E. coli* O157:H7 için D değeri 3,5±0,53 dak. diğer grubun D değeri ise 1,9±0,16 dak. hesaplanmıştır.

1995-2005 yılları arasında *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella spp.*'nin sebep olduğu çeşitli gıda kaynaklı hastalıklar meydana gelmiştir. Birleşik Devletler Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'nin kayıtlarına göre bu tarihler arasında meyve suyu ile ilişkili 21 salgın tespit edilmiştir (Sung ve ark., 2013). Bu salgınların 10 tanesi elma

suyu ve şarabında, 8 tanesi portakal suyunda ve 3 tanesi diğer meyve suları kaynaklıdır. Bunlardan 5 tanesine *E. coli* O157:H7'nin sebep olduğu belirlenmiştir (Vojdani ve ark., 2008). 2005-2020 yılları arasında ise taze meyve suyu tüketimine olan isteğin de artması ile birlikte CDC-2021 kayıtlarına göre özellikle elma suyu kaynaklı 16 salgın ve portakal suyu kaynaklı 2 salgın meydana gelmiştir (Krug ve ark., 2020). Elma suyu kaynaklı salgınlarda 11 tanesinin sebebinin *E. coli* olduğu, 7 tanesinin ise verotoksijenik suşunun O157:H7 olduğu belirlenmiştir.

Meyve sularında patojen mikroorganizmalar üzerine termal inaktivasyon denemelerine ait yapılan çalışmalar incelendiğinde; *E. coli* O157:H7 suşları üzerine elma sırası ve elma suyunda yoğunlaştığı tespit edilmiştir (Splittstoesser ve ark., 1994; Uljas ve Ingham, 1999; Mazzotta, 2001; Gabriel ve Nakano, 2009; Enache ve ark., 2011). Bu çalışmaların nedeni ise meyve suyu kaynaklı salgınlara genel olarak elma sırası ve elma suyundan olmasıdır (CDC, 2021; Krug ve ark., 2020; Vojdani ve ark., 2008).

Birleşik Devletler, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından meyve sularındaki gıda güvenliğini sağlamak için tehlike analizi yapılmış ve kritik kontrol noktaları belirlenmiştir. Buna göre meyve sularında gıda güvenliği için ana kriter olarak patojen mikroorganizmanın 5 log azalması belirlenmiştir (FDA, 2002). Genel olarak 5 log azalma için termal uygulama pastörizasyondur. Ancak bu ısı işlem gıdanın besinsel ve fitokimyasal özelliklerine zarar verebilmektedir (Braddock, 1999). Ayrıca son yıllarda birçok tüketici lezzet ve vitamin kaybını önlemek için taze sıkılmış meyve sularını tercih etmeye başlamıştır (Bignon, 1997). Bu tüketici eğilimi üreticilerin yeni alternatif yöntemler aramasına sebep olmuştur.

2.2. *Listeria monocytogenes*'in Özellikleri ve Önemi

L. monocytogenes Gram pozitif ve çubuk şeklinde olan fakültatif aerobik bir bakteridir. Meydana gelen gıda kaynaklı hastalıkların ve salgınlara önemli bir kısmının nedenini oluşturur. *L. monocytogenes*'in neden olduğu bu hastalıklar yaşlılar, hamileler, yeni

doğan bebekler gibi özellikle bağışıklık sistemi düşük insanlar üzerinde etkili olur ve listeriozis ortaya çıkarır (WHO/FAO, 2004).

L. monocytogenes flagellaya sahiptir; O ve H antijenlerini barındırır. Şimdiye kadar 13 farklı serotipi bulunmuştur. Bu serotipler için maksimum gelişim sıcaklığı 30-37 °C arasındır. Ancak bakteri 0-45 °C arasında yaşamını sürdürebilir. Sıcaklığa karşı gösterdiği bu tolerans ile *L. monocytogenes* buzdolabı koşullarında hayatta kalabilir. Ayrıca dezenfektanlara karşı dirençlidir ve yüzeylere yapışık olarak kalır. Biofilm oluşturabilmesi nedeniyle de gıda kaynaklı kontaminasyonlara sebep olabilir (Jamshidi ve Zeinali 2019).

Listeriozis, *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş bir gıdanın tüketimi sonucu insanda oluşan enfeksiyondur. Sadece *L. monocytogenes* tarafından değil, diğer *Listeria* türlerinden olan *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* de çok az sıklıkta olsa bu enfeksiyona sebep olabilir. Listeriozis enfeksiyonu insanlarda başlıca menenjitte, sepsise ve hamilelerde düşüğe neden olur. Kontamine olmuş bir gıdanın sağlıklı bireyler tarafından tüketilmesi durumunda çoğu zaman ciddi sorunlar oluşmasa da bağışıklık sistemi güçlü olmayan kişilerde menenjit ve sepsis ortaya çıkabilir (Jamshidi ve Zeinali 2019). Kişide enfeksiyon oluşması durumunda görülen ilk ve genel belirtiler ateş, halsizlik, kas ağrısı, bulantı ve ishaldir. Bu semptomlar kontamine gıdanın tüketilmesinden sonra ilk birkaç gün içerisinde ortaya çıkar. Eğer *L. monocytogenes* kaynaklı enfeksiyon sinir sistemini etkilerse bu semptomların haricinde boyun sertliği, denge kaybı, baş ağrısı ve kas kasılmaları meydana gelir. Hamile bireylerde *L. monocytogenes* enfeksiyonu durumunda annede semptomlar genelde hafif seyreder ve tehlike oluşturmaz Ancak bebek üzerinde aynı durum söz konusu değildir. Anne karnında düşük meydana gelebilir ya da bebek doğduktan sonra birkaç gün içerisinde bebeğin hayati tehlikesi oluşabilir. Yeni doğan bebeklerde bu enfeksiyonun belirtileri bariz şekilde oluşmayabilir. Genel olarak semptomlar ateş, iştahsızlık, kusma, nefes alıp vermede zorlanma ve huzursuzluk şeklindedir (Rodrigues ve ark., 2017).

1980’li yıllarda vaka sayılarındaki artış nedeniyle listeriozis konusunda yapılan çalışmalar artmış ve önemli bir gıda kaynaklı hastalık olarak görülmeye başlanmıştır. 1981 yılında Kanada’da beyaz lahana salatası (Coleslaw) tüketimi sonucu meydana gelen salgında 17 kişi hayatını kaybetmiş ve bu olay beyaz lahana kaynaklı ilk listeriozis salgını olarak kayıtlara geçmiştir. 1983 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde ilk çiğ süt kaynaklı listeriozis salgını meydana gelmiştir. 1998 ve 2008 yılları arasında 24 adet listeriozis salgını olmuş ve bu salgınlar salam, Frankfurter sosisi ve Meksika tipi peynirin tüketilmesi sonucu meydana gelmiştir (Rodrigues, ve arl., 2017). Bu salgınlardan en büyüğü Frankfurter sosisi kaynaklı olmuş ve 1998 yılında 14 kişi hayatını kaybetmiştir (Farber ve ark., 2011).

2014-2015 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri’nde ticari olarak üretilmiş, paketlenmiş karamelize elmalardan kaynaklanan *L. monocytogenes* salgınında yapılan çalışma sonucunda; 35 vaka belirlendiği, 12’sinin hastaneye kaldırıldığı ve 7 kişinin hayatını kaybettiği tespit edilmiştir. Üreticinin tesisinden ve dağıtımını yaptığı elmalardan alınan numunelerin sonucu değerlendirildiğinde yüksek oranda salgın izolatlarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu salgın ile *L. monocytogenes* kontaminasyonunu en aza indirecek şekilde kritik kontrol noktalarının belirlenmesi gerektiği ortaya çıkmıştır (Angelo ve ark., 2017).

Şimdiye kadar kayıtlara geçen en büyük *L. monocytogenes* kaynaklı salgın ise Haziran 2017 ve Nisan 2018 tarihleri arasında Güney Afrika Cumhuriyeti’nde görülmüş ve 1060 kişi etkilenmiş, 216 kişi hayatını kaybetmiştir (Clark, 2019). Salgının kaynağının *L. monocytogenes*’le kontamine olmuş ve yemekhanelerde verilen sosis olduğu tespit edilmiştir (Juno Thomas ve ark., 2020).

Türkiye’de şimdiye kadar kayda geçen *L. monocytogenes* kaynaklı bir salgın görülmemiştir. Ancak Anadolu’nun çeşitli yörelerinden alınan çiğ süt numunelerinin %18,2’sinin *L. monocytogenes* içerdiği yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Yavuz ve Korukoğlu 2010).

L. monocytogenes içermesi riski yüksek olan gıdalar arasında midye ve istiridye gibi deniz ürünleri, yeşil sebzeler, taze meyvelerden üretilmiş meyve suları, sos-salam gibi işlem görmüş et ürünleri, pastörize edilmemiş süt, pastörize edilmemiş süttten üretilen dondurma, feta, ricotta gibi yumuşak peynirler yer alır.

L. monocytogenes 'in sıcaklık uygulamasıyla inaktivasyonu konusunda yapılan bir çalışmada FDA'nın gerektirdiği 5 log düzeyinde bir azalma amaçlanmış ve bu işlem için konveksiyonel ısı uygulamasının yanında mikrodalga ısıtma yöntemi de denenmiştir. Endüstride mikrodalga ısıtma yönteminin diğer yöntemlere göre hızlı olması ve kullanılan ekipmandan kaynaklanan ısı kaybının önlenmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Heddleson Doores, 1994).

Sıcaklık uygulamalarının yanı sıra, gıda koruyucularından nisin de *L. monocytogenes* 'in gelişimi üzerindeki inhibe edici etkisi olduğu Bozaris ve Nychas (2006)'ın yaptığı çalışmalar sonucu ortaya konmuştur. TSB besiyerinde nisin kullanmadan, %0-2,5 aralığında değişen tuz konsantrasyonunda 25-35°C sıcaklık değerleri arasında *L. monocytogenes* 'in gelişim gösterebildiği en düşük pH değeri 4,81 olarak bulunmuştur. Tuz konsantrasyonunun arttığı (%10,5) ve su aktivitesinin azaldığı besiyerlerinde ise gelişim görülen en düşük pH değeri 6,7 olarak ölçülmüştür. Bu açıdan tuzun *L. monocytogenes* üzerindeki inhibe edici etkisi ortaya çıkarılmıştır. Besiyerlerine aynı sıcaklık (25°C) ve tuz konsantrasyonu değerinde (%10,5 w/v), 50 IU/mL değerinde nisin eklenmesi durumunda ise herhangi bir gelişim gözlenmemiş ve bu sonuç nisin *L. monocytogenes* gelişimi üzerinde ne denli etkili olduğunu açık bir şekilde ispatlamıştır (Bozaris ve Nychas, 2006).

L. monocytogenes 'in meyve sularında sebep olduğu kanıtlanmış bir salgın olmamasına rağmen her alanda yaşamını sürdürmesi nedeniyle pastörize meyve suyu üretim aşamasında transfer, harmanlama vb. aşamalarında potansiyel kontaminasyon riski oluşturduğu için hedef mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (FDA, 2004)

2.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Gıdalarda Kullanımı

İnsanoğlu, hayatını sürdürebilmek için ihtiyaç duyduğu besinlerin önemli bir kısmını bitkilerden temin etmektedir. Bitkiler karbonhidrat, yağ, protein, mineral madde ve vitamin gibi besin bileşenleri için oldukça önemli kaynakları oluşturmaktadır. Bitkiler beslenme ihtiyacının karşılanması yanı sıra ilaç, kozmetik, kimya, gıda ve zirai mücadele gibi sektörler için de son derece önemlidir (Gölükçü ve ark. 2012).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin en önemli özelliklerinden biri de antimikrobiyal aktivite göstermeleridir. Bitki esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri bir takım mekanizmalara bağlanmaktadır. Örneğin soğan (*Allium cepa*) ve sarımsak (*Allium sativum*)’dan elde edilen izotiyosiyanatın antimikrobiyal aktivitesi extraselüler enzimleri inaktive edebilme yeteneğine bağlanmaktadır (Brul ve Coote, 1999). Çoğu esansiyel yağların antibakteriyel etkileri hücre duvarının yapısını bozmalarından kaynaklanmaktadır. Bu aktivite elektron alışverişini, iyon yoğunluğunu, protein sentezini, fosforilasyon adımlarını ve enzimlere bağlı direk reaksiyonları etkilemektedir. Bütün bunlar da bakterinin kimyasal ozmotik dengesini kaybetmesine neden olmaktadır (Ultee ve ark., 1999; Cox ve ark., 2000; Dorman ve Deans, 2000).

Bitkisel materyalden esansiyel (eterik) yağ elde edilmesinde kullanılan yöntemler; sulu destilasyon, su-buhar destilasyonu, buhar destilasyonu, maserasyon(yumuşatma) destilasyonu, empiromatik (yıkıcı) destilasyon ve preslemedir. Presleme dışındaki bütün yöntemlerde esansiyel yağın çıkarılmasında ısı enerjisi gereklidir (Öztekin ve Soysal, 1998).

2.4. Limon otu (*Cymbopogon* spp.)

2.4.1. Limon otu bitkisinin özellikleri, yetiştirilmesi ve bileşimi

Limon otu, *Poaceae* (*Gramineae*) familyasına ait, yaygın olarak "tatlı çimen" adıyla bilinen, latince adı *Cymbopogon* olan çok yıllık monokotiledon bir ottur. *Cymbopogon*, Asya'nın tropikal ve yarı tropik bölgelerine özgü yaklaşık 55 türden oluşan bir cinstir.

Güney ve Orta Amerika, Afrika ve diğer tropikal ülkelerde de yetiştirilmektedir. Limon otu, yoğun kümeler halinde büyür. 1,8 m (6 ft) yüksekliğinde ve 1,2 m (4 ft) genişliğindedir. 1,3–2,5 cm (0,5–1,0 inç) genişliğinde kayış benzeri yaprakları olan kısa rizomlara sahiptir. Limon otu bitkileri tipik olarak çiçek veya çiçekli salkım üretmez (Jagadish Chandra, 1975; Reij ve ark., 2015; Abdulazeez ve ark., 2016) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Limon otu (*Cymbopogon spp.*) bitkisi

Limon otu, içeriğindeki yağlar, proteinler, lifler ve mineraller gibi besinler dışında ayrıca alkaloidler, flavonoidler, fenoller, saponinler, tanenler ve terpenoidler olarak gruplandırılabilen çeşitli biyoaktif bileşikler içerir (Reij ve ark., 2015). Limon otu A vitamini üretiminde kullanılan doğal sitralin ana kaynağıdır. Fakat günümüzde sentetik sitral üretimi ile önemini kaybetmeye başlamıştır. Kullanım alanları ile en önemli bitkisel yağlardan biri olarak kabul edilmektedir (Attokaran, 2011).

Limon otu üretiminde tohumdan ve köklü filizlerinden yararlanılmaktadır. Tohumdan üretimde optimum koşullar, uygun sıcaklık ve nem miktarı sağlanırsa 5-6 gün içinde filizlenme gerçekleşmektedir. Fideler ise yaklaşık 60 günlükken ekime hazır hale gelmektedir. Sulanan arazilere veya yüksek yağış alan alanlara hektar başına toplam 125.000 adet bitki ekilir, düşük yağış alan bölgelerde hektar başına 60.000 adet bitki ekilmesi tavsiye edilen yoğunluktur. Bitki çok çeşitli topraklarda yetişir.

Ancak en iyi verimi pH değeri 4.3–8.4 arasında olan, iyi drene edilmiş kumlu topraklarda verir. Bitki suya kolayca ulaştığında yıl boyunca üç ile dört hasat verebilir. Derin köklenme sistemi nedeniyle susuz kurak arazi koşullarında, yağmur mevsiminde yılda bir ile iki kesim yapar ve bir sonraki yağmur mevsimine kadar hayatta kalır. Limon otunun verimi ve yağ içeriği toprak koşullarından etkilenir (Abdulazeez ve ark., 2016).

Limon otunun genellikle kullanılan 3 türü *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon pendulus* olarak tanımlanmaktadır. *Cymbopogon flexuosus*; Doğu Hint, Cochin veya Malabar otu olarak bilinir. *C. flexuosus*, yaklaşık 2 m yüksekliğinde, püsküllü, sağlam, çok yıllık bir ottur. Yapraklar doğrusal ve mızrak şeklindedir. Serbestçe çiçek açar. Biri saplı diğeri sapsız olmak üzere çiftler halinde sivri uçludur. Sapsız, kılçıklı, biseksüel bir ottur. Bu türün altında, gövdenin rengine göre iki çeşit belirlenir. Bunlar *C. flexuosus* var. *flexuosus* ve *C. flexuosus* var. *albescens*'dir. *Cymbopogon citratus*; Batı Hint veya Amerikan limon otu olarak bilinir. Kısa rizomatöz anaçlardan çıkan çok sayıda sert köklere sahip, sapsız çok yıllık bir ottur. Nadiren ekim altında çiçek açar. Yaprak dar, doğrusal, mızrak şeklindedir. Uçucu yağı %74-76 oranında sitral içerir ve alkol çözünürlüğü düşüktür. *Cymbopogon pendulus*; Jammu limon otu ve doğada beyaz saplı cüce olarak bilinir. Bitki dondayanıklısıdır ve Kuzey Hindistan'ın Himalaya bölgelerinde yetiştirilir. Uçucu yağı, yaklaşık %75-80 oranında sitral içerir ve alkolde orta çözünürlük sergiler (De Skaria ve ark., 2016).

Limon otundan elde edilen bitkisel yağ genel olarak güvenilir kabul edilir ve diğer bitkisel yağlar gibi aromatik ve tatlandırıcı bileşenler içerir. Ayrıca, antimikrobiyal özelliği nedeniyle yapılan çalışmalar ile gıda maddelerine ilave edildiğinde; gıda kalitesinde organoleptik özelliklerin korunmasına yardımcı olduğu, yiyeceklerin bozulmasında mikrobiyal aktiviteyi geciktirdiği ve böylece ekonomik kaybın azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Limon otu yağının bu özellikleri değerlendirildiğinde daha uzun raf ömrü gerektiren gıda ürünlerinin üretiminde kullanılabilmesi mümkündür. Ayrıca yapay koruyucular yerine endüstride gıda koruyucu madde olarak kullanımı önerilmektedir (Abdulazeez ve ark., 2016).

Bitkisel yağlar; çiçeklerden, bitkilerden, ağaçlardan ve çeşitli bitkisel materyal kullanılarak elde edilir. Bu yağlar karmaşık kimyasal yapıya sahiptir. Terpenler ile ilişkili olarak aldehitler, ketonlar ve alkoller ana kimyasal bileşimini oluştururlar. Bu yüzden bitkisel yağlar parfüm, sabun, kozmetik, deterjan, ve ilaç endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılırlar. Limon otu kuru ağırlık bazında %1-2 bitkisel yağ içermektedir. Bitkisel yağlar distilasyon (damıtma) yoluyla elde edilirler. Limon otu yağı üretiminde buhar ve su distilasyonu geleneksel yöntemlerdir. Ancak bu şekilde yağ elde etmek uzun sürmektedir. Son zamanlarda kullanılan Yenilikçi Mikrodalga Destekli Hidrodistilasyon yöntemi ekstraksiyon süresini azaltmakla kalmaz aynı zamanda yağ kalitesini de korur. Basınçlı nitrojen gazı kullanarak sıvı ekstraksiyon da, yeni bir tekniktir ve geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında daha kaliteli yağ verdiği görülmüştür (Reij ve ark., 2015).

Limon otunun çoğu türü ürettikleri bitkisel yağdan dolayı genellikle parfümeri, kozmetik ve farmasötik uygulamalar için kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda kağıt ve kağıt hamuru üretimi için selüloz kaynağı olarak, metal iyonlarının adsorpsiyonunda ve boyamada da başarıyla kullanılmaktadır. Kompozit üretiminde ve biyoenerjinin yanı sıra silika ve metal oksitlerin elde edilmesinde de uygulamaları vardır (Haque ve ark., 2018).

Limon otunun bitkisel yağı baharatlı, hoş bir limon aromasına sahiptir ve renk olarak sarımsı bir sıvı olarak görünür. Optik olarak aktiftir ve kırılma indeksi 1,483-1,489 ve özgül ağırlığı yaklaşık olarak 0,89'dur (Abdulazeez ve ark., 2016).

2.4.2. Gıda alanında kullanımı ve uygulanması

Sanitasyon ve mikroorganizma tespit uygulamalarında kaydedilen gelişmelere rağmen gıdaların üretiminde, depolanmasında ve dağıtımında meydana gelen kontaminasyondan kaynaklı sorunlar yaşanmaktadır. Gıdalar üzerinde gelişen mikroorganizmalar gıdalarda bozulmalara sebep olarak insan sağlığına zararlı toksin üretir ve gıda kaynaklı hastalıklara sebep olur; ayrıca ekonomik kayıplar meydana getirir. Gıdalarda gelişen küfler aflatoksin ve sitrinin gibi mikotoksinler üreterek tat-

renk kaybına ve protein yıkımına neden olur. Daha önce limon otunda yapılan çalışmalarda elde edilen bitkisel yağın mantar ve bakteri gelişimine herhangi bir mikrobiyal dirençle karşılaşmadan antifungal ve antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir (Abdulazeez ve ark., 2016).

Mikroorganizmaların zararlı etkilerinin sentetik gıda koruyucuları kullanılarak engellenmesi durumunda zamanla bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri mikroorganizmaların zamanla direnç kazanması iken diğeri gıda etiği ile ilgilidir. Son yıllarda sentetik koruyucuların pahalı olması ve insan sağlığına etkisinden dolayı doğala yönelme eğilimiyle birlikte sentetik yerine bitkisel koruyucular önem kazanmıştır (Abdulazeez ve ark., 2016).

2.4.3. Limon otu yağı içeriği, özellikleri ve minimum inhibitör konsantrasyonu

Limon otu yağı çeşitli terpen ve terpenoid bileşiklerden oluşmaktadır. Ana bileşeni sıklık ve asıklık monoterpenlerdir. Monoterpenler ise geranil difosfattan üretilmektedir (Mukarram ve ark., 2022). Limon otu yağı genç ve hızlı büyüyen limon otu bitkisinin yapraklarında ve çiçeğinde üretilir. Özellikle yapraklardaki proksimal damar demeti arasındaki fotosentetik olmayan parankimal yağ hücrelerinde depolanır (Lewinsohn ve ark., 1998; Ganjewala ve Luthra, 2010). Limon otu bitkisinin kuru maddede yaklaşık %1-2'si yağdır (Carlson ve ark., 2001; Ranade, 2015). Limon otu yağının bileşimini neralin- β -sitral (%24,6), geranial- α -sitral (%12,73), geranyl asetat (%12,44), sitral (%18,7), limonen (%7,55), isogeranial, geraniol, sitronellal, sitronellol, germacrene D ve elamel oluşturur (Plata-Rueeda ve ark., 2020; Mukarram ve ark., 2021; Abdulazeez ve ark., 2016). Sitral, geranial (α -sitral) ve neral (β -sitral)'in doğal bir kombinasyonudur ve limon otu yağı için kaliteyi belirleyici kriterlerdir (Pengelly, 2004; Muturi ve ark., 2020).

Limon otu yağının antimikrobiyal aktivitesi büyük ölçüde sitrale bağlıdır (Sharma ve ark., 2005; Adukwu ve ark., 2016). Limon otu yağı çift katlı lipid tabakasından oluşan sitoplazmik membranlarını parçalamak suretiyle bakterileri inhibe eder. Bitkisel yağların antibakteriyel aktivitesi; bakterilerin çift katlı fosfolipid katmanını

parçalaması sonucu hücresel bileşenlerde, enzimlerde ve genetik materyalinde yıkım meydana getirmesiyle oluşur (Kotzekidou ve ark., 2008). Limon otu yağı hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkilidir fakat farklı hücre duvar yapıları nedeniyle etkisi aynı değildir (Onawunmi, 1984; Kotzekidou ve ark., 2008; Naik ve ark., 2010; Vazirian ve ark., 2012).

Limon otu yağının bakteriyostatik ve bakterisidal etkisi etki ettiği bakteriye ve limon otu yağının uygulanan konsantrasyonuna bağlıdır (Hassoun ve Çoban, 2017; Dewi ve ark., 2021). Limon otu yağının kullanımı ile ilgili sınırlama getirilmemiştir fakat etken maddesi olan sitralin Uluslararası Koku Birliği (IFRA) yönergelerine göre belirli kısıtlaması vardır (Ranade, 2004). Limon otu yağının etkinliği bitkinin hangi gelişim aşamasında hasat edildiği, çevresel faktörleri, sıcaklık, ekstraksiyon yöntemi gibi morfolojik ve fizyolojik faktörlere bağlıdır (Swamy ve ark., 2016).

Limon otu yağının antifungal ve antibakteriyel özelliklerinde yapılan çalışmalarda fesleğen (*Ocimum basilicum*), kekik (*Origanum vulgare*), tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) ve defne (*Laurus nobilis*) gibi diğer bitkisel yağlara göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Silveira ve ark., 2012). Ayrıca Naik ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmada limon otu yağının gıda güvenliğini sağlamak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanımının uygun olabileceği görülmüştür (Abdulazeez ve ark., 2016).

Limon otu yağı gibi doğal aroma kompleksleri düşük konsantrasyonlarda tat veya koku alma reseptörleri tarafından kolayca anlaşılabilir ve bu seviyelerde mikrobiyal vb. açıdan etkilerini gösterirler. Ancak daha yüksek seviyelerde bunların moleküller ve metabolitleri toksik hale gelebilir. Bu nedenle, doğal aroma vericiler kullanılırken kimyasal bileşime dayalı olarak güvenliği değerlendirilmelidir (Smith ve ark., 2005). Antimikrobiyal, antifungal ve organoleptik vb. açılardan yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde birçok mikroorganizmaya karşı limon otu yağının gıdanın biyolojik olarak korunması ve depolanması için iyi bir aday olduğu sonucu çıkarılabilir (Abdulazeez ve ark., 2016).

Limon otu yağının hedef mikroorganizmalara karşı minumum inhibitör konsantrasyonunu belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *E. coli*'ye karşı %0,06-0,12 (Naik ve ark., 2010); *Acinobacter baumannii*'ye karşı %0,25 (Adukwu ve ark., 2016) ilavesi minumum inhibitör konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Bassolé ve ark., (2011) limon otu yağının 10 mg/mL ilavesinde *E. coli*'ye; 8,3 mg/mL ilavesinde ise *L. monocytogenes*'e karşı minimum inhibitör etki gösterdiğini rapor etmiştir. Limon otu yağı gibi fitokimyasal içerikli esansiyel yağlar limon otu yağı gibi %0,05-0,1 aralığında gıdalara ilave edildiğinde patojenlere karşı etkili olmaktadır ve *E. coli* O 157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etki göstermektedir (Taj Karimi ve İbrahim 2012).

Friedman ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada limon otu yağının elma suyundaki antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Bütün denemelerde askorbik asit içeren, berrak yapıdaki elma suyundaki limon otu yağının inhibitör etkisinin askorbik asit içermeyen bulanık yapıdaki elma suyundan daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bunun nedenini antimikrobiyal etken maddenin bulanık elma suyunda parçacıkların yüzeyine yapışması ve bu yüzden etkinliğinin azalması olarak açıklamışlardır.

Limon otu yağının elma suyundan farklı olarak ananas suyundaki antimikrobiyal etkisini gözlemlemek için yapılan çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonrası hacmen %0,1 değerinde limon otu yağı içeren ananas suyunda *E. coli* gelişiminin %88,06 oranında engellendiği sonucuna ulaşılmıştır. Hacmen %0,2 limon otu yağı içeren ananas suyunda bu oran %90,57 iken, %0,3 konsantrasyon değerinde %93,38'dir. Bu konsantrasyon değerleri için inkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında ise bakteri popülasyonlarında meydana gelen azalma sırası ile %79; %80,24 ve %86,49 olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeni limon otu yağında bulunan ve antimikrobiyal özellik gösteren terpenoidlerin uçucu olması dolayısıyla zaman geçtikçe bu özelliklerini kaybetmesidir (Celina ve ark., 2019).

Limon otu yağı ve içerisinde bulunan sitral bileşeninin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan kıyaslamada, minimal inhibisyon konsantrasyon değeri limon otu yağı için %0,25-%1 değer aralığındayken sitral için %0,06- %0,25 değerleri arasında

bulunmuştur. Bu değerler sitralin bileşen olarak kullanıldığında, limon otu yağının bütün olarak kullanılmasından daha etkin bir şekilde antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmektedir (Adukwu ve ark., 2016).

Massilia ve ark., (2006) yaptıkları çalışmalarda limon otu yağının elma ve armut suyundaki antimikrobiyal etkisini ortaya çıkarmışlardır. Başlangıçta $6,2 \times 10^2$ kob/mL olan *E. coli* mikrobiyal yükü, 3 µL/mL konsantrasyonunda limon otu yağı eklenmesi durumunda tamamiyle inhibe olmuştur. Limon otu yağının bu bakımdan palmarosa bitkisinden daha etkili bir antimikrobiyal özellik taşıdığı yapılan çalışmada tespit edilmiştir. Palmarosa yağının aynı antimikrobiyal etkiyi gösterebilmesi için eklenmesi gereken konsantrasyonu 10 µL/mL olarak bulunmuştur (Massilia ve ark., 2006).

Gilling ve ark., (2019) çalışmalarında limon otu yağının *E. coli* inhibisyonu üzerindeki etkinliğini bir kez daha tespit etmişlerdir. Besiyerlerine eklenmiş olan %0,05 ve %0,3 konsantrasyonundaki limon otu yağının 5 dak. uygulanması sonucunda *E. coli* sayısında sırasıyla 0,55 ve 4,37 log azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Gilling ve ark., 2019).

Limon otu yağı sadece *E. coli* üzerinde değil, diğer bakteriler üzerinde de antimikrobiyal etki göstermektedir. Yapılan bir çalışmada *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonlarında limon otu yağı ilave edilmiştir. Kullanılan limon otu yağının konsantrasyonu arttıkça antibakteriyal etkinin de arttığı gözlemlenmiştir. *E. coli* için minimum bakterisidal konsantrasyon değeri %0,12 olarak bulunmuş, en düşük değer ise %0,06 ile *S. aureus* üzerinde tespit edilmiştir. Yapılan deneyde limon otu yağının etki göstermediği tek bakteri *P. aeruginosa* olarak bulunmuştur (Naik ve ark., 2010).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan limon otu yağı (*Cymbopogon citratus*) Botalife-Manolya Doğal ve Aromatik Ürünler Gıda Sanayi ve Ticaret Limited Şirketinden temin edilmiştir. Elma suyu olarak ise yerel bir marketten temin edilen, koruyucu içermeyen ve %100 elma suyundan oluşan şeker ilavesiz ürün kullanılmıştır.

Limon otu yağının antimikrobiyel aktivitesini belirlemek için kullanılan kültürler *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* (ATCC 7644) saf kültürleri Sakarya Üniversitesi-Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Saf kültür %15 (v/v) gliserol içeren Tryptic Soy Broth (Merck, Darmstadt, Germany) besiyeri içerisinde -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan araç ve gereçler

Bu çalışmada, soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320R), inkübatör (Mikrotest MIN-120 D) , çalkalamalı su banyosu (WiseBath WSB-30), vortex (IKA MS 3 Basic), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA C- MAG-HS7), hassas terazi (Radwag AS220 R2), pH metre (Mettler Toledo Steven Compact S210), distile su cihazı (Nüve ND8), otoklav (WiseClave WAC-80), kar buz makinesi (Scotsman AF80AS), mikropipet (Eppendorf Research Plus) kullanılmıştır.

3.2.2. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inokulumlarının hazırlanması

E. coli O157:H7 ve *L. monocytogenes* kültürleri, içerisinde 10 ml'lik %0,6 maya ekstraktı ilave edilmiş Tryptic Soy Broth (TSBYE) (Merck, Darmstadt, Almanya) besiyeri bulunan deney tüpüne 100 µL aktarılarak 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı işlem ikinci seferde ilk aktifleştirmesi yapılan kültürden 10 ml'lik TSBYE besiyeri bulunan deney tüpüne 100 µL aktarılarak 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılarak tekrarlanmıştır.

İnkübasyon işleminden sonra aktifleştirilmiş *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* kültürleri santrifüj tüpüne aktararak 4°C'de 5000 devir/dak. hız ile 10 dak. santrifüjledikten sonra supernatant uzaklaştırılmıştır. Tüp içerisinde geriye kalan pelet üzerine 10 mL steril peptonlu su (%0,1 pepton; Merck, Darmstadt, Germany; PW) ilave edilerek vortex ile karıştırılmış ve tekrar aynı koşullarda santrifüjlenmiştir. Steril peptonlu su ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edilerek besiyeri kalıntıları tamamen uzaklaştırılmıştır. Son işlem olarak peletin üzerine ilave edilen steril peptonlu su ile orijinal hacmine (10 mL) tamamlanmış ve inokulum kullanıma hazır hale getirilmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* inokulumu ısıtma işlem öncesi hazırlanmış ve aynı gün içerisinde kullanılmıştır.

3.2.3. Elma suyu örneklerinin hazırlanması ve inokülasyonu

Denemede kullanılan elma suyu 200 ml'lik orijinal ambalajlarında piyasadan temin edilmiş ve oda sıcaklığında ambalajı deforme olmayacak şekilde muhafaza edilmiştir.

Her örnekleme zamanı için ayrı bir tüp olacak şekilde yeterli sayıda tüpe 52er mL elma suyu aktarılmış ve tüpler 3 gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki elma suyuna %0,1 (1µL/mL) LOY, ikinci gruptaki elma suyuna %0,2 (2µL/mL) LOY olacak şekilde ilave edilmiş ve homojen dağılım sağlamak için karıştırılmıştır. Üçüncü gruptaki tüpler ise kontrol grubu olup LOY ilave edilmemiştir. Daha sonra 3.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan *E. coli* O157:H7 inokulumundan 100'er µL alınarak tüplere aktarılmıştır.

Aynı işlem *L. monocytogenes* için de tekrar edilmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* elma suyu örneklerine 7-8 log kob/mL düzeyinde inoküle edilmiştir.

3.2.4. Isıl işlem

E. coli O157:H7 ve *L. monocytogenes* inoküle edilmiş elma suyu örneklerine dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60; 62,5°C) ısıtıl işlem uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan çalkalamalı su banyosu sabit sıcaklığa geldikten sonra yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan örnekler aralıklı olarak deney tüpü standına yerleştirilerek cihaz içine konulmuştur. Toplam ısıtıl işlem süresi sıcaklığa bağlı olup; 55°C'de 60 dak, 57,5°C'de 12 dak, 60°C'de 7 dak ve 62,5°C'de 4 dak olarak uygulanmıştır. *E. coli* O157:H7 örnek grubundan 55°C'de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık sürelerde; 57,5°C'de 0, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12. dak.'lık sürelerde 60°C'de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. dakikalık sürelerde ve 62,5°C'de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 saniyelik sürelerde örnekleme yapılmıştır. *L. monocytogenes* örnek grubundan 55°C'de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık sürelerde; 57,5°C'de 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. dakikalık sürelerde 60°C'de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. dakikalık sürelerde ve 62,5°C'de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 saniyelik sürelerde örnekleme yapılmıştır Her bir grup için en az sekiz örnekleme yapılması planlanmıştır. Belirtilen süre kadar ısıtıl işleme tabi tutulan örnek hızla soğutulmak amacıyla süre sonunda hemen içerisinde buz ve su karışımı bulunan kaba alınmıştır.

3.2.5. *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* sayımı

Soğutulan örneklerin fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha önceden belirlenen uygun dilüsyonlardan TSA besiyerine 100 µL ekim yapılarak drigalski spatülü ile yayılmıştır. Petri kutuları 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda TSA'da oluşan koloniler sayılmış, sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

Elma suyunda hammaddeden gelen herhangi bir kontaminasyon olup olmadığının tespiti için inoküle edilmemiş meyve suyundan PALCAM ve SMAC (Merck,

Darmstadt, Almanya) agar besiyerlerine direkt ekim yapılmış 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.6. Membranı zarar görmüş hücre sayısının belirlenmesi

Çalışmanın ikinci kısmında Bölüm 3.2.2. ve Bölüm 3.2.3.'de anlatıldığı şekilde tekrar aktifleştirilmesi yapılan mikroorganizmalar elma suyuna inoküle edilmiştir. 3.2.4. Isıl işlem başlığında antadıldığı gibi *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* örneklerine ısıtma işlemi dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60; 62,5°C) uygulanmıştır. Toplam ısıtma işlem süresi sıcaklığa bağlı olup *E. coli* O157:H7 için 55°C'de 0, 10, 30. dak., 57,5°C'de 0, 4, 8. dak., 60°C'de 0, 3, 6. dak. ve 62,5°C'de 0; 1,5 ve 3. dak.'lar için örnekleme yapılmıştır. *L. monocytogenes*'in ise 55°C'de 0, 10, 30. dak., 57,5°C'de 0, 3, 6. dak., 60°C'de 0, 3, 6. dak. ve 62,5°C'de 0, 1, 2. dak. için örnekleme yapılmıştır

E. coli O157:H7 ve *L. monocytogenes* gruplarındaki membranı zarar görmüş hücre sayısının tespiti için %3 sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içeren TSA besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak membranı zarar görmemiş hücre sayısı ise TSA besiyeri kullanılarak tespit edilmiştir. Sublethal hasar ve lethal hasar arasındaki zaman farkına dikkat edilerek 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda TSA ve TSA+%3 NaCl besiyerlerinde oluşan tipik koloniler *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* olarak sayılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir. Membranı zarar görmüş hücrelerin sayısı besiyerlerinde inkübasyona bırakılan hücreler arasındaki farktan tespit edilmiştir (Espina ve ark., 2016)

3.2.7. Log-Lineer ve Weibull inaktivasyon modellerine uyumlama ve D değerinin hesaplanması

Çalışma sonucunda tespit edilen *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* sayıları her bir sıcaklık değeri için logaritmik birime çevrilmiş ve Microsoft Excel programında zamana karşı tablolara aktarılmıştır. Canlı mikroorganizma sayısının zamana bağlı grafiği çizilerek, hayatta kalma eğrisi oluşturulmuştur. DeneySEL veriler GlnaFit (Geeraerd ve ark., 2005) yazılımı kullanılarak Log-Lineer ve Weibull inaktivasyon

modellerine uyumlanmıştır. Log-Lineer modele (Bigelow ve Esty, 1920) ait eşitlik aşağıda verilmiştir (Denklem 3.1).

$$\log_{10} (N) = \log_{10} (N_0) - t/D \log_{10} (N_0) - k_{max} \times t/\ln(10) \quad (3.1)$$

Formülde N , t zamandaki hücre sayısı (kob/mL); N_0 , başlangıç hücre sayısı (kob/mL), k_{max} , maksimum inaktivasyon hızıdır (1/sa). En az beş veri içeren inaktivasyon eğrileri D değeri hesaplamada kullanılmış olup, belirleme katsayısı (r^2) 0,91 veya daha büyüktür. D değeri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Denklem 3.2).

$$D \text{ değeri} = 2,303/k_{max} \quad (3.2)$$

Çalışmada kullanılan diğer model olan Weibull (Mafart ve ark., 2002) ait eşitlik aşağıda verilmiştir (Denklem 3.3).

$$\log N_{(t)} = \log N_0 (t/\delta)^\rho \quad (3.3)$$

$N_{(t)}$ belirli bir süre sonrasında hayatta kalan hücre sayısı, N_0 başlangıç hücre sayısı, δ bir log azalma için gerekli süre, ρ eğrinin şekil parametresi olup $\rho < 1$ konveks, $\rho > 1$ konkav, $\rho = 1$ doğrusaldır (Mafart ve ark., 2002). Bu modellerin doğruluğu RMSE kullanılarak ölçülmüştür. Beş log azalış için gereken zaman ikinci dereceden bir denklem kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.8. z değerlerinin hesaplanması

Her bir örnek grubundaki sıcaklık değerleri için elde edilen D değerlerinin logaritması Microsoft Excel programında sıcaklık değerine karşı grafiğe aktarılmış ve eğrinin eğiminden aşağıdaki formülle z değeri hesaplanmıştır.

Z değerleri lineer regresyon kullanılarak bulunmuştur (Denklem 3.4)

$$z = -1/\text{eğim} \quad (3.4)$$

3.2.9. Tahmini D değerlerinin hesaplanması

Farklı sıcaklıktaki D değerleri daha önceden 60°C için hesaplanmış olan D değeri baz alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Denklem 3.5).

$$D_x = \log^{-1} [\log D_y - ((t_x - t_y)/z)] \text{ (Bolton ve ark. 2003)} \quad (3.5)$$

D_x , x°C için hesaplanan D değeri (tahmin edilen D değeri); D_y , y°C için deneysel veriler kullanılarak hesaplanmış D değeri; t_y , deneysel verilerle D değerinin hesaplandığı sıcaklık derecesi; t_x tahmini D değeri hesaplanacak sıcaklık derecesi; z ise z değeridir.

3.2.10. pH ölçümü

pH tayini için elektrometrik metod kullanılmıştır (Mettler Toledo Steven Compact S210). LOY ilave edilmeden önce ve ilave edildikten sonra (%0,1 ve 0,2) elma suyu örneklerinin pH değeri ölçülmüştür.

3.2.11. İstatistikî analizler

Çalışma iki tekerrürlü yürütülmüştür. Mikrobiyolojik analizlerin varyansı SPSS programı (IBM SPSS Statistics for Windows versiyon 24.0) kullanılarak bulunmuştur. Duncan çoklu karşılaştırma testi gruplar arasındaki farkı bulmak için kullanılmıştır ($p < 0,05$).

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Elma suyunun pH'ının belirlenmesi

Araştırmada kullanılan elma suyuna farklı konsantrasyonlarda (%0,1 ve %0,2) ilave edilen limon otu yağının (LOY) elma suyunun pH değeri üzerine etkisi belirlenmek istenilmiştir. Kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY içeren örneklerin pH değeri ölçülerek istatistiki farkın olup olmadığı incelenmiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Elma suyuna LOY ilave edilmesi ile ölçülen pH değeri

LOY (%)	Konsantrasyonu	pH
0		3,74±0,18 ^a
0,1		3,78±0,21 ^a
0,2		3,81±0,15 ^a

(a): Aynı sütunda aynı harfle gösterilen pH değerleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli değildir ($p>0,05$; $n=5$).

Yapılan analiz sonucunda, LOY'nın elma suyunda konsantrasyonuna göre pH değeri ölçümü ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Türkiye'de üretilen elma sularının pH değerlerinin 3,49-4,01 arasında olduğu belirlenmiştir (Tüfekci ve Fenercioğlu, 2010; Ağçam ve ark., 2018). LOY'nın ise pH değeri 4,1-5,1 arasındadır (Ling ve ark., 2018). Leite ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada elma suyuna yakın asiditeye sahip pH değeri 3,92 olan ananas suyuna 1,25 ve 2,5 $\mu\text{L/mL}$ LOY ilave edilmesiyle pH değerinin sırasıyla 3,88; 3,82 olduğunu belirlemiş ve ananas suyuna LOY ilavesinin pH değeri için istatistiki olarak farklılık meydana getirmediği tespit etmiştir ($p>0,05$). Bu çalışmada olduğu gibi pH değeri 3,9 olan meyve sularına LOY ilavesi pH değeri üzerine istatistiki olarak anlamlı farklılık yaratmamıştır.

4.2. Elma suyundan SMAC ve PALCAM agar besiyerlerine ekim yapılması

Araştırmada kullanılan hammadde olan elma suyu kaynaklı herhangi bir kontaminasyon olup olmayacağını belirlenmesi amacıyla *E. coli* O57:H7 için SMAC agar besiyerine ve *L. monocytogenes* için PALCAM agar besiyerine doğrudan ekim yapılmıştır. Her iki besiyeri de hedef mikroorganizmalar için seçicidir. 37°C’de 48 saat inkübasyon sonucunda besiyerlerinde koloni gelişimi olmamıştır. Bu durumda elma suyu kaynaklı kontaminasyon olmadığı tespit edilmiştir.

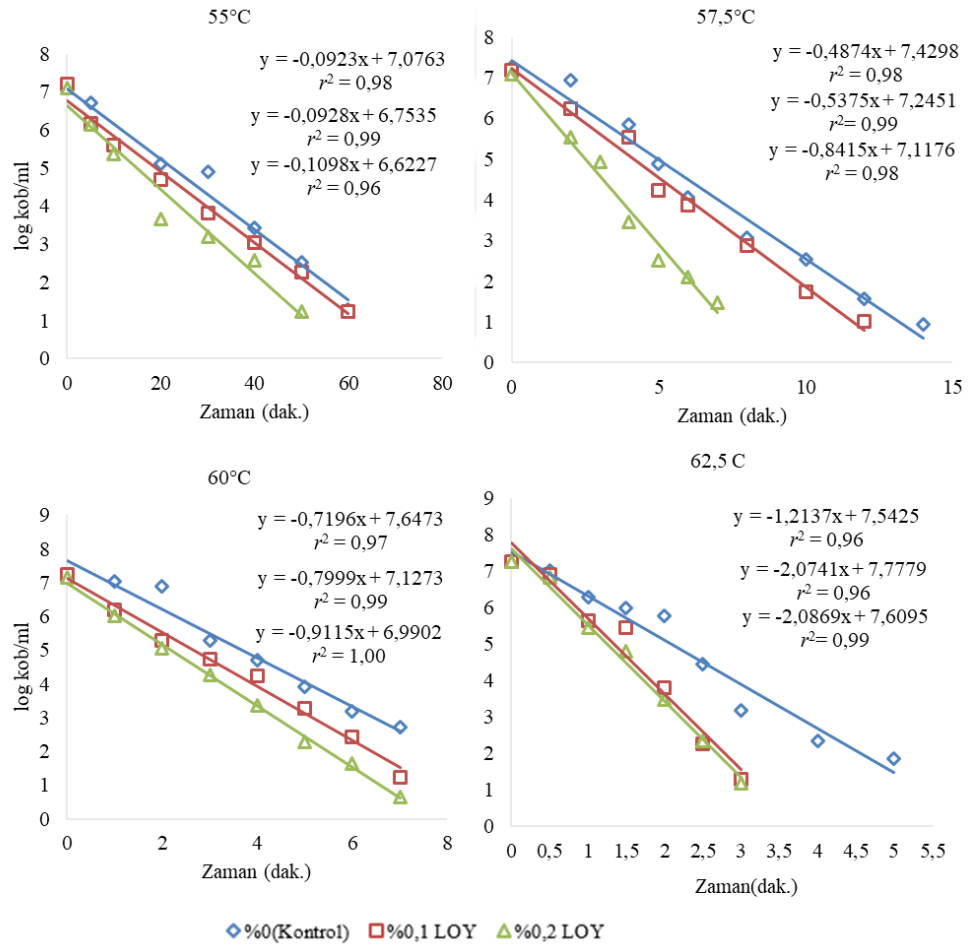
4.3. *E. coli* O157:H7’ye Ait Araştırma Sonuçları

4.3.1. Termal inaktivasyon denemelerine ait sonuçlar

Çalışmada kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY içeren elma suyu örneklerine 7-8 log kob/mL düzeyinde *E. coli* O157:H7 ilave edilmiş 55; 57,5; 60 ve 62,5°C’de ısıtma işlemi uygulanmış ve patojen mikroorganizmanın sayısında zamana bağlı meydana gelen azalma belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7 ’nin başlangıçtaki sayısında en az 5 log birim azalma olacak kadar süre ısıtma işlemi uygulanmıştır ve bu sıcaklıklardaki *E. coli* O157:H7 popülasyonunun sayısındaki değişim Şekil 4.1.’de gösterilmiştir.

E. coli O157:H7’nin sayısında en az 5 log birimi azalma olması için uygulanan ısıtma işlemi süresi; 55°C’de %0,1 LOY ilave edilen örneğe 49 dak., %0,2 LOY ilave edilen örneğe 41 dak., kontrol (%0 LOY) örneklerinde ise 53 dakikadır. 57,5°C’de %0,1 LOY ilave edilen örneğe 9,5 dak., %0,2 LOY ilave edilen örneğe 6 dak. kontrol örneklerine ise 11 dak. ısıtma işlemi uygulanmıştır. 60°C’de %0,1 LOY ilave edilen örneğe 6 dak., %0,2 limon otu yağı ilave edilen örneğe 5 dak., kontrol örneklerine ise 7,5 dak. ısıtma işlemi uygulanmıştır. Diğer yandan 62,5°C’de kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY içeren elma suyu örneklerine sırasıyla 4,40; 2,68 ve 2,59 dak. ısıtma işlemi uygulanmıştır. Araştırma sonuçları incelendiğinde 55°C’de elma suyuna %0,1 ve %0,2 LOY ilavesi *E. coli* O157:H7’ye karşı uygulanması gereken ısıtma işlemi süresini sırasıyla %7,54; %22,64 oranında azaltmıştır. 57,5°C’de bu durum %0,1 ve %0,2 LOY için %13,63 ve %45,45 oranında gerçekleşmiştir. 60°C’de ise %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmesiyle

ısıtılma süresinde %20,60 ve %33,34 oranında azalış meydana gelmiştir. Son olarak 62,5°C’de uygulanması gereken ısıtılma süresi %0,1 ve %0,2 LOY eklenmesiyle %39,10 ve %41,13 oranında azalmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (%0,1 ve %0,2) LOY ilave edilmesi ile uygulanması gereken ısıtılma süresinde azalma olduğu sonucuna ulaşılmış ve LOY’nın konsantrasyonu arttığında uygulanması gereken ısıtılma süresinin daha çok kısaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre *E. coli* O157:H7’nin sayısında 5 log birimi azalma olması için uygulanması gereken ısıtılma süresindeki yüzdelik değişim en çok 57,5°C’de %0,2 LOY ilave edilmesiyle %45,45 oranında tespit edilmiştir (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Dört farklı sıcaklıktaki (55°C; 57,5°C; 60°C; 62,5°C) ısıtılma uygulanan elma suundaki *E. coli* O157:H7 popülasyonunun zamana bağlı değişimi

Yapılan literatür incelemesinde sitral ilavesi ve ılımlı ısıtılmanın gıdalarda *E. coli* O157:H7 inaktivasyonuna sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Ait-Ouazzou ve

ark., 2013; Kim ve Kang, 2017; Pagán ve ark., 2018). LOY'nın ise en önemli bileşenlerinden birisi sitraltır. Gayan ve ark. (2020) Hindistan cevizi suyunda *E. coli* O157:H7'ye 53°C'de 10 dak. ısıtma işlemi uygulandıktan sonra *E. coli* O157:H7'nin sayısının başlangıca göre 1,4 log azaldığını hesaplamış ve aynı işlemi 200 µL/L sitral ilave edilerek tekrarladığında aynı sürede *E. coli* O157:H7'nin sayısının 5 log'dan fazla azaldığı belirlemiştir. Hindistan cevizi suyunda sitral ilavesi ile yaptıkları çalışmada *E. coli* O17:H7 'nin 5 log azalması için bu sinerjistik etkiyi en çok 57°C'de 10 dak. ısıtma işlemi uygulanmasında olduğunu rapor etmiştir. Gabriel (2015), elma suyunda *E. coli* O157:H7 sayısının 5 log azalma için uygulanması gereken ısıtma işlem sürelerini 45, 50 ve 52°C'de 481,5; 103,6 ve 45,6 dak. belirlemiştir, Sıcaklık 55 ve 60°C'ye artırıldığında ise 22,4 ve 10,54 dak. hesaplamıştır. *E. coli* O17:H7 popülasyonunun azalması için 55-60°C arasında ısıtma işlem uygulamasının daha düşük sıcaklık değerlerine göre sıcaklık değeri seçimi ve ısıtma işlem süresi kombinasyonunda daha başarılı sonuç verdiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada 55°C'de *E. coli* O157:H7'nin sayısının 5 log azalması için %0,1 ve %0,2 LOY varlığında uygulanması gereken ısıtma işlem süresi 49 ve 41 dak. hesaplanmış, uygulanan ısıtma işlem sıcaklığı 57,5°C'ye çıkarıldığında ise bu süre LOY ilavesi için 9,5 (%0,1 LOY) ve 6. dak. (%0,2 LOY)'ya düşmüştür. Sıcaklığın artırılması ile uygulanması gereken ısıtma işlem süresi %80'in üzerinde azalmıştır.

Knight ve McKellar (2007) pH 4,5 olan elma sırasında yaptıkları çalışmada tarçın ve karanfil yağlarının etkisini araştırmış *E. coli* O157:H7'nin sayısında 5 log azalma için 54°C'de elma şırasına 36,7 dak. ısıtma işlem uygulanması gerekirken, %0,01 tarçın yağı ilave edildiğinde 22,6 dak. ve %0,01 karanfil yağı ilave edildiğinde 19,9 dak. ısıtma işlem uygulanması gerektiğini tespit etmiştir. Espina ve ark., (2014) pH 3,7 olan ticari portakal suyunda *E. coli* O157:H7 varlığında portakal yağı ve turuncuğil kabuğunun esas maddesi olan limonenin etkisini araştırmış, ticari portakal suyunda 45,40 dak. ısıtma işlem uygulanması gerekirken 200 ppm limonen ilavesi ile 11,78 dak., 200 ppm portakal yağı ilavesi ile süresinin 19,19 dak. ısıtma işlem uygulanması gerektiğini hesaplamış ve esansiyel yağ ve etken madde ilavesinin *E. coli* O157:H7 popülasyonundaki 5 log azalma için uygulanması gereken ısıtma işlem süresini düşürdüğünü rapor etmiştir. Espina ve ark., (2014) aynı koşullarda taze portakal

suyuna 60°C’de ısıtma işlemi uyguladığında sırasıyla kontrol, 100 ppm limonen ve 100 ppm portakal yağı içeren örneklerde *E. coli* O157:H7 canlı popülasyonunun 5 log azalması için gerekli süreyi sırasıyla 3,89; 2,92 ve 2,83 dak. belirlemiştir. Limonen uygulanması gereken ısıtma işlem süresini %24,93 azaltırken; portakal yağı ilavesi %27,24 kısaltmıştır. Bu çalışmada ise kontrol ve %0,2 LOY ilavesi için 60°C’de hesaplanan sonuçlar 7,5 ve 5 dak. şeklindedir ve %0,2 LOY ilavesi %33,33 oranında kısaltmıştır. Her iki çalışmada da ortama esansiyel yağ ilavesinin uygulanması gereken ısıtma işlem süresinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Ilımlı ısıtma işlem uygulamalarının esansiyel yağların kimyasal etkisi ile kombinasyonunda *E. coli* O157:H7’ye karşı daha kuvvetli bir etkisi olduğu görülmektedir (Venkitanarayanan ve ark. 1999).

İyi üretim uygulamaları ile üretilen elma sularında genellikle patojen mikroorganizma sayısı 10^5 kob/mL’den azdır (Mazzotta, 2001). Fakat bütün meyve suları bu şekilde üretilmemektedir. Meyve suyundaki en dirençli patojen mikroorganizma sayısının 5 log azalması için uygun ısıtma işlem ve sürenin seçilmesi ürünün kalite kriterini etkilemektedir. Bu çalışmada daha düşük sıcaklıklarda LOY ile ılımlı ısıtma işlem uygulandığında ısıtma işlem süresinin kısaldığı belirlenmiştir. Ayrıca esansiyel yağların ılımlı ısıtma işlem ile kombine edilmesi mikroorganizmaların ısıtma direncini de kırdığı için meyve suyu üretiminde uygulanabilir yöntem olarak değerlendirilebilir. .

4.3.2. *E. coli* O157:H7’nin inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

Çalışmada dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60 ve 62,5°C) örnekleme yapılarak belirlenen canlı kalan hücre sayısı log birime çevrilerek her bir tekrür için GlnaFiT (MS Excel, GlnaFiT version 1.6) programı kullanılarak hesaplama yapılmıştır (Geeraerd ve ark., 2005). GlnaFit programında Log-lineer (Bigelow ve Easty, 1920) ve Weibull (Mafart ve ark., 2002) modele uyumlanarak D değeri hesaplanmıştır. “D değeri” canlı organizma sayısının, sabit bir sıcaklıkta %90’ının azalma süresi olarak tanımlanmaktadır. Bigelow modeline göre sabit sıcaklık altında mikrobiyal yoğunluk ile ısıtma işlem süresi arasında log-lineer ilişki meydana gelir (Bigelow, 1921). Bigelow

ve Easty, (1920) geleneksel log-lineer yöntemi modifiye ederek basit doğrusal eğri ile D değerini hesaplamıştır. Fakat mikroorganizmalara ısı işlem uygulanması durumunda Mafart ve ark., (2002) bakterilerin hayatta kalma eğrilerini inceleyerek bunların hücrelerin termal stresine göre konkav ve konveks dağılım gösterdiğini belirlemiştir. Bunu için Log-Lineer modelde bazı değişiklikler yaparak yeni bir model elde etmiştir. Bu yeni model ile bakterilerin desimal azalmasından elde edilen veriler ile ısı işlem uygulamaları daha iyi karakterize edilmiştir. Weibull model termal inaktivasyonun etkisinin olduğu istatistik model olduğu için Log-Lineer modele göre daha esnek bir modeldir (Mafart ve ark., 2002; van Boekel, 2002).

Çalışmada dört farklı sıcaklıkta elde edilen *E. coli* O157:H7'nin zamana bağlı verileri GlnaFit programında Log-lineer (Bigelow ve Easty, 1920) modele göre uyumlanarak 4 Desimal Azalma, r^2 ve Tahmin Hatalarının Standart Sapması (RMSE) değerleri ile Weibull (Mafart ve ark., 2002) modele uyumlanarak 4 Desimal Azalma, r^2 , RMSE değerleri ile δ ve ρ parametreleri elde edilmiştir. GlnaFit programında alınan verilerden; r^2 regresyon katsayısı olup modelin performansını göstermek için kullanılır ve 1 değerine ne kadar yakınsa regresyon modelinin o kadar uyumlu olduğu sonucunu verir. RMSE ise hataların regresyon eğrisinin veri noktalarından ne kadar uzak olduğunu gösterir ve 0'dan ∞ 'a kadar değişebilir. RMSE değeri 0'a ne kadar yakınsa modeldeki hata o kadar azdır ve veriler modele iyi uyumlanmaktadır. ρ ise şekil parametresidir ve eğri $\rho < 1$ ise konveks, $\rho > 1$ ise konkav ve $\rho = 1$ ise lineer yapıdadır. Bakterinin ısı işleme karşı direncini gösterir, sıcaklığa bağlı değişkendir. $\rho < 1$ değeri canlı kalan hücrelerin uygulanan strese uyum sağlama yeteneğine sahip olduğunu yani ortama daha az direnç gösterdiğini; $\rho > 1$ ise hücrelerin ilk anda ortama daha fazla dirençli olduğunu fakat ısı işlemin süresi arttıkça kalan hücrelerin giderek daha fazla hasar gördüğünü ve hayatta kalmasının zor olduğunu belirtir. $\rho = 1$ de ise hücrelerin ölümü zamana bağlı değildir yani ısı işlem her ne kadar uzun sürerse sürsün eşit oranda hasar görür ve hücrelerin inaktivasyonu maruz kaldıkları stresten iyileşmelerine bağlıdır. δ ölçek parametresidir, canlı popülasyonunun ilk on kat azalması için geçen süreyi ifade eder. Mikrobiyal popülasyonun ilk log (kob) sayısının inaktive edildiği, ısı işlem süresinin uygulanması gereken zamandır. Klasik lineer model ile D değeri hesaplınsaydı ne kadar olması gerektiğini gösterir ($\rho = 1$), eğrinin

eğimini değiştirir ancak şekline etki etmez. δ değeri; besiyerinin ortamına, pH değerine, uygulanan ısı işlem süresine ve mikroorganizmanın ortama adaptasyonu gibi fizyolojik etkilerle değişiklik göstermektedir (Mafart ve ark., 2002; van Boekel, 2002; Couvert ve ark., 2005).

Çalışmada r^2 değeri Log-Lineer model için en düşük 0,95 iken Weibull model için ise 0,96'dır, r^2 değerine göre verilerimiz her iki modele de uyumludur. RMSE değeri ise Log-Lineer model için en yüksek 0,54 iken Weibull model için 0,47'dir, veriler her iki modele uyumlandığında Weibull model için tahmini hataların standart sapmasının daha az olduğu belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan elma suyuna %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmiş ve kontrol (%0 LOY) ortamı ile kıyaslama yapılmıştır. Weibull modelde ortamdan ve ısı işlem sıcaklığından etkilenen δ değerinde LOY konsantrasyonu ve sıcaklık arttıkça azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.2.-4.5., Tablo 4.2., 4.3.)

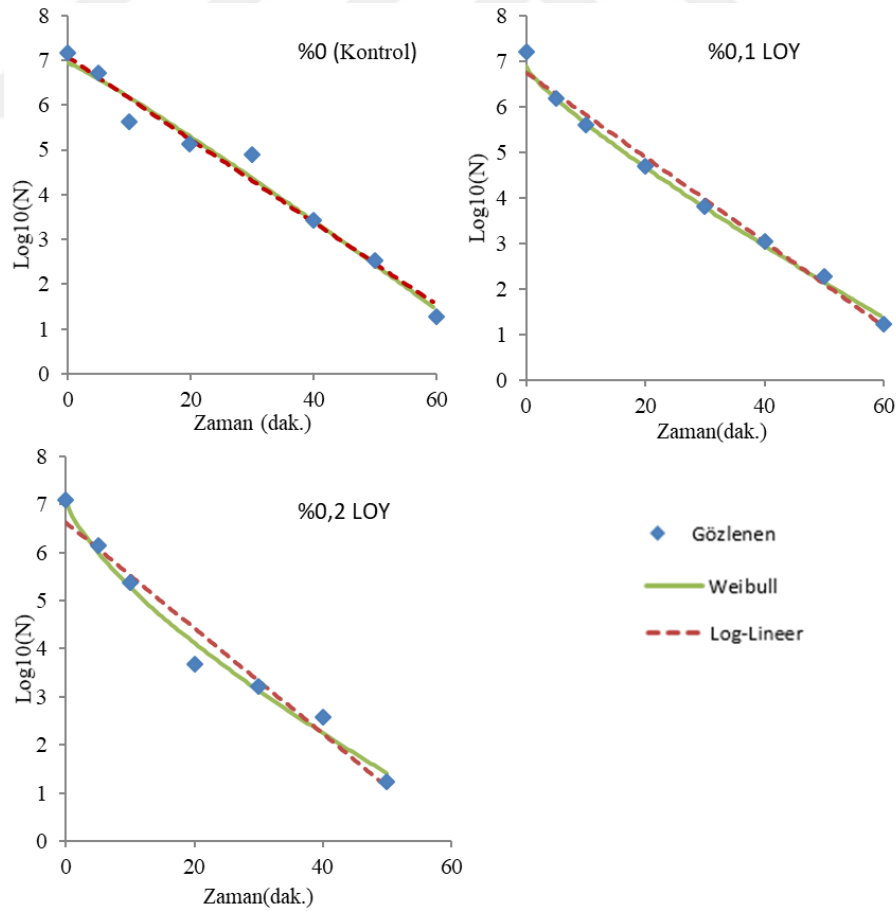
Tablo 4.2. *E. coli* O157:H7'ye ait verilerin Log-Lineer modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları

Isıl işlem sıcaklığı	LOY (%)	Konsantrasyonu	Log-Lineer		r^2	RMSE
			4 Desimal	Azalma (dak.)		
55°C	0		43,8±0,00		0,97±0,00	0,36±0,00
	0,1		43,5±0,42		0,99±0,00	0,24±0,02
	0,2		36,75±0,35		0,95±0,02	0,46±0,14
57,5°C	0		8,33±0,89		0,97±0,01	0,37±0,02
	0,1		7,50±0,08		0,99±0,00	0,26±0,01
	0,2		4,79±0,05		0,97±0,02	0,35±0,18
60°C	0		5,6±0,20		0,96±0,01	0,35±0,05
	0,1		5,04±0,10		0,99±0,00	0,23±0,01
	0,2		4,41±0,00		1,00±0,00	0,12±0,01
62,5°C	0		3,32±0,11		0,96±0,00	0,44±0,01
	0,1		1,95±0,00		0,95±0,01	0,54±0,02
	0,2		1,93±0,02		0,98±0,01	0,26±0,07

Tablo 4.3. *E. coli* O157:H7'ye ait verilerin Weibull modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları

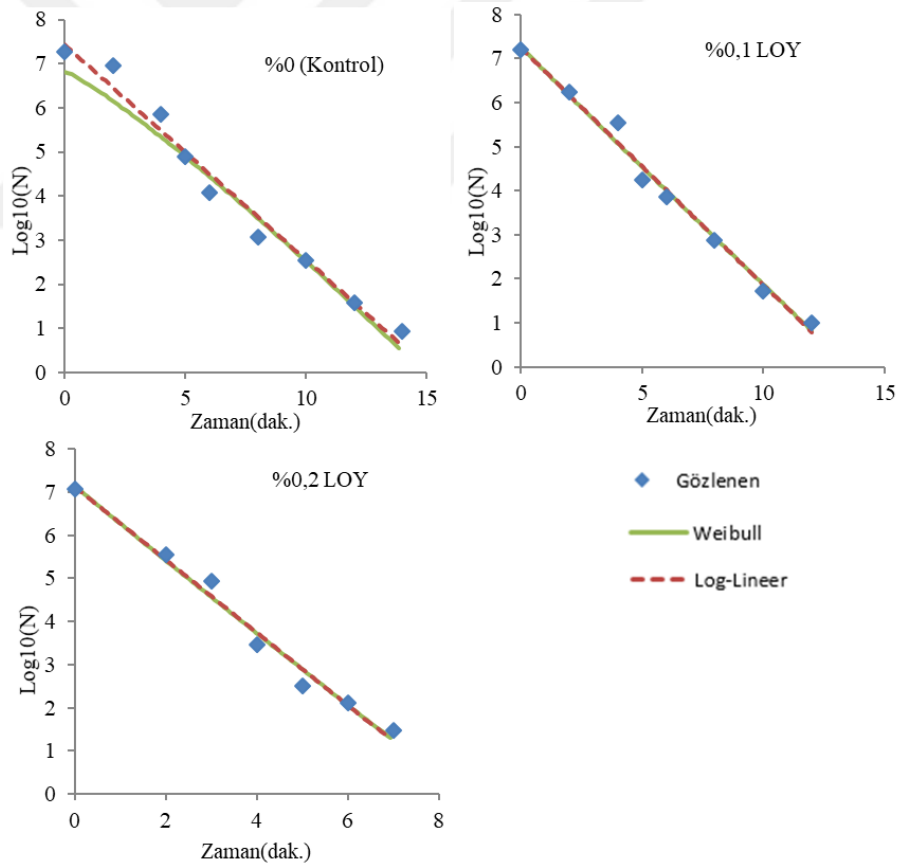
Isıl işlem sıcaklığı	LOY Konsantrasyonu (%)	Weibull				
		4 Desimal	Azalma (dak.)	r^2	RMSE	δ
55°C	0	44,7±0,42		0,97±0,00	0,38±0,02	12,40±0,73
	0,1	39,6±1,70		0,99±0,01	0,16±0,06	7,20±0,95
	0,2	33,25±1,77		0,98±0,02	0,41±0,13	5,92±0,98
57,5°C	0	7,98±0,98		0,98±0,00	0,40±0,03	1,83±0,30
	0,1	7,44±0,17		0,99±0,00	0,28±0,01	1,79±0,11
	0,2	4,72±0,15		0,98±0,02	0,38±0,22	1,13±0,20
60°C	0	6,09±0,09		0,97±0,00	0,38±0,00	2,00±0,15
	0,1	5,11±0,00		0,99±0,00	0,26±0,01	1,32±0,07
	0,2	4,23±0,05		1,00±0,00	0,11±0,04	0,93±0,05
62,5°C	0	3,40±0,07		0,96±0,00	0,48±0,00	0,90±0,02
	0,1	2,38±0,15		0,97±0,04	0,47±0,28	1,03±0,13
	0,2	2,13±0,04		1,00±0,01	0,19±0,02	0,68±0,07

55°C'deki Weibull modele uyumlanarak tespit edilen veriler incelendiğinde p değeri kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY içeren örnekler için sırasıyla 1,08 (konkav), 0,81 (konveks) ve 0,81 (konveks) şeklindedir yani p değerindeki azalmanın anlamı hassas hücreler anında inaktive olurken kalan hücreler dirençlidir ($p < 1$), LOY ilavesinin bakterinin ilk andaki direncini kırdığı süre geçtikçe daha dirençli hücrelerin hayatta kaldığını göstermektedir. LOY ilavesi ile bakterinin ısıl işleme karşı olan direncinde azalma tespit edilmiştir. %0,1 LOY ilavesinde r^2 değeri 0,99 ve RMSE değeri 0,16 olduğu için veriler modele daha uyumludur ve diğerlerine (%0 ve %0,2 LOY) göre 4 Desimal azalma için hesaplanan süre daha güvenilirdir. δ değeri 12,40 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 5,92 dak.'ya düşmüş ve uygulanması gereken ısıl işlem süresinde %52,25'lik azalışa sebep olmuştur. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 0,99 ve RMSE değeri 0,24 olan %0,1 LOY ilavesinde veriler daha güvenilir olup her iki modelde de 55°C için %0,1 LOY ilavesinde 4 Desimal azalma için daha güvenilir sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.2.; Tablo 4.2., 4.3.).



Şekil 4.2. 55°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

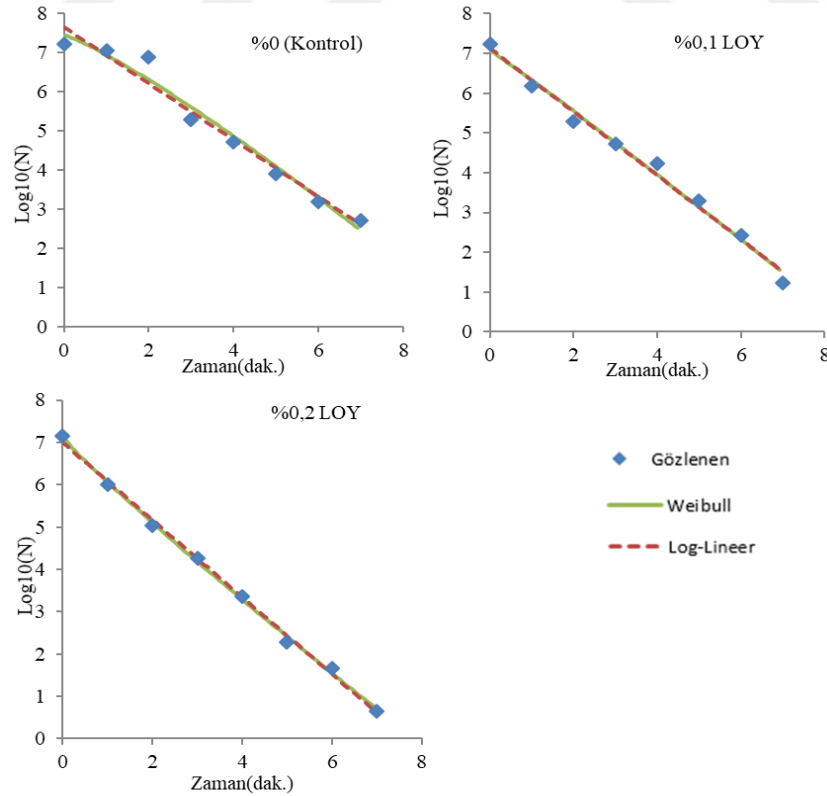
57,5°C’deki Weibull modele uyumlanarak elde edilen verilere göre ρ değeri kontrol (%0 LOY) örneği için 0,94 (konveks) iken %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örneklerde 0,98 (lineer) şeklindedir. Isıl işlem sıcaklığı 57,5°C’ye artırıldığında *E. coli* O157:H7’nin ısıl direncinde LOY’dan bağımsız azalma olduğu lineer eğri yapısı göstermesinden anlaşılmaktadır. %0,1 LOY ilavesinde r^2 değeri 0,99 ve RMSE değeri 0,28 olduğu için kontrol ve %0,2 LOY içeren örnekler için veriler modele daha uyumludur. δ değeri 1,83 dak.’dan %0,2 LOY ilavesi ile 1,13 dak.’ya azalmış ve uygulanması gereken ısı işlem süresinde %40,21’lik azalma saptanmıştır. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 0,99 ve RMSE değeri 0,26 ile %0,1 LOY ilavesinde verilerin modele daha uyumlu olduğu görülmüş ve her iki model de 57,5°C için %0,1 LOY ilavesinde 4 Desimal azalma için daha güvenilir değer vermiştir (Şekil 4.3.; Tablo 4.2., 4.3.).



Şekil 4.3. 57,5°C’de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

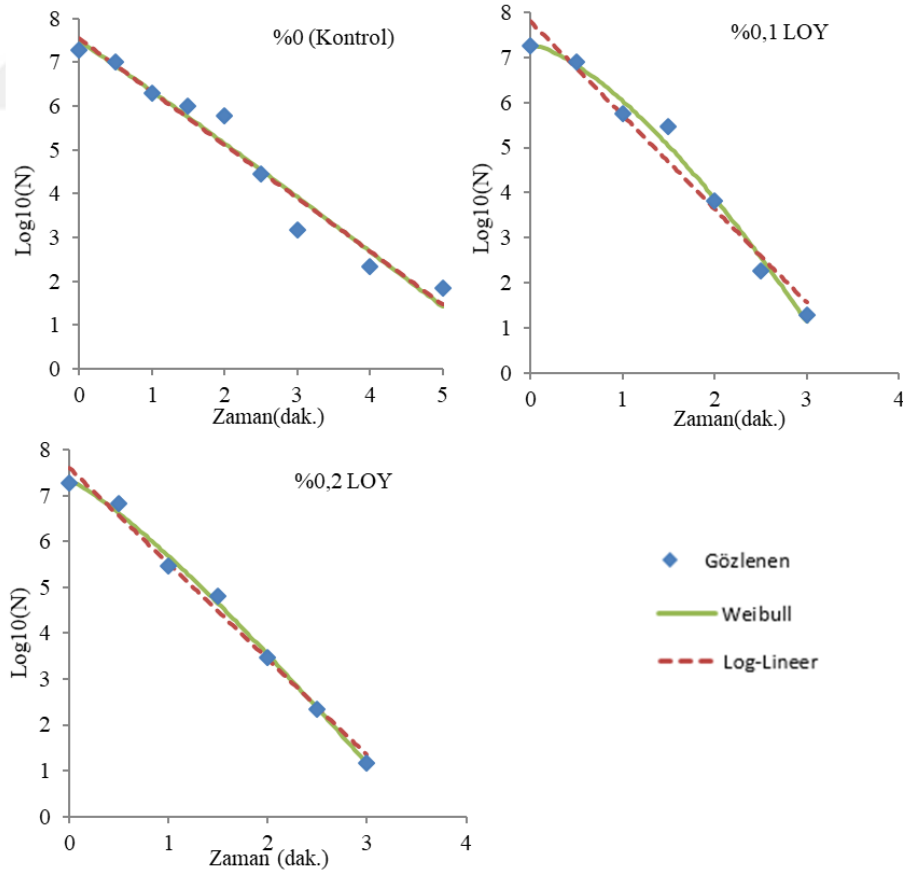
60°C’deki Weibull modele uyumlanarak elde edilen sonuçlara göre ρ değeri kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmiş örnekler için sırasıyla 1,25 (konkav),

1,03 (lineer) ve 0,92 (konveks) şeklindedir. İnaktivasyon eğrilerinin şekli konkav yapıdan konveks yapıya doğru değişmesi sebebiyle LOY'nın konsantrasyonu arttıkça *E. coli* O157:H7'nin ısıl işleme karşı göstermiş olduğu direnç azalmaktadır. ρ değerindeki azalma kontrol grubunda hücreler ısıl işlem stresine ilk anda daha dirençliken LOY ilavesi ile bu ilk andaki direncin kırıldığı ve sonrasında %0,2 LOY ilavesi durumunda 6.dak.'dan sonraki canlı kalan hücrelerin ısıl işlem stres koşullarına direnç kazandığını gösterir. %0,2 LOY ilavesinde r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,11 belirlendiği, bu değerler kontrol ve %0,1 LOY içeren örneklerle karşılaştırıldığında 4 Desimal azalma için daha güvenilir veriler elde edilmiştir. δ değerinin 2,00 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 0,93 dak.'ya değiştiği hesaplanmış ve uygulanması gereken ısıl işlem süresinde %53,5'lik azalma olmuştur. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,12 ile %0,2 LOY eklenmesi için hesaplanan verilerin modele daha uyumlu olduğu ve 4 Desimal azalma süresinin daha güvenilir olduğu görülmüş ve her iki model de 60°C için %0,2 LOY ilavesinde modele en uyumlu sonuçlar vermiştir (Şekil 4.4.; Tablo 4.2., 4.3.).



Şekil 4.4. 60°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

62,5°C'deki Weibull modele uyumlanarak hesaplanan sonuçlar incelendiğinde p değeri kontrol (%0 LOY); %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örneklerde sırasıyla 1,04 (lineer), 1,64 (konkav) ve 1,22 (konkav) şeklindedir. Isıl işlem sıcaklığı 62,5°C'ye artırıldığında *E. coli* O157:H7'nin ısıl direncinde LOY'dan bağımsız azalma olduğu belirlenmiştir. Çünkü sıcaklık arttıkça hücreler daha fazla hasar görür ve hayatta kalan hücre sayısında zamana göre hızlı bir azalış olur. %0,2 LOY ilavesinde r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,19 olduğu için kontrol ve %0,1 LOY içeren örneklerle göre 4 Desimal azalma için daha güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. δ değeri 0,90 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 0,68 dak. olarak hesaplanmış ve uygulanması gereken ısıl işlem süresinde %24,44'lük azalma olmuştur. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 0,98 ve RMSE değeri 0,26 ile en doğru sonuca %0,2 LOY ilavesinde yakın olduğu görülmüş ve her iki model de 62,5°C için %0,2 LOY ilavesinde modele daha uyumlu sonuçlar elde etmiş 4 Desimal azalma daha güvenilir değeri vermiştir (Şekil 4.5.; Tablo 4.2., 4.3.).



Şekil 4.5. 62,5°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

Log-Lineer ve Weibull modeline uyumlanan verilerin genel olarak inaktivasyon eğrileri kıyaslandığında 55°C kontrol (%0 LOY); 57,5°C %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmiş; 60°C %0,1 LOY ilave edilmiş ve 62,5°C’de kontrol (%0 LOY) örneklerinin sıcaklık ve LOY birleşiminde birbirine benzer şekilde lineer dağılım gösterdiği belirlenmiştir (ρ değerleri 1’e yakın). Diğer sıcaklık ve LOY konsantrasyonu birleşimlerinde ise bakterilere karşı ısıtıl işlem uygulamasında daha esnek olan Weibull modele yakın sonuçlar elde edilmiştir. 57,5°C’de *E. coli* O157:H7’nin δ değerindeki azalış ve ρ değerleri incelendiğinde ısıtıl işleme karşı sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada Weibull modeli kullanarak ısıtıl işlemin neden olduğu fizyolojik etkileri 4 Desimal azalma süresindeki değişiklik ile belirlenmiştir. Log-Lineer model ve Weibull model ile hesaplanan 4 Desimal azalma süreleri %0,1 ve %0,2 LOY için 55; 57,5, 60°C için kıyaslandığında Weibull model ile hesaplanan süreler daha düşük bulunmuştur. Fakat 62,5°C’ de Log-Lineer için 4 Desimal azalma süresi daha düşüktür, bu farklılığın nedeni Weibull modele uyumlanırken ısıtıl işlem ve LOY ilavesinin etkisi birlikte değerlendirilirken, Log-Lineer modelde sadece LOY’nın etkisi hesaba katılmıştır.

Weibull modelin Log-Lineer modele göre avantajı ρ şekil parametresi ve δ ölçek parametresi arasındaki güçlü korelasyon ilişkisi ile esnek bir model olmasından kaynaklanmaktadır. Çevresel faktörler ve hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olan faktörlerden ρ parametresi ısıtıl işlem uygulamaları için sabit tutulsa dahi δ parametresi verilerin modele uyumu için uygulanan stres yopunluğuna göre değişebilir (Couvert, ark., 2005; Fernandez ve ark., 2002; Peleg ve Pechina 2000; van Boekel, 2002; Coroller ve ark., 2006). Weibull modele uyumlanarak hesaplanan veriler için lineer ($\rho=1$) yapıda olan inaktivasyon eğrisi 57,5°C’de %0,1 ve %0,2 LOY ilavesinde 4 Desimal azalma süreleri sırasıyla 7,44 ve 4,72 dak. şeklindedir; aynı sıcaklık ve LOY konsantrasyonu ilavesinde Log-Lineer modele uyumlanarak hesaplanan 4 Desimal azalma süresi ise 7,50 ve 4,79 dak.’dır. Aradaki farklılık ρ değeri aynı olsa dahi δ parametresinin etkisinden kaynaklanmaktadır (Tablo 4.2., 4.3.). 55°C’de LOY ilavesi ile hassas hücreler anında inaktif olurken ($\rho<1$); 62,5°C’ye sıcaklık artışında LOY varlığında ($\rho>1$) kalan hücreler sıcaklığa karşı daha dirençlidir. Sıcaklık yükseldikçe ısıtıl işlem sırasında süre geçtikçe hücreler termotolerans etkisiyle daha dayanıklı hale

gelir ($p>1$; Baranyi ve ark., 1996; Marechal ve ark., 1999). Doğrusal olmayan ($p>1$ veya $p<1$) inaktivasyon eğrilerinin nedeni hücrenin inaktivasyondan önce hasar görmesi, bulunduğu ortamdaki stres faktörü gibi durumlardır (Peleg, 2006). Bu çalışmadaki faktör LOY ilave edilmesidir. 55-60°C’de LOY ilavesi ile p değerinde azalma meydana gelerek eğrinin şekli konvekse doğru değişmiştir. Artan sıcaklık stresi ve LOY ile sinerjistik etkisine karşı popülasyondaki bazı hücreler ısı işlem stresi maruz kaldıktan sonraki stres koşullarına adapte olup direnç kazanmıştır. Fakat sıcaklık 62,5°C’ye çıkarıldığında popülasyonun ortama adapte olup direnç kazanma özelliği sıcaklık etkisi ile kırılmıştır. Düşük sıcaklıklarda Weibull modele uyumlanmasında daha başarılı sonuçlara ulaşılırken, sıcaklık ve LOY’nın konsantrasyonunun artması ile ısı işlemde uygulanan sıcaklık pastörizasyon sıcaklığına yaklaştıkça veriler Log-lineer modele daha fazla uyum göstermektedir. Nedeni ise sıcaklık ve LOY konsantrasyonu arttıkça hücrelerin gösterdiği ilk andaki direncin azalmasıdır.

Tablo 4.4. *E. coli* O157:H7 için Weibull modeline uyumlanan literatür çalışmaları

Isıl İşlem Ortamı	T (°C)	δ (dak) (ort.±SS)	ρ (ort.±SS)	Kaynak
Elma sırası	52	9,6±0,9	1,4±0,1	Splittstoesser ve ark. (1996)
	55	3,2±2,1	1,2±0,4	
	58	1,6±0,4	2,0±0,4	
Elma suyu	54	16,24	2,13	Espina ve ark. (2010)
	56	5,97	1,37	
	58	2,91	1,63	
	60	1,12	1,60	
	62	0,50	1,41	
Elma suyu	55	5,9±0,40	0,51±0,01	Siguemoto ve ark. (2018)
	60	0,30±0,01	0,96±0,03	
	65	0,04±0,01	0,61±0,03	
Portakal suyu	54	20,11±0,77	1,97±0,17	Espina ve ark. (2014)
	57	7,93±0,59	2,61±0,35	
	60	1,83±0,07	2,14±0,14	
+200 ppm limonen	54	1,95±0,52	0,89±0,16	
	57	1,09±0,11	1,23±0,12	
	60	0,23±0,02	1,08±0,06	
+ 200 ppm portakal yağı	54	4,01±0,53	1,03±0,10	
	57	1,60±0,16	1,17±0,12	
	60	0,34±0,05	1,03±0,12	
%7 yağlı biftek	50	70,0±9,8	1,8±0,2	Ahmed ve ark. (1995)
	55	1,9±0,9	0,7±0,1	
	60	0,02±0,05	0,5±0,3	
%0,1 peptonlu su ATCC 700599 ATCC 43895				Adhikari ve ark. (2016)
	56	41	1,3	
	56	28	0,9	

Tablo 4.4. incelendiğinde $p > 1$ olan durumlarda, *E. coli* O157:H7'nin ısıtma işlem süresince ısı hasarına karşı giderek daha duyarlı hale geldiği anlaşılmaktadır. Bu çalışmada gözlenen *E. coli* O157:H7 için δ (dak.) sürelerini diğer çalışmalarda rapor edilen δ süreleriyle kıyaslırsak 55°C 'de elma şırası için Splittstoesser ve ark., (1996) 3,2 dak., elma suyunda Siguemoto ve ark., (2018) 5,9 dak., %7 yağlı biftekte Ahmed ve ark., (1995), 9 dak. ısıtma işlem uygulanması gerektiği bildirmiştir. Bu çalışmada ise kontrol (%0 LOY) örneklerinde δ süresi 12,40 dak. hesaplanmıştır. 60°C ise *E. coli* O157:H7 için δ azalma parametresi elma suyunda 1,12 dak., (Espina ve ark.,2010), 0,30 dak.(Siguemoto ve ark., 2018); %7 yağlı biftekte 0,02 dak. (Ahmed ve ark., 1995); portakal suyunda kontrol, 200 ppm limonen ve 200 ppm portakal yağı ilavesi durumlarında sırasıyla 1,83; 0,23 ve 0,34 dak.(Espina ve ark., 2014) rapor edilmiştir. Çalışmada ise elma suyunda *E. coli* O157:H7'ye 60°C ısıtma işlem uygulamasında kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY içeren örnekler için δ parametresi sırasıyla 2,00; 1,32 ve 0,93 dak. hesaplanmıştır. δ parametresinin değerinin belirlenmesinde, hücrenin geliştiği besiyeri ortamı ve koşulları, analiz edilen uygun sıcaklık ve ısıtma işlem süresi kombinasyonu, suş farkı etkilidir, vejetatif hücrelerin inaktivasyonu ısıtma işlem ortamına bağlıdır (Black ve ark., 2010).

Espina ve ark., (2010) elma suyuna sitral ilave ederek 54°C'de ısıtma işlemine tabi tutmuş ve inaktivasyon eğrisinin konkav yapıdan sitral ilavesi ile lineer yapıya doğru değiştiğini gözlemlemiştir. Çalışmada ise 55; 57,5 ve 60°C için LOY ilave edildiği durumlarda kontrol örneklerine göre p değerlerinde azalma olmuştur. Bu durum LOY'nın esas antimikrobiyal etki gösteren maddesi sitralin elma suyunda *E. coli* O157:H7'nin ısıtma işlemine karşı direncini kırdığını gösterir ve LOY konsantrasyonu arttıkça hücrenin ısıtma işlemine karşı hassasiyeti artmaktadır.

4.3.3. *E. coli* O157:H7'nin elma suyundaki D değerleri

Bu araştırmada dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60 ve 62,5°C) ısıtma işlemine tabi tutulan elma suyuna farklı konsantrasyonlarda ilave edilen (%0,1 ve %0,2) LOY ve kontrol (%0 LOY) örneklerdeki verilerin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlaması ile D değerleri (dak.) Tablo 4.5.'deki şekilde hesaplanmıştır. Aynı sıcaklıkta LOY

ilavesinin D değerinin azalmasında istatistiki olarak farkının olup olmadığı One-Way ANOVA, Duncan (Post Hoc) çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.5. *E. coli* O157:H7'nin Log-Lineer ve Weibull modele göre hesaplanan D değerleri

Isıl sıcaklığı	işlem	LOY (%)	Konsantrasyonu	Log-Lineer D (dak.)	Weibull D (dak.)
55°C		0		10,84±0,02 ^a	11,18±0,10 ^a
		0,1		10,78±0,14 ^a	9,90±0,42 ^b
		0,2		9,11±0,13 ^b	8,32±0,44 ^c
57,5°C		0		2,06±0,20 ^a	2,00±0,24 ^a
		0,1		1,86±0,01 ^a	1,86±0,04 ^a
		0,2		1,19±0,01 ^b	1,19±0,03 ^b
60°C		0		1,39±0,04 ^a	1,53±0,02 ^a
		0,1		1,25±0,02 ^b	1,28±0,00 ^b
		0,2		1,10±0,00 ^c	1,06±0,01 ^c
62,5°C		0		0,82±0,01 ^a	0,85±0,01 ^a
		0,1		0,48±0,00 ^b	0,60±0,03 ^b
		0,2		0,48±0,00 ^b	0,54±0,00 ^b

(a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sütunda farklı harflerle gösterilen D değerleri arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).

55°C'deki elma suyunun inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol örnekleri için 10,84 dak., %0,1 LOY ilave edilmiş örnekler için 10,78 dak., %0,2 LOY ilave edilen örneklerde ise 9,11 dak. hesaplanmıştır ($r^2 >0,95$). Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol örnekleri için 11,18 dak., %0,1 LOY ilave edilmiş örneklerde 9,90 dak., %0,2 LOY ilave edilmiş örneklerde 8,32 dak. olarak hesaplanmıştır ($r^2 >0,97$). Log-Lineer modele uyumlanarak hesaplanan D değerlerinde farklılığın hangi kategoriden kaynaklandığı Duncan çoklu karşılaştırma testi sonucunda; kontrol ve %0,1 LOY ilavesi arasında farklılık olmadığı, LOY ilavesinin %0,2 oranına çıkarıldığında ise istatistiki olarak anlamlı farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Isıl işlemin etkisine karşı daha esnek olan Weibull modelinde ise kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY ilavesinde D değerlerinin istatistiki olarak farklı olduğu belirlenmiş; LOY konsantrasyonu arttıkça desimal azalma için uygulanması gereken sürenin azaldığı görülmüştür. Bu sıcaklıkta her iki modelde de %0,2 LOY ilavesinde en kısa süredeki D (9,11 ve 8,32 dak.) değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.5.)

57,5°C'de inaktivasyon eğrilerinin Log Lineer modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 2,06; 1,86 ve

1,19 dak. ($r^2>0,97$) belirlenmiş ve Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 2,00; 1,86 ve 1,19 dak. belirlenmiştir ($r^2>0,98$). Yapılan çalışmanın sonucunda kontrol ve %0,1 LOY ilavesinde istatistiki olarak anlamlı farklılık olmazken ($p>0,05$), LOY miktarı %0,2'ye çıkarıldığında D değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Her iki model içinde LOY ilavesinde aynı D değerleri belirlenmiştir ve bu sıcaklıkta verilerimiz her iki modele de uygundur (Tablo 4.5.).

60°C'de belirlenen inaktivasyon eğrilerinin Log Lineer ve Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 1,39; 1,25; 1,10 dak. ($r^2>0,96$) ve 1,53; 1,28 ve 1,06 dak. ($r^2>0,97$) belirlenmiştir. Yapılan çalışmadaki verilerin her iki modele uyumlanması sonucu kontrol ve LOY ilave edilen örnekler arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.5.).

62,5°C'deki inaktivasyon eğrilerinin Log Lineer ve Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 0,82; 0,48 ve 0,48 dak. ($r^2>0,95$) ve 0,85; 0,60 ve 0,54 dak. ($r^2>0,96$) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın her iki modele uyumlanması sonucu %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmesi açısından D değerleri arasında istatistiki fark olmadığı fakat kontrol örnekleriyle aralarında istatistiki farkın olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$; Tablo 4.5.).

Weibull modele uyumlanarak hesaplanan D değeri şekil parametresine (p) göre belirlendiği için klasik D değerine göre süreç ve ürün optimizasyonu için daha iyi sonuç vermektedir (Peleg 2000). Çalışmada elma suyuna LOY ilavesi ile farklı sıcaklıklarda hesaplanan D değerleri karşılaştırıldığında, ılımlı ısıtım işlem uygulanmalarında LOY konsantrasyonu daha etkiliyken sıcaklık arttıkça LOY'nın etkisinin azaldığı tespit edilmiştir. Çalışılan sıcaklıklarda LOY konsantrasyonu arttıkça D değeri azalmış ve fark da istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Tablo 4.5.). Düşük miktarlarda patojen mikroorganizma ile kontamine olmuş elma suyuna sitral ilave edilmesi hücrelerin inaktif hale gelmesi için yeterlidir (Somolinos ve ark., 2009).

Meyve suyu üretiminde ısıtma işlemi sırasında ürüne sitral ilave edilmesi yaygın olarak kullanılmaktadır (Stratford ve ark., 2000). Elma suyuna 54°C’de ısıtma işlemi uygulanarak *E. coli* O157:H7’nin D değeri 8,9 dak. hesaplanmış sonrasında ise 20 ppm sitral elma suyuna ilave edilerek aynı işlem tekrarlanmış ve D değerinin 1,4 dak. olduğu yani sitral ilavesinin süreyi 6 kat kısalttığı belirlenmiştir. Sitral konsantrasyonu 200 ppm’e çıkarıldığında ise 3×10^7 düzeyindeki *E. coli* O157:H7’yi 1,7 dak. inaktive etmiştir (Espina ve ark., 2010). Knight ve McKellar (2007), elma sırasında *E. coli* O157:H7 varlığına karşı ılımlı ısıtma işlemi uygulaması sırasında, elma şirasına esansiyel yağ eklemiş sonucun esansiyel yağ eklenmemiş ısıtma işlem uygulamalarındaki D değerinden daha düşük olduğunu belirtmiştir. Bu durumun ise ılımlı ısıtma işlem ortamına esansiyel yağların eklenmesi ile oluşan sinerjistik etkiden kaynaklandığını rapor etmiştir. Bu çalışmada ise ana etken maddesi sitral olan LOY düşük sıcaklıklarda ısıtma işlemi ile birlikte uygulandığında sinerjistik etki göstermiştir ve her sıcaklık değerinde LOY ilavesi durumunda D değerinin azaldığı belirlenmiştir.

Elma suyunda *E. coli* O157:H7’nin D değeri Log-Lineer modele uyumlanarak 45, 50, 52, 55 ve 60°C ısıtma işlem sıcaklıkları için $96,3 \pm 5,2$; $20,7 \pm 0,2$; $9,0 \pm 0,2$ $4,5 \pm 0,1$ ve $2,1 \pm 0,1$ olarak rapor edilmiştir (Gabriel, 2015). Bu çalışmada ise *E. coli* O157:H7 için Log-Lineer modele uyumlanarak elde edilen D değerleri kontrol örneklerinde 55 ve 60°C’de $11,58 \pm 0,10$; ve $1,53 \pm 0,02$ şeklindedir. 55°C’de daha yüksek D değeri; kullanılan elma suyunun cinsinden, uygulanan ısıtma işlem yöntemi ve mikroorganizmanın ısıtma işlemi karşı direncinden kaynaklı olabilirken sıcaklığın artışı ile bu stres faktörlerinin etkisi azalmıştır. Bu sebeple 60°C’de literatüre yakın sonuca ulaşılmıştır. Bu çalışmada kullanılan elma suyuna yakın pH değeri (3,9) olan portakal suyunda Pagal ve Gabriel (2020) yaptıkları çalışmada 50, 53, 55, 57, 60°C ısıtma işlem sıcaklıklarında *E. coli* O157:H7’nin termal inaktivasyonu incelemiş ve D değerlerini sırasıyla 5,4; 3,45; 2,23; 2 ve 1,58 dak. olarak bildirmiştir ve log-lineer inaktivasyon eğrisi şeklinde *E. coli* O157:H7 sayısında azalma olduğunu ve bu azalmada uygulanan ısıtma işlemin etkili olduğunu, artan sıcaklık değerlerine karşı D değerinin önemli ölçüde kısaldığını belirlemiştir. Gabriel ve Nakano (2009) elma suyunda (pH 3,8) yaptıkları çalışmada 55°C’de D değerinin *E. coli* O157:H7 için 4,4 dak. olduğunu ve mikroorganizmaların termal direncinin ortamın özelliklerine ve test organizmasının

doğal özelliklerine bağlı olduğunu belirtmiştir. Mazzotta (2001) pH'ı 3,9 olan elma suyunda yaptığı çalışmada *E. coli* O157:H7 için 56, 58 ve 60°C'deki D değerlerini sırasıyla 4,1; 1,9 ve 0,8 dak. hesaplar; Splittstoesser ve ark. (1996) *E. coli* O157:H7 için D değerlerini 52, 55 ve 58°C için 12; 5,0; ve 1,0 dak. hesaplamıştır. Bu çalışmalar elma suyu vb. düşük pH değerlerine sahip gıdalarda mikroorganizmaların ısıya karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

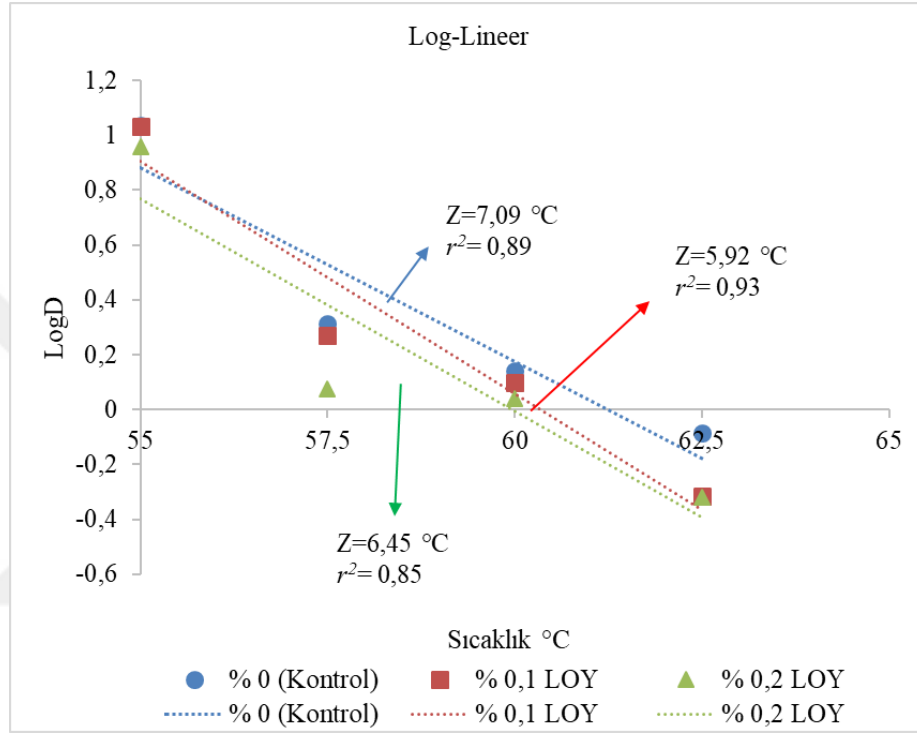
Literatür incelemesi ve yapılan çalışma sonucunda *E. coli* O157:H7'de aynı sıcaklıktaki D değerleri arasında fark olmasının nedenleri, suş farklılığı; deneyin tasarımı, bakteri popülasyonunun ısı işleminden önce sıcak veya soğuk ortamda strese maruz kalması (Pagan ve ark., 1997), ısı işlem yöntemindeki farklılıklar (Faille ve ark., 1997), ısı işlem ortamının bileşiminden (artan yağ miktarı, karbonhidat ve protein seviyeleri) kaynaklı yeterli besin olmadığı durumda hücrenin strese girmesi (Ababouch ve ark., 1995; Oteiza ve ark., 2003), hücrenin bulunduğu ortamdaki su aktivitesi (Gaillard ve ark., 1998), ısı işlem ortamının pH'ı gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır (Byrne ve ark., 2006). Gıdalarda *E. coli*'nin ısı işlemine karşı direnç göstermesi tipik suşunun özellikleri, gıdanın formülasyonu, ve *E. coli*'nin hücre zarı, sitoplazma, DNA, ribozom ve membran akışkanlığını kontrol eden proteinlerin etkisine bağlıdır (Li ve Ganzle, 2006; and Gayán ve ark., 2016).

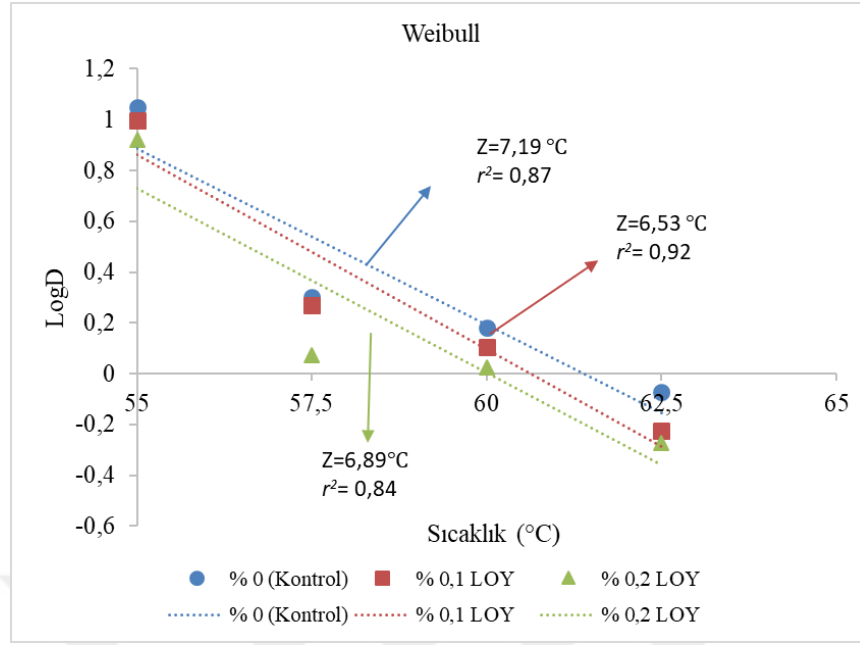
4.3.4. *E. coli* O157:H7'nin elma suyundaki z değerleri

Bir mikroorganizmanın belirli bir sıcaklıktaki D değerinin 1 log birim yani on kat azalması için sıcaklığın ne kadar artırılması gerektiği “z değeri” olarak ifade edilmektedir (Splittstoesser ve ark., 1996, Steenstrup ve Floroz, 2002). z değerlerini hesaplamak için kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY içeren örneklerin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanarak hesaplanan D değerlerinin logaritması sıcaklığa bağlı olarak grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.6-4.7). Bu eğrinin eğiminin negatif tersinden z değeri Tablo 4.6.'daki şekilde hesaplanmıştır. 55-62,5°C aralığındaki ısı işlem uygulaması sonucu z değerleri; Log-Lineer modele uyumlan değerler için 7,09 ile 5,92°C arasındayken Weibull modele uyumlanan değerler için ise 7,19 ile 6,53°C arasında hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *E. coli* O157:H7 Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması ile hesaplanan z değerleri

LOY Konsantrasyonu (%)	Log-Lineer		Weibull	
	z değeri	r^2	z değeri	r^2
0	7,09	0,89	7,19	0,87
0,1	5,92	0,93	6,53	0,92
0,2	6,45	0,85	6,89	0,84

Şekil 4.6. *E. coli* O157:H7'nin Log-Lineer modele göre hesaplanan z değerleri



Şekil 4.7. *E. coli* O157:H7'nin Weibull modele göre hesaplanan z değerleri

Tablo 4.7. *E. coli* O157:H7'nin z değeri ile ilgili literatür verileri

Isıl İşlem Ortamı	z değeri (°C)	Kaynak
Elma suyu	4,8	Splittstoesser ve ark.(1996)
Elma suyu	7,4	Stringer ve ark. (2000)
Elma suyu	5,6	Mazzotta (2001)
Elma suyu	8,9	Gabriel (2015)
Elma suyu	4,56	Siguemoto ve ark. (2018)
Elma şırası	5,72	Knight ve McKellar (2007)
+%0,0,1 tarçın yağı	5,77	
+%0,01 karanfil yağı	5,30	
Elma şırası	6,3	Steenstrup ve Floros (2002)

Bakteri hücrelerinin sıcaklıktaki değişikliklere ne kadar duyarlı olduğu z değeri ile belirlenmektedir (Knight ve McKellar, 2007; Bigelow, 1921; Splittstoesser ve ark., 1996). Daha düşük sıcaklık süre kombinasyonunda daha uzun raf ömrüne sahip meyve suyu üretmek için z değerinin hesaplanması gerekmektedir (Splittstoesser ve ark., 1996). z değeri canlı sayısının 1 log azalması için sıcaklıkta meydana gelmesi gereken artışı ifade etmektedir, z değerinin hesaplanması farklı ısıl işlem sıcaklıklarında eş değer termal prosesin uygulanmasını kolaylaştırmaktadır (Stringer ve ark., 2000). Elma suyu gibi düşük pH değerlerine sahip gıdaların üretiminde mikroorganizmalar düşük pH ortamına maruz kalıp ısıl işleme karşı direnç oluşturabilir (Mazzotta, 2001). Bu durumun sonucunda z değerindeki artış proste ciddi etkilere sebep olur. Yüksek

z değerlerinde mikroorganizmalar sıcaklık artışından daha az etkilenir (Steenstrup ve Floros, 2002).

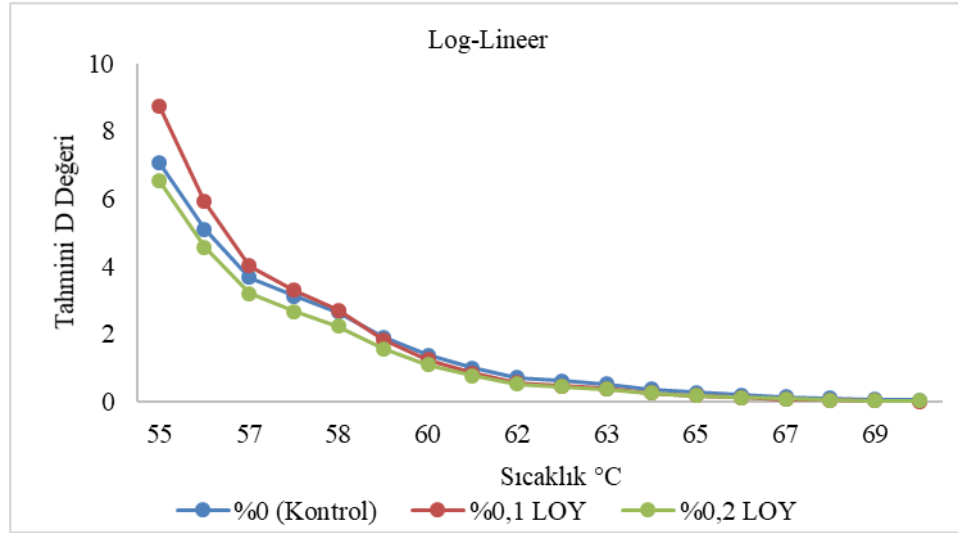
Knight ve McKellar, (2007) tarçın yağı veya karanfil yağı ilavesinin elma sırasında *E. coli* O157:H7'nin hayatta kalması üzerinde bir etkisi olmasına rağmen, her iki yağın da organizmanın değişen sıcaklığa duyarlılığını değiştirmediğini rapor etmiştir. Bu çalışmada ise LOY'nın elma suyunda *E. coli* O157:H7'nin D değeri üzerine etkisi belirlenmiş, bu etki LOY eklenmesi ile *E. coli* O157:H7'nin ısıya karşı direncinin kırılması ve z değerindeki düşme sonucunda doğrulanmıştır.

Hem Log-Lineer hem de Weibull modele uyumlanarak hesaplanan D değerlerinden kontrol (%0 LOY) örnekleri için hesaplanan z değerleri (7,09-7,19°C), Stringer ve ark., (2000) (7,4°C) ve Gabriel, (2015) (8,9°C) hariç diğerlerinden yüksek bulunmuştur. En düşük hesaplanan z değerleri (5,93-6,53°C) ise %0,1 LOY ilavesi ile hesaplanmıştır, Şekil 4.6. ve 4.7.'de de görüldüğü gibi eğrinin eğimi değişmiş ve *E. coli* O157:H7'nin ısıl işleme karşı direnci kırılmıştır.

4.3.5. *E. coli* O157:H7'nin elma suyundaki tahmini D değerleri

4.3.5.1. *E. coli* O157:H7'nin Log-Lineer modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri

Çalışmada dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60; 62,5°C) elma suyundaki *E. coli* O157:H7'nin kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmiş örnekler için D değeri Log-Lineer modele uyumlanarak hesaplanmış ve bu D değerinin logaritması sıcaklığa karşı grafiğe aktararak eğrinin eğiminde z değeri hesaplanmıştır. Bolton ve ark., (2013) tarafından hazırlanan denklem 3.5.'de 60°C için hesaplanmış olan Log-Lineer modele uyumlanan D değeri baz alınarak ve z değerleri seçilerek diğer sıcaklıklardaki tahmini D değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.8.; Tablo 4.8.).



Şekil 4.8. *E. coli* O157:H7'nin Log-Linear modele göre hesaplanan tahmini D değerleri

Bolton ve ark., (2013) tarafından hazırlanan denklemde hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri LOY'nın konsantrasyonuna göre Tablo 4.8.'e aktarılmıştır. 55°C'de üç örnek grubu (kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY) için de gözlenen D değeri tahmini D değerinden daha yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni başlangıçtaki *E. coli* O157:H7 canlı popülasyonunun ısı işlemi karşı gösterdiği direncin beklenen durumdan fazla olması, ılımlı ısı işlemi olan 55°C'nin bakteride daha az termal stres meydana getirmesi olabilir. 57,5°C'de ise gözlenen D değerleri tahmini D değerlerinden daha düşüktür, bunun nedeni ise sıcaklık arttıkça ısı işlemi ve LOY arasında sinerjistik etki oluşmasıyla beklenen durumdan daha kolay bir şekilde bakterinin termal direncinin kırılmasıdır. 62,5°C'de ısı işleminin sıcaklığı arttıkça bakterinin termal direncinin kırıldığı, ortamdaki bakterinin stresinin arttığı görülmüştür. LOY'nın %0,1 ve %0,2 konsantrasyonlarında ilavesi için aynı D değeri gözlenmiştir. Bu durumda LOY'nın etkisinden çok ısı işleminin etkili olduğu yorumu yapılmıştır. Isı işleminin etkisi fazla olduğu için tahmini ve gözlenen D değerlerinde yakın sonuçlara ulaşılmıştır.

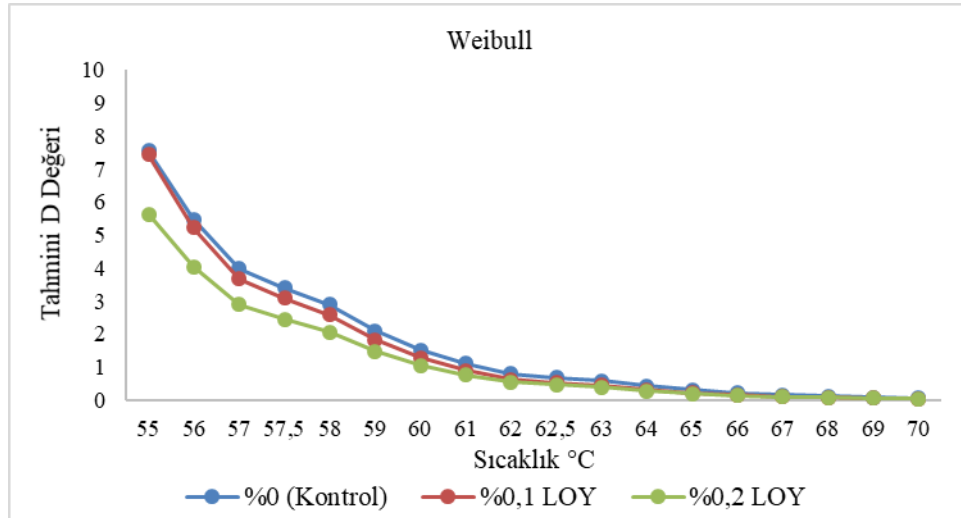
Tablo 4.8. *E. coli* O157:H7'nin Log-Lineer modeline uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri

Log-Lineer						
	%0 (Kontrol)		%0,1 LOY		%0,2 LOY	
Sıcaklık	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen
55	7,06	10,84	8,73	10,78	6,52	9,11
56	5,1		5,92		4,57	
57	3,69		4,01		3,2	
57,5	3,13	2,06	3,31	1,86	2,68	1,19
58	2,66		2,72		2,24	
59	1,92		1,84		1,57	
60	1,39	1,39	1,25	1,25	1,1	1,1
61	1		0,85		0,77	
62	0,73		0,57		0,54	
62,5	0,62	0,82	0,47	0,48	0,45	0,48
63	0,52		0,39		0,38	
64	0,38		0,26		0,26	
65	0,27		0,18		0,18	
66	0,2		0,12		0,13	
67	0,14		0,08		0,09	
68	0,1		0,06		0,06	
69	0,07		0,04		0,04	
70	0,05		0,03		0,03	

Tahmini D değerlerinin hesaplanmasında 60°C'deki D değeri referans olarak kullanılmıştır.

4.3.5.2. *E. coli* O157:H7'nin Weibull modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri

4.3.5.1. de anlatıldığı biçimde Weibull modele uyumlanarak D değerleri hesaplanmış, bu D değerlerinden de z değeri hesaplanmıştır. 60°C için hesaplanmış Weibull modele uyumlanan D değeri baz alınarak Bolton ve ark. (2013) tarafından hazırlanan Denklem 3.5. ile tahmini D değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.9.).

Şekil 4.9 *E. coli* O157:H7'nin Weibull modele göre hesaplanan tahmini D değerleri

Tahmini ve gözlenen D değerleri kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY örneklerine göre Tablo 4.9.'daki şeklinde hesaplanmıştır. Weibull modele uyumlanarak hesaplanan sonuçlar Log-Lineer modele uyumlanarak hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerlerinin o sıcaklıktaki karşılaştırması ile paralel sonuç vermiştir. 55°C'de üç durum içinde gözlenen D değerleri tahmin edilenden daha yüksekken, 57,5°C'de ılımlı ısıtma işlem ve LOY arasında sinerjistik etki olmuş tahmin edilenden daha düşük D değerleri hesaplanmıştır. 62,5°C'de LOY ilavesinden çok sıcaklık artışının bakterinin termal direncini daha kolay kırması etkili olmuş, gözlenen ve tahmini D değerleri birbirine yakın hesaplanmıştır. Tahmini ve gözlenen D değerleri arasında fark olmasının nedeni D değerine etki eden faktörlerde anlatıldığı ile aynı şekildedir.

Tablo 4.9. *E. coli* O157:H7'nin Weibull modeline uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri

Weibull						
Sıcaklık	%0 (Kontrol)		%0,1 LOY		%0,2 LOY	
	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen
55	7,54	11,18	7,43	9,9	5,63	8,31
56	5,47		5,23		4,03	
57	3,98		3,68		2,88	
57,5	3,39	2	3,08	1,86	2,44	1,18
58	2,89		2,58		2,07	
59	2,1		1,82		1,48	
60	1,52	1,52	1,28	1,28	1,06	1,06
61	1,11		0,9		0,76	
62	0,8		0,63		0,54	
62,5	0,68	0,85	0,53	0,6	0,46	0,53
63	0,58		0,44		0,39	
64	0,42		0,31		0,28	
65	0,31		0,22		0,2	
66	0,22		0,15		0,14	
67	0,16		0,11		0,1	
68	0,12		0,08		0,07	
69	0,09		0,05		0,05	
70	0,06		0,04		0,04	

Tahmini D değerlerinin hesaplanmasında 60°C'deki D değeri referans olarak kullanılmıştır.

Hem Log-Lineer hem de Weibull modele uyumlanarak hesaplanan tahmini D değerleri kullanılarak daha yüksek sıcaklıklardaki D değerini hesaplamak mümkündür. 70°C gibi yüksek sıcaklıklara inhibisyon çok hızlı gerçekleştiği için D değerinin süresinin belirlenmesi zordur, bu yöntemle kolayca istenilen sıcaklıktaki tahmini D değeri belirlenebilmektedir.

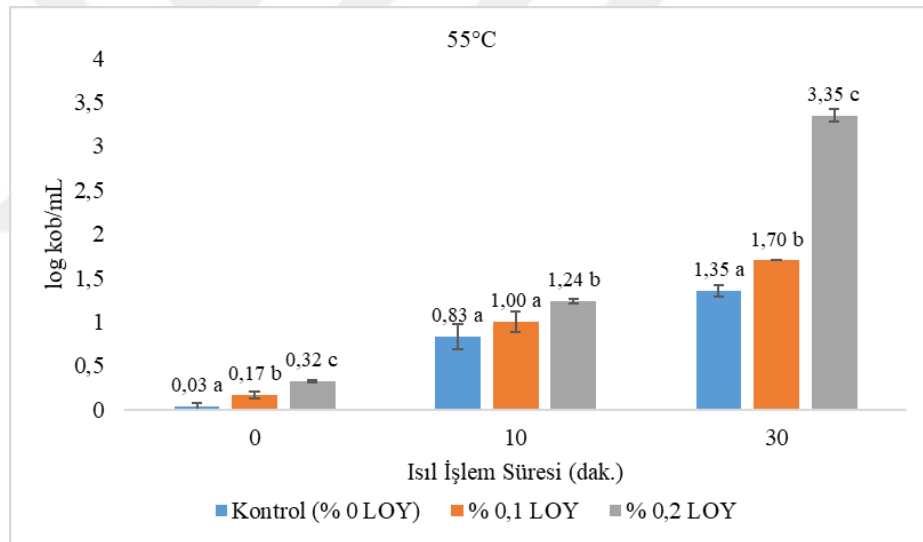
4.3.6. *E. coli* O157:H7'nin membranı zarar görmüş hücre sayısı

Bir bakteri kolonisinin ekim sonrası gelişim göstermemesi, koloninin ölü olduğu anlamına gelmez. Bazı durumlarda, bu çalışmada olduğu gibi ısıtma işlemi uygulaması ile hücre sublethal zarara uğramış olabilir. Bu durum geçicidir ve mikroorganizma uygun şartlarda kendini onarıp gelişim gösterebilir (Mackey, 2000). Gıdaların korunmasında ılımlı ısıtma işlemi uygulamalarında mikroorganizmalar ölmeyip hasar alırlar ve hasarlı mikroorganizmaların tespitinde en fazla Selektif Ortamlı Besiyeri Tekniği (SMPT) kullanılır (Mackey, 2000; Chilton ve ark., 2001; Miller ve ark., 2006). SMPT, seçici bir ortamda elde edilen inaktivasyon seviyesi ile seçici olmayan bir ortamda elde edilen inaktivasyon seviyesi arasındaki farkı ölçerek, her ısıtma işlemi uygulamasından sonra ölümcül olmayan (sublethal) yaralanma oluşumunun hesaplanmasına izin verir (Mackey, 2000). Dış ve sitoplazmik membrandaki hasarı değerlendirmek için, besiyerine sodyum klorür eklenir, böylece sadece hasar görmemiş hücreler çoğalabilmektedir (Espina ve ark., 2016; García ve ark., 2006; Miller ve ark., 2006; Arroyo ve ark., 2009). Literatür incelemesinde TSA besiyerine %2-5 (hacim/ağırlık) NaCl ilave edilerek SMPT ortamı oluşturulabileceği belirlenmiştir (Semanchek ve Golden 1998; Perni ve ark., 2007; Ukuku ve ark., 2008; Walkling-Ribeiro ve ark., 2008; Noriega ve ark., 2014).

Bu çalışmada dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60; 62,5°C) ılımlı ısıtma işlemi ve LOY kombinasyonunun elma suyundaki *E. coli* O157:H7'ye olan etkisinin yeterliliğini tespit etmek için SMPT tekniği kullanılmıştır. Ölümcül olmayan sublethal yaralanmış hücrelerin oluşumu ve miktarının tespiti için hücre membranındaki meydana gelen hasar SMPT ile değerlendirilmiştir. %3 sodyum klorür (NaCl) içeren besiyeri membranı zarar görmüş bakterileri ayırt etmek için seçici ortam olarak kullanılmıştır. Membranı zarar gören bakteriler NaCl varlığında büyüyemez, çünkü ortama selektivite katarak ozmotik basıncın artmasıyla sadece hücre zarı hasar görmemiş mikroorganizmaların gelişim göstermesine sebep olur (Espina ve ark., 2016; Wood, 2011). Uygulanan ısıtma işlemi süreleri sublethal ve lethal yaralanma sürelerini ayırt etmek için seçilmiştir. İşlemden sonra numuneler %0 ve %3 NaCl TSA besiyerinde 37°C' de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra iki grup arasındaki hücre sayısının

zamana bağılı farkından membranı zarar görmüş hücre sayısı (log kob/mL) tespit edilmiştir.

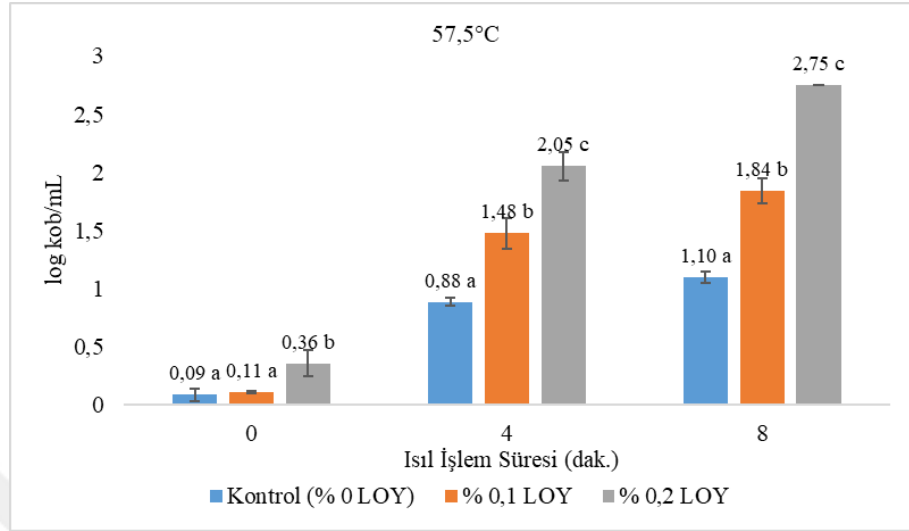
55°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısında 0. ve 30. dak. için LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). 10. dakika ise LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Bu durumda LOY ilavesinin ısıtılma işleminden bağımsız olarak hücrenin membranına ilk anda bile zarar verdiği görülmektedir. Membranı zarar görmüş hücre sayısında 10. dak ısıtılma işlemin etkisi görülürken, 30. dak. ısıtılma işlem ve LOY sinerjistik etki göstermiş ve %0,2 LOY ilavesi durumunda 3 log’dan daha fazla zarar meydana gelmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. 55°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).

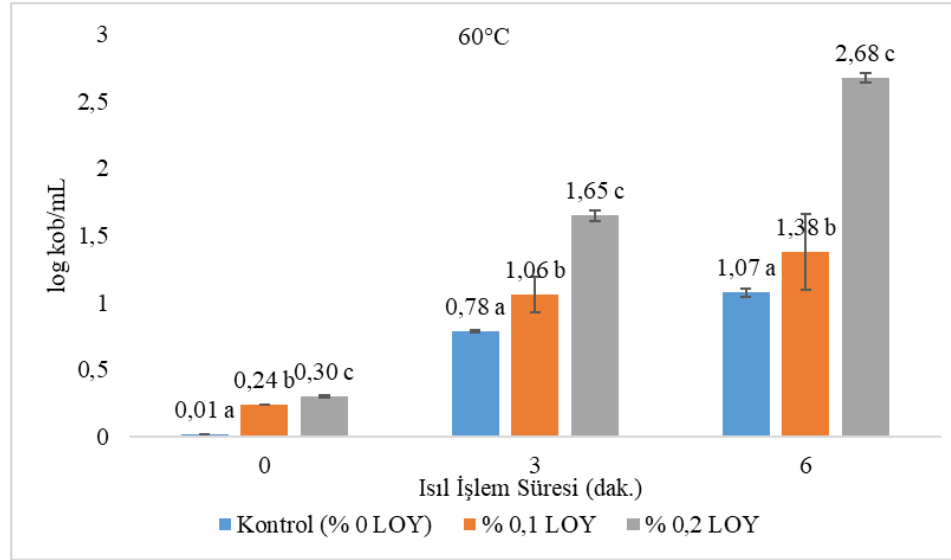
57,5°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısında 0. dak. ve LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Isıtılma işlem süresi 4 ve 8. dak. uygulandığında ise LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). Isıtılma işlem sıcaklığının artırılması LOY ile daha hızlı sinerjistik etki göstererek

daha kısa sürede daha fazla hücrenin membranının zarar görmesine sebep olmuştur. (Şekil 4.11.).



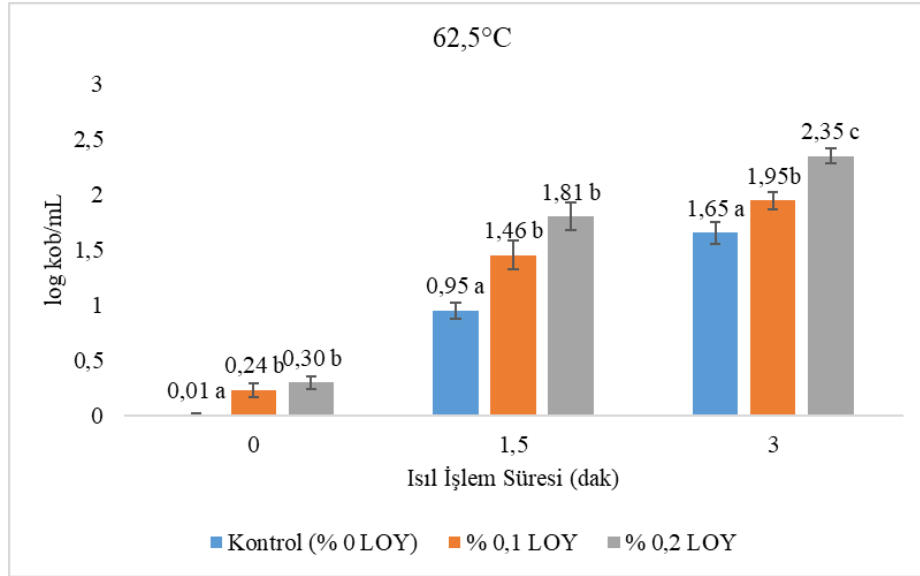
Şekil 4.11. 57,5°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).

60°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısında 0., 3. ve 6. dak. LOY konsantrasyonun kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0,05$). Uygulanan ısıtılmanın sıcaklığı 60°C’ye çıkarıldığında ısıtılma ve LOY ilavesinin sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. LOY konsantrasyonu arttıkça membranı zarar gören hücre sayısında artış tespit edilmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. 60°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).

62,5°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısında 0, 3 ve 6. dak. LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0,05$). Ancak bu farklılıkta 3. dak.’ya kadar LOY konsantrasyonu önemli değilken ısıtılma işlem süresi 6 dak. uygulandığında LOY konsantrasyonları arasında da anlamlı bir fark vardır (Şekil 4.13.). Bu sıcaklıkta 3. dak. %0,1 ve %0,2 LOY için yakın sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.13. 62,5°C’ de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *E. coli* O157:H7’nin membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).

Isıl işlem uygulamasının bakteri hücre membranını önemli derece etkilediği bilinmektedir (Marcén ve ark., 2017). Termal stresten sonra *E. coli*’nin ölümcül olmayan hasarının tespiti, hücre membranının fiziksel bütünlüğünün kaybına atfedilmiştir (Mackey, 2000; Ukuku ve ark., 2008; Wesche ve ark., 2009). Ancak, Espina ve ark., (2016) hücre membranının zarar görmesine hem bakteri popülasyonunun çoğunluğu hem de ısıtılma etkilidir.

Espina ve ark. (2016) 55°C’ de 10 dak. ısıtılma tabi tutulan *E. coli* hücrelerini %1, %2 ve %3 NaCl ilave ettikleri M9 besiyerinde inkübe etmiş ve membranı zarar gören hücre sayısını tespit etmeyi amaçlamıştır. %1, %2, %3 NaCl ilave edilen besiyerlerinde membranı zarar görmüş hücre sayısında sırasıyla 0,2; 1,6 ve 4,8 log azalma olduğunu hesaplamıştır. En etkili sonucun %3 NaCl ilavesinde olduğunu belirtmiştir. Ilımlı ısıtılma besiyeri ortamında NaCl varlığında membranı zarar görmüş hücrelerin hassasiyetindeki artışa sebep olduğunu belirtmiştir (Espina ve ark., 2016). Ayrıca, esansiyel yağlar gibi bazı antibakteriyel bileşikler de bakteri hücre zarına zarar verebilir (Espina ve ark., 2013). Esansiyel yağlar ve termal işlemin kombinasyonu ile bakteri zarındaki birikmiş lokalize streslerin arttığı tahmin edilmektedir (Oliveira ve ark., 2019). Bu çalışmada kontrol (%0 LOY) örnekleri ve LOY ilave edilen örnekler kıyaslandığında LOY ilavesinin ılımlı ısıtılma sıcaklığı

ve uygulandığı sürenin etkisiyle sublethal yaralanmış bakteri sayısında artışa yol açtığı gözlemlenmiştir. Oliveira ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada ılımlı ısı işlem ile fenolik asit uygulamasının sinerjistik etkisini araştırmış ve bu kombinasyonun membranı zarar görmüş hücre sayısını arttırdığını belirlemiştir ve gelişmiş antibakteriyel etki gözlemlendiğini rapor etmiştir. Çalışmada ise dört farklı sıcaklık (55; 57,5; 60, 62,5°C) için de %0,2 LOY ilavesinde 2 log kob/mL düzeyinden fazla hücrenin membranı zarar gördüğü tespit edilmiştir. Bu durumu Espina ve ark., (2016) selektif ve selektif olmayan besiyerinde 2 log kob/mL'den fazla fark hesaplanmış, o sıcaklık ve süredeki canlı hücre sayısının %99'u sublethal hasarlıdır şeklinde açıklamaktadır.

Espina ve ark. (2010) elma suyunda membranı zarar görmüş hücre sayısını belirlemek için 10^7 kob/mL düzeyindeki *E. coli* O157:H7'ye 54°C'de ısı işlem uygulamış 4 dak. sonunda %0,3 sodyum klorür için ortamda canlı hücre sayısında 1 log azalma olduğunu; %0,35 safra tuzu içeren ortamda ise 3 log azalma olduğunu rapor etmiştir. *E. coli* O157:H7'nin selektif olmayan ve selektif besiyerindeki canlı hücre sayısı arasındaki farklılık ısı işlem sonrasında hücrenin sitoplazmasında ve membranında meydana gelen hasardan kaynaklanmaktadır. Isıl işlem uygulamalarından sonra hücre genel olarak hücre membranının geçirgenliğinin kontrolünü kaybeder ve NaCl'ye duyarlılığı artar. NaCl sitoplazmik yapının işlevselliğini ve bütünlüğünü bozmasına sebep olur ve membranı zarar gören hücreler inhibitör varlığında gelişip büyüyemez, bu da hücrelerin geri dönüşü olmayan inaktivasyonuna yol açar (Mackey, 2000). Somolinos ve ark., (2008) *E. coli*'yi 1000 ppm citral içeren besiyerinde oda sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakmış ve ısı işlem uygulamasında olduğu gibi sitralin de hücrenin dış membranı ve sitoplazmik membranına zarar vererek sublethal hasara sebep olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise ılımlı ısı işlem ve LOY (sitral)'in etkisiyle *E. coli* O157:H7'nin membranı zarar görmüş hücre sayısı %0,2 LOY varlığında 55; 57,5; 60; 62,5°C'de sırasıyla 3,35 (30 dak.), 2,75 (8 dak.), 2,68 (6 dak.), 2,35 (3. dak.) log kob/mL şeklinde belirlenmiştir.

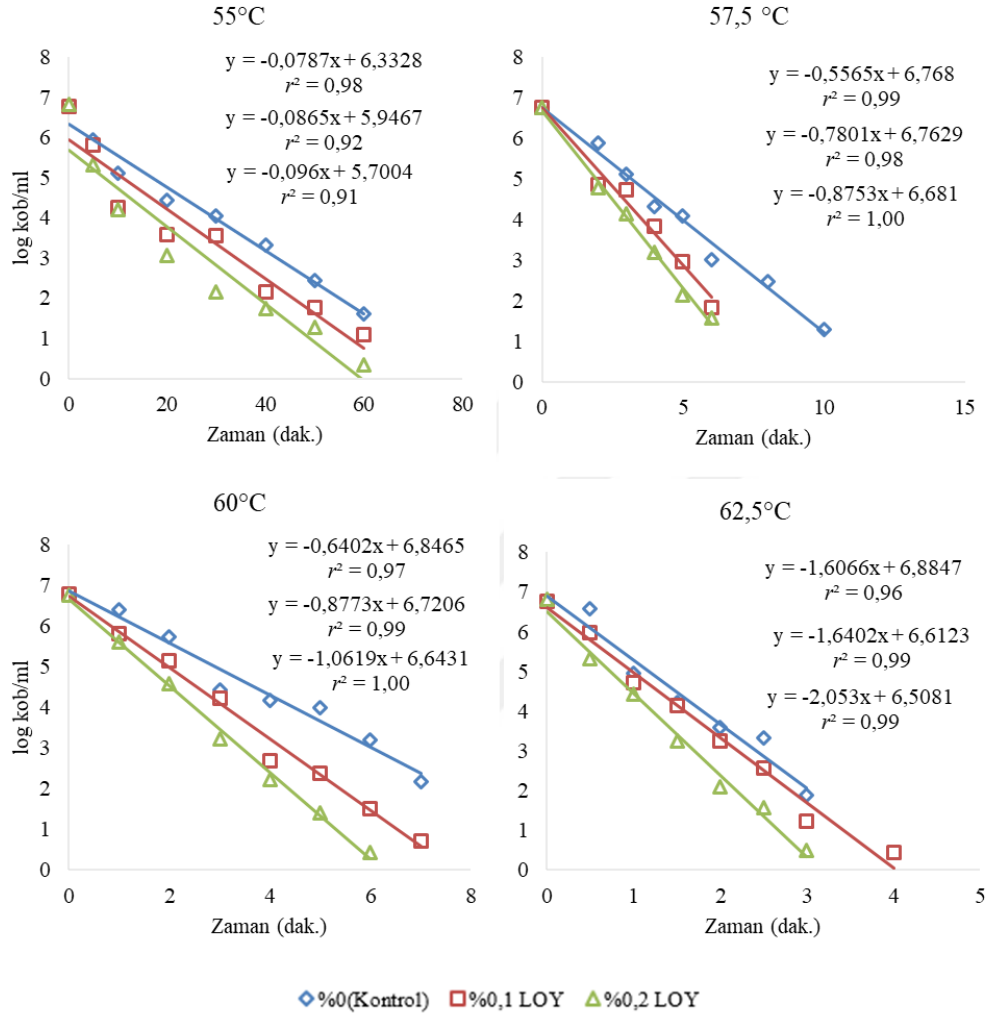
4.4. *L. monocytogenes*' e Ait Araştırma Sonuçları

4.4.1. Termal inaktivasyon denemelerine ait sonuçlar

Çalışmada kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen elma suyu örneklerine 7-8 log kob/mL düzeyinde *L. monocytogenes* eklenmiş ve 55; 57,5; 60 ve 62,5°C'de ısıtıl işlem uygulanmıştır. Uygulanan ısıtıl işlemin süresi seçilen her bir sıcaklık derecesi *L. monocytogenes*'in başlangıçtaki sayısında en az 5 log azalma olması durumuna göre belirlenmiştir (Şekil 4.14.).

Listeria monocytogenes'in başlangıçtaki sayısında en az 5 log birimi azalma olması için uygulanan ısıtıl işlem süresi; 55°C'de kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örnekler için sırasıyla 58; 48,4 ve 40,6 dak. olarak hesaplanmıştır ve LOY ilavesi ile kontrol grubuna göre uygulanması gereken ısıtıl işlem süresi %0,1 LOY için %16,6 azalırken %0,2 LOY ilavesi durumunda ise %30 oranında daha az hesaplanmıştır. 57,5°C'de %0,1 LOY ilave edilen örneğe 6,4 dak., %0,2 LOY ilave edilen örneğe 5,6 dak. kontrol örneklerine ise 9 dak. ısıtıl işlem uygulanması gerektiği hesaplanmıştır. %0,1 ve %0,2 LOY ilavesi ile uygulanması gereken ısıtıl işlem süresi kontrol örneklerine göre sırasıyla %28,9 ve %38 oranında azalmıştır. 60°C'de ise kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örneklere sırasıyla 8; 5,6 ve 4,6 dak. ısıtıl işlem uygulanmıştır. Isıtıl işlem uygulaması kontrol örneği ve LOY ilave edilen örnekler için kıyaslandığında %0,1 LOY ilavesinde süre %30 oranında azalırken %0,2 LOY ilavesinde ise %42,5 oranında azalmıştır. Diğer yandan 62,5°C'de kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY içeren elma suyu örneklerine sırasıyla 3,2; 3 ve 2,8 dak. ısıtıl işlem uygulanmıştır ve bu sıcaklık değerinde *L. monocytogenes*'e uygulanması gereken ısıtıl işlem süresini %0,1 LOY ilavesi %6,25 azaltırken %0,2 LOY ilavesi ise %12,5 kısaltmıştır. Araştırma sonuçları incelendiğinde seçilen sıcaklık değerlerinin hepsinde LOY ilavesinin uygulanması gereken ısıtıl işlem süresini düşürdüğü hatta LOY konsantrasyonu %0,1'den %0,2'ye çıkarıldığında sürenin daha çok kısaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre *L. monocytogenes*'in başlangıçtaki sayısında 5 log birimi azalma olması için uygulanması gereken ısıtıl işlem süresindeki yüzdelik değişim en

çok 60°C’de %0,2 LOY ilave edilmesiyle %42,5 oranında tespit edilmiştir (Şekil 4.14.)



Şekil 4.14. Dört farklı sıcaklıktaki (55°C; 57,5°C; 60°C; 62,5°C) ısıtma işlemi uygulanan elma suyu içindeki *L. monocytogenes* popülasyonunun zamana bağlı değişimi

Char ve ark. (2010)’de portakal suyu içindeki *L. monocytogenes* sayısının 5 log azalması için 57, 59 ve 61°C’de ısıtma işlemi uygulanmış, D değerlerini 6,2; 3,8 ve 2,3 dak. hesaplamış ve aynı işlemi 25 ppm sitral ilavesiyle tekrarladığında D değerlerini 3,8; 2,8 ve 1 dak. hesaplamıştır. 57-59 °C sıcaklık aralığında inaktivasyonu sitral ilavesi artırırken, 61°C’de ise sitral ilavesinin etkisinin azaldığı sıcaklığın etkisinin fazla olduğu belirtilmiştir.

4.4.2. *L. monocytogenes* eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

Çalışmada elma suyuna inoküle edilen *L. monocytogenes* üzerine, %0,1 ve %0,2 LOY ilavesinin etkisi dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60 ve 62,5°C) hesaplanmıştır. Isıl işlem sonucunda canlı kalan hücre sayısı log birime çevrilmiş, her bir tekerrür için GlnaFiT (MS Excel, GlnaFiT version 1.6) programı kullanılarak Log-lineer (Bigelow ve Easty, 1920) ve Weibull (Mafart ve ark., 2002) modele uyumlanan D değerleri hesaplanmıştır (Geeraerd ve ark., 2005). Dört farklı sıcaklıkta ısıl işlem uygulanması sonucunda *L. monocytogenes*'in zamana bağlı verileri GlnaFit programında Log-lineer modele göre uyumlanarak 4 Desimal azalma, r^2 ve Tahmin Hatalarının Standart Sapması (RMSE) değerleri ile Weibull modele uyumlanarak 4 Desimal azalma, r^2 , RMSE değerleri ile δ ve p parametreleri elde edilmiştir. Çalışmada r^2 değeri Log-Lineer model için en düşük 0,91 iken Weibull model için ise 0,95'dir, RMSE değeri ise Log-Lineer model için en yüksek 0,70 iken Weibull model için 0,52'dir ve tahmini hataların standart sapmasının daha azdır. r^2 ve RMSE değerlerinin sonucuna göre *L. monocytogenes* için veriler Weibull modele daha uyumludur. *L. monocytogenes*'e ait verilerin Weibull modele uyumlanması ile hesaplanan δ ve 4 Desimal azalma süreleri her sıcaklık değerinde LOY ilavesi ile azalmış ve LOY %0,2'ye çıkarıldığında %0,1'e göre daha da düşmüştür. Weibull model sıcaklığın etkisine göre hazırlanan bir model olduğu için bu çalışmada *L. monocytogenes*'e ısıl işlem uygulamasında hesaplanan veriler Log-Lineer modele göre Weibull model daha uyumludur (Tablo 4.10., 4.11.).

Weibull modelde tüm mikrobiyal popülasyonun uygulanan ısıl işleme eşit oranda dirençli olmadığını ve ısıl işlem sırasında her hücrenin aynı anda yok edilmediğini göz önünde bulundurur. Hayatta kalma eğrisi, her bir organizmanın belirli bir zamanda inaktive edildiği ve 55-58°C aralığında genellikle $p < 1$ ve farklı sürelerde inaktive edilen popülasyonun sonucunda daha büyük oranda dirençli organizma kalacağı gözlemlenirken, sıcaklık 60-62°C'ye çıktığında ise popülasyonun çok büyük kısmının kısa sürede inaktive olurken geriye çok küçük oranda direnci daha yüksek hücre kalmaktadır (Roda ve ark., 2012).

Tablo 4.10. *L. monocytogenes*'e ait verilerin Log-Lineer modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları

Isıl işlem sıcaklığı	LOY Konsantrasyonu (%)	Log-Lineer		
		4D Azalma (dak.)	r^2	RMSE
55°C	0	51,30±0,42	0,97±0,01	0,29±0,04
	0,1	46,50±0,42	0,92±0,00	0,60±0,00
	0,2	42,00±0,00	0,91±0,00	0,70±0,01
57,5°C	0	7,25±0,07	0,98±0,02	0,24±0,17
	0,1	5,00±0,15	0,99±0,01	0,28±0,04
	0,2	4,76±0,00	1,00±0,00	0,19±0,01
60°C	0	6,30±0,09	0,97±0,01	0,30±0,05
	0,1	4,62±0,00	0,99±0,00	0,26±0,00
	0,2	3,78±0,00	1,00±0,00	0,18±0,03
62,5°C	0	2,50±0,02	0,97±0,00	0,37±0,06
	0,1	2,44±0,00	0,99±0,00	0,29±0,03
	0,2	1,96±0,02	0,99±0,00	0,25±0,01

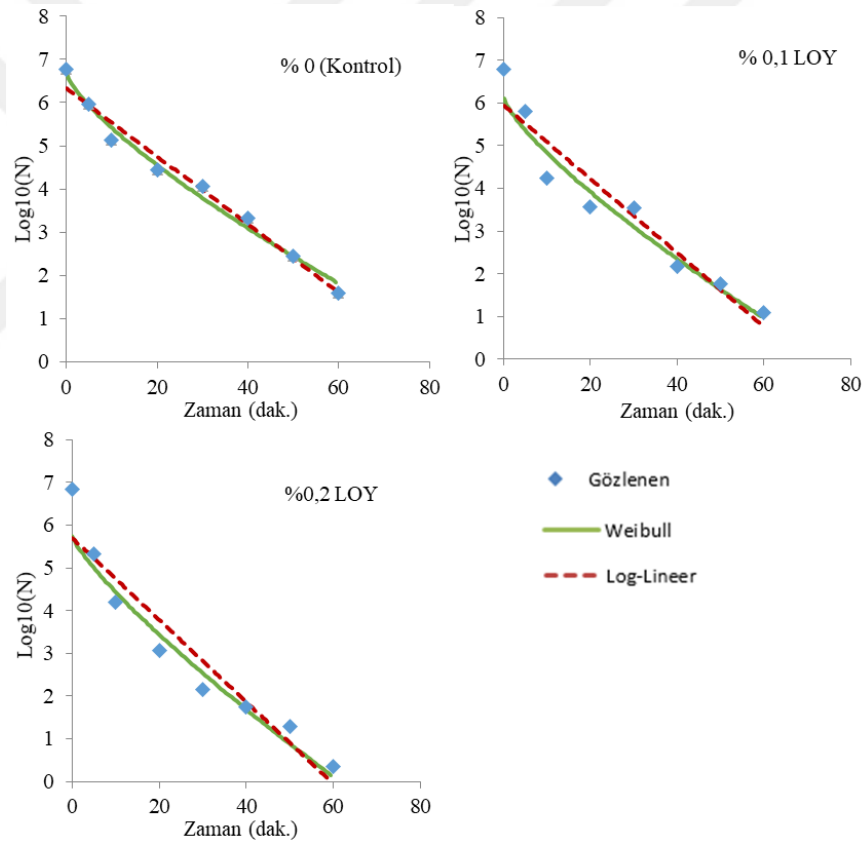
Tablo 4.11. *L. monocytogenes*'e ait verilerin Weibull modeline uyumlanması ile yapılan hesaplama sonuçları

Isıl işlem sıcaklığı	LOY Konsantrasyonu (%)	Weibull				
		4D Azalma (dak.)	r^2	RMSE	δ	ρ
55°C	0	46,50±0,42	0,99±0,00	0,24±0,07	7,28±0,20	0,75±0,00
	0,1	43,8±0,00	0,95±0,00	0,52±0,01	7,36±0,30	0,78±0,01
	0,2	30,90±0,60	0,97±0,03	0,38±0,26	4,06±3,71	0,64±0,20
57,5°C	0	7,45±0,21	0,98±0,02	0,27±0,20	1,83±0,03	1,00±0,01
	0,1	5,21±0,05	0,99±0,00	0,29±0,01	1,51±0,10	1,13±0,08
	0,2	4,62±0,20	1,00±0,00	0,22±0,07	1,10±0,24	0,97±0,11
60°C	0	6,48±0,25	0,97±0,01	0,36±0,02	1,81±0,42	1,10±0,17
	0,1	4,65±0,25	0,99±0,01	0,30±0,03	1,20±0,26	1,03±0,13
	0,2	3,60±0,00	1,00±0,00	0,16±0,05	0,76±0,00	0,90±0,01
62,5°C	0	2,62±0,10	0,96±0,00	0,47±0,05	0,75±0,16	1,10±0,15
	0,1	2,70±0,65	0,97±0,04	0,48±0,26	0,80±0,48	1,11±0,34
	0,2	1,95±0,25	0,97±0,04	0,40±0,39	0,54±0,31	1,09±0,39

Isıl işlem ve bu çalışmada olduğu gibi LOY veya başka esansiyel yağla kombine edilen uygulamalarda, Weibull modeli analiz edildiğinde, direnç modeli yaklaşımını kullandığı belirtilmiştir. Çünkü bütün mikrobiyal populasyonun uygulanan ısı işlem ve kombine yöntemle karşı direncinin eşit olmadığı ve bu sebeple ısı işlem sırasında her hücrenin aynı anda inaktive edilmediği göz önünde bulundurulur. Sonuç olarak hayatta kalma eğrisi, her bir organizmanın farklı zamanlarda inaktive olduğu, bundan dolayı da ısı işleme karşı dirence sebep olan ölümcül olayların zamana göre dağılımının kümülatif şeklidir (Peleg ve Cole, 1998).

55°C'deki Weibull modele uyumlanarak tespit edilen veriler incelendiğinde ρ değeri kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY içeren örnekler için sırasıyla 0,75; 0,78; 0,64 şeklindedir. *L. monocytogenes*'in inaktivasyon eğrileri konveks yapı göstermektedir, bu durum *L. monocytogenes*'in ısı işleme ilk anda dirençli olmadığını fakat süre

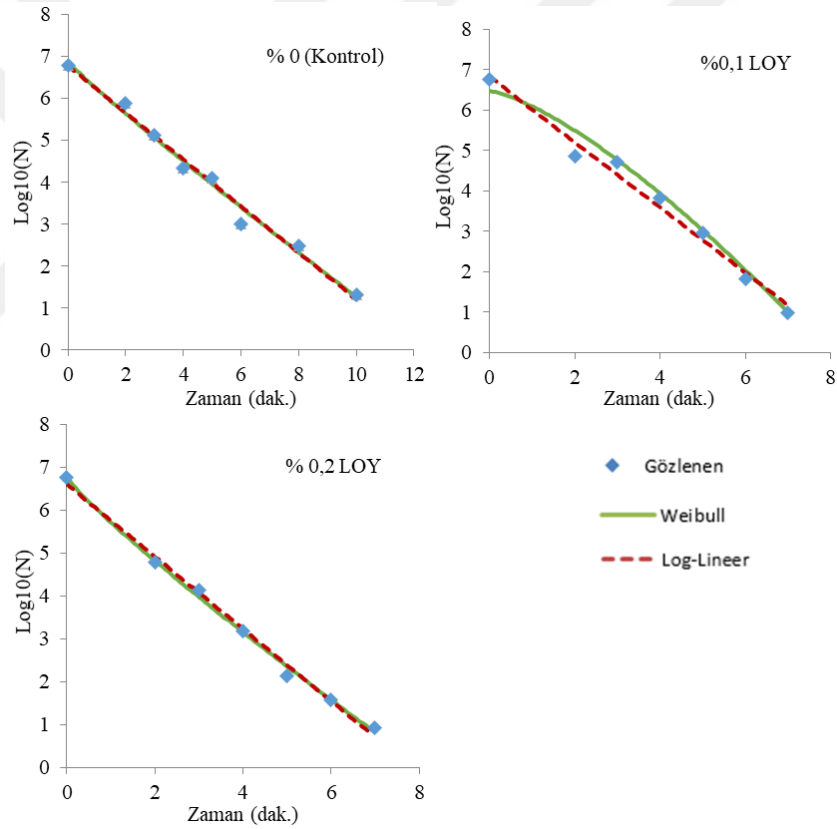
ilerledikçe canlı kalan hücrelerinin direnç kazandığını gösterir ($p < 1$), bu sıcaklık değerinde bakterinin ısıtılma işlemi karşı direncinin kırılmasında LOY ilavesinin etkisinin az olduğu saptanmıştır. Kontrol (%0 LOY) örneğinde r^2 değeri 0,99 ve RMSE değeri 0,24 olduğu için veriler Weibull modele daha uyumludur. δ değeri 7,28 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 4,06 dak.'ya düşmüş ve bakterinin ilk andaki direncini kırıp ilk log azalması için uygulanması gereken ısıtılma işlem süresi %44,23 azalmıştır. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 0,97 ve RMSE değeri 0,29 olan kontrol (%0 LOY) örnekler için hesaplanan veriler daha güvenilir olup her iki modelde de 55°C ısıtılma işlem uygulamasında kontrol (%0 LOY) örneklerinde 4 Desimal azalma için daha güvenilir sonuca ulaşılmıştır (Şekil 4.15.; Tablo 4.10., 4.11.).



Şekil 4.15. 55°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

57,5°C'deki *L. monocytogenes*'in Weibull modele uyumlanmasıyla elde edilen verilere göre p değeri kontrol (%0 LOY) örneği için 1,00 (lineer) iken %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örneklerde ise sırasıyla 1,13 (konkav) ve 0,97 (konveks) şeklindedir. Isıtılma işlem sıcaklığı 57,5°C'ye artırıldığında ise *L. monocytogenes*'in ısıtılma işlemi

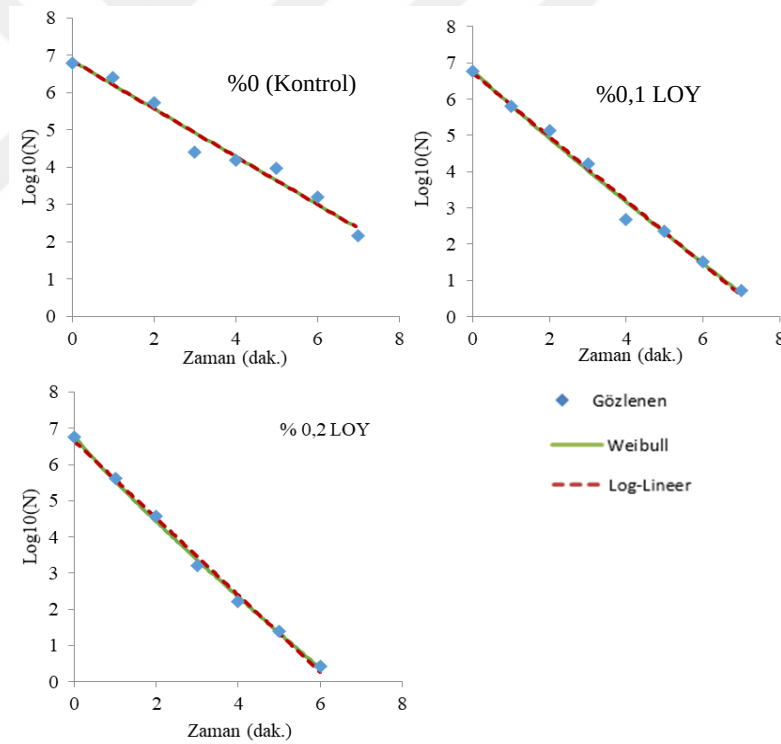
direncinin kontrol (%0 LOY) ve %örneklerinde ısıt işlem süresi boyunca sabit olduğu, %0,1 LOY ilavesinde ilk anda daha dirençliken %0,2 LOY ilavesi ile bu direncin biraz da olsa kırılmaya başladığı belirlenmiştir. %0,2 LOY ilavesinde r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,22 olduğu için veriler modele diğer örneklerle göre daha uyumludur. δ değeri 1,83 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 1,10 dak.'ya azalmış ve ısıt işleme karşı oluşan ilk direncin kırılması için uygulanması gereken ısıt işlem süresinde %39,90'lık azalma saptanmıştır. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,19 ile %0,2 LOY ilavesinde verilerin modele daha uyumlu olduğu görülmüş ve her iki model de 57,5°C için %0,2 LOY ilavesinde 4 Desimal Azalma için daha güvenilir değer vermiştir (Şekil 4.16.; Tablo 4.10., 4.11.).



Şekil 4.16. 57,5°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

60°C'deki Weibull modele uyumlanarak belirlenen sonuçlara göre p değeri kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilmiş örnekler için sırasıyla 1,10 (konkav), 1,03 (lineer) ve 0,90 (konveks) şeklindedir. İnaktivasyon eğrilerinin şeklinin konkav yapıdan konveks yapıya doğru değişmesi; p değerindeki azalma kontrol grubunda

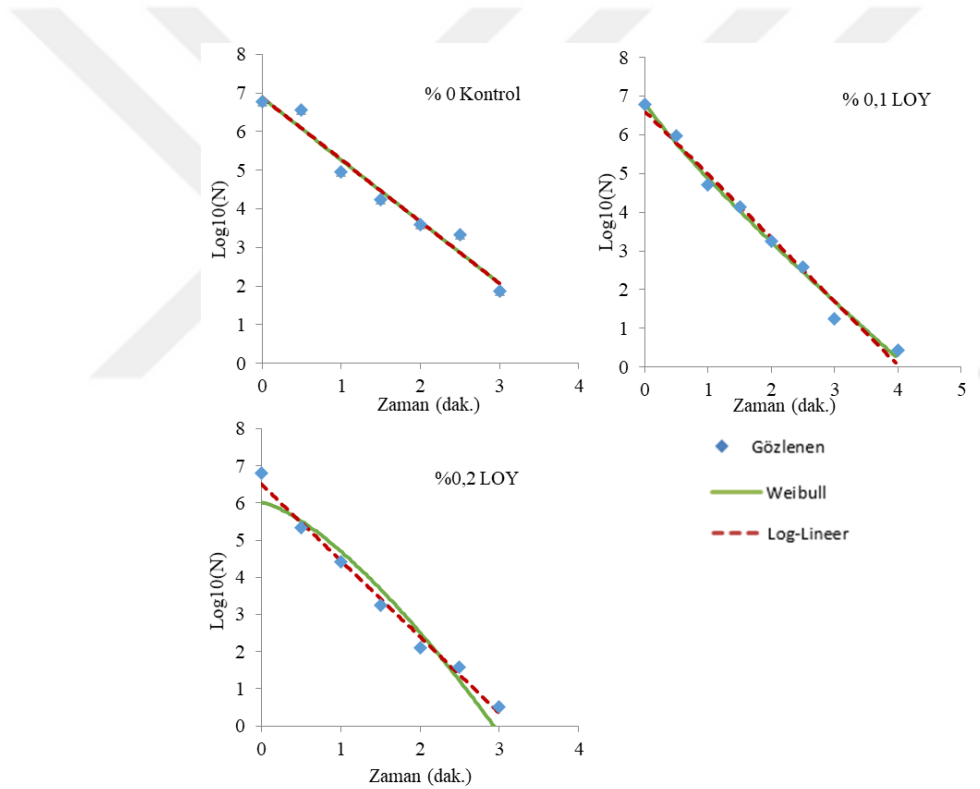
hücreler ısı işlem stresine ilk anda daha dirençliken LOY ilavesi ve LOY'nın konsantrasyonu arttıkça bu ilk andaki direncin kırıldığını ifade etmektedir ve %0,2 LOY ilavesinde süre ilerledikçe kalan canlı hücreler ısı işleme karşı direnç kazanmaktadır. %0,2 LOY ilavesinde r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,16 olarak hesaplanmış olup bu değerler %0,2 LOY içeren örnekte daha güvenilir sonuca ulaşıldığını gösterir. δ değerinin 1,81 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 0,76 dak.'ya düşmesi ise bakterinin ilk andaki ısıl direncini kırmak için uygulanması gereken ısı işlem süresinde %58'lik azalmaya sebep olmuştur. Log-Lineer modelde %0,2 LOY ilavesinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 1,00 ve RMSE değeri 0,18 için veriler modele daha uyumludur. Her iki model için de 4 Desimal Azalma süresinin daha güvenilir hesaplandığı örnek %0,2 LOY ilavesidir. LOY ve sıcaklık arasında ısı işlem süresi boyunca sinerjistik etki saptanmıştır (Şekil 4.17.; Tablo 4.10., 4.11.).



Şekil 4.17. 60°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

62,5°C'deki Weibull modele uyumlanarak hesaplanan *L. monocytogenes*'e ait veriler incelendiğinde ρ değeri kontrol (%0 LOY); %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örneklerde sırasıyla 1,10; 1,11 ve 1,09 yani inaktivasyon eğrisi konkav şeklindedir. Isıl işlem sıcaklığı 62,5°C'ye artırıldığında *L. monocytogenes* ilk anda ısı işleme karşı

dirençliyen ısıt işlem uygulanan süre boyunca bu direnç kırılmıştır. Bu etki daha yüksek sıcaklıkta ısıt işlem uygulanması kaynaklıdır, LOY'nın etkisi çok azdır, %0,2 LOY ilavesinde r^2 değeri 0,97 ve RMSE değeri 0,40 olduğu için diğer örneklere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. δ değeri 0,75 dak.'dan %0,2 LOY ilavesi ile 0,54 dak.'ya düşmüş, bakterinin ilk direncinin kırılması için uygulanması gereken ısıt işlem süresinde %28'lik azalma olmuştur. Log-Lineer modelde elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise r^2 değeri 0,99 ve RMSE değeri 0,25 ile en güvenilir sonucun %0,2 LOY ilavesi olduğu görülmüş ve her iki model de 62,5°C için %0,2 LOY ilavesinde daha uyumlu sonuçlar elde etmiş ve 4 Desimal Azalma için daha doğru değeri vermiştir (Şekil 4.18.; Tablo 4.10., 4.11.).



Şekil 4.18. 62,5°C'de elde edilen inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması

Araştırma sonucunda *L. monocytogenes*'e ait verilerin Log-Lineer ve Weibull modeline uyumlanması ile hazırlanan inaktivasyon eğrilerini sıcaklık derecelerine göre kıyaslırsak, Weibull modele uyumlanan verilerden 57,5°C kontrol (%0 LOY) örneğinin sadece Log-Lineer model ile benzer şekilde lineer yapı gösterdiği saptanılmıştır ($p=1$). 57,5; 60 ve 62,5°C'de *Listeria monocytogenes*'e ısıt işlem uygulamasında üç örnek grubu (kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY) içinde daha esnek olan

Weibull modele uyumlu verilere ulaşılmıştır. 60°C’de *L. monocytogenes*’in δ değerindeki azalış ve ρ değerleri incelendiğinde ısıtma işlemi karşı sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. *L. monocytogenes*’in başlangıç popülasyonundaki sayısının 4 Desimal azalması için uygulanması gereken ısıtma işlem süresi 4 sıcaklık değeri içinde Weibull modele uyumlandığında daha düşük çıkmıştır. Bu durumun sebebi daha esnek olan Weibull modele uyumlanan verilerde ısıtma işlemi ve LOY ilavesinin etkisinin birlikte değerlendirilmesidir.

55-60°C sıcaklık aralığında *L. monocytogenes* ısıtma işlemi uygulanmasına karşı ilk anda daha dirençsizken ısıtma işlem süresi ilerledikçe ortama adapte olmuştur. *L. monocytogenes* hücrelerinin termotoleransı artmış yani ortamdaki stres koşullarına karşı direnç kazanmıştır fakat sıcaklık 62,5°C’ye artırıldığında ise *L. monocytogenes*’in ısıtma işlem ortamına adapte olup direnç kazanma özelliği kırılmıştır ve LOY’nın etkisi diğer sıcaklıklardaki ısıtma işlemi göre azalmıştır.

Tablo 4.12. *L. monocytogenes*’e ait inaktivasyon verilerinin Weibull modele uyumlandığı çalışmalar

Isıtma İşlem Ortamı	T (°C)	δ (dak) (ort.±SS)	ρ (ort.±SS)	Kaynak
Elma suyu	55	1,96±0,05	3,64±0,36	Siguemoto ve ark. (2018)
	60	0,50±0,00	2,47±0,50	
	65	0,04±0,00	0,68±0,02	
	70	0,00±0,00	0,50±0,04	
Karaciğer sosisi	57,2	8,5±5,9	1,2±0,4	Bhaduri ve ark. (1991)
	60	3,2±2,8	1,3±0,6	
	62,8	0,5±1,3	0,9±0,7	
Lahana suyu	50	33,7±3,8	2,8±0,6	Beuchat ve ark. (1986)
	52	7,2±6,2	1,1±0,5	
	54	1,8±0,1	0,9±0,6	
Süt	55	2,5±3,9	0,7±0,3	Chhabra ve ark. (1999)
	60	0,4±0,8	0,7±0,4	
	65	0,3±0,3	1,3±0,9	
Yarım yağlı süt	55	29,89±4,16	1,26±0,13	Roda ve ark. (2012)
	58	10,43±0,85	1,39±0,11	
	60	3,89±0,58	1,32±0,17	
	62	1,87±0,17	1,10±0,09	
Yarım yağlı süt + 1800 ppm vanilin	55	19,37±0,85	1,10±0,07	Roda ve ark. (2012)
	58	6,05±0,20	1,22±0,04	
	60	1,81±0,21	1,02±0,05	
	62	1,21±0,00	0,97±0,08	

Tablo 4.12.’deki çalışmalar incelendiğinde inaktivasyon eğrilerinde konveks yapı gösteren ($p<1$) ısıtma işlem uygulamalarında ilk anda popülasyondaki en hassas organizmaların yok edildiği ve geriye daha dirençli hücrelerin kaldığı bildirilmiştir ve

yüksek sıcaklıkta kısa süreli ısıtma işlem uygulamalarında *L. monocytogenes*'in termal direnci azalmıştır. Konkav yapı gösteren ($p > 1$) durumlarda ise daha düşük sıcaklıklarda ısıtma işlem uygulamaları ile mikrobiyal popülasyondaki hasar birikmekte ve hayatta kalan hücreler giderek daha fazla savunmasız hale gelmektedir (Peleg ve Pechina, 2000). Paga'n ve ark. (1997) ile Rowan ve Anderson (1998), *L. monocytogenes* için yaptıkları çalışmalarda inaktivasyon eğrisinin şeklinin yani p parametresinin büyük ölçüde hücrelerin gelişme sıcaklığına göre değiştiğini ve ısıtma işlem şokundan sonra hücrelerin daha yüksek termotolerans gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca *L. monocytogenes*'in termal direnci suşa göre farklılık gösterebilir (Edelson-Mammel ve ark., 2005).

Log-lineer modele uyumlu inhibitör içeren seçici besiyerinde hayatta kalma eğrilerinde sıcaklık artışı ile hücrenin termal şoku artmakta ve desimal azalma süresi düşmektedir (Carlier ve ark., 1996).

L. monocytogenes 'e yarım yağlı sütte ısıtma işlem uygulanması sonucunda elde edilen verilerin Weibull modele uyumlanmasıyla yapılan çalışmada ortama farklı oranlarda vanilin (900, 1400, 1800 ppm) ilave edilmiş ve 55-58°C gibi düşük sıcaklıklarda ortamdaki vanilinin inhibitör etki göstererek popülasyonu inaktif hale getirdiği; sıcaklığın 60-62°C'ye artırıldığında ise canlı popülasyonunun çok büyük bir kısmının çok kısa sürede yok edildiği geriye çok düşük oradan daha yüksek dirence sahip hücrelerin kaldığı rapor edilmiştir. Ilımlı ısıtma işlem ile kombine edilene vanilin vb. inhibitör maddelerin yarım yağlı sütte *L. monocytogenes* inaktivasyonunu artırmada sinerjistik etkisi olduğu belirtilmiştir (Roda ve ark., 2012). Bu çalışmada ise aynı sıcaklık aralıklarında LOY konsantrasyonunun etkisi üzerine sonuçlar benzerdir, düşük sıcaklıklarda ısıtma işlemde LOY bakterinin direncinin kırılmasına yardımcı olurken sıcaklık 62,5°C'ye çıkarıldığında LOY'ın etkisi azalmıştır. Ilımlı ısıtma işlem ve esansiyel yağın kombine edilerek bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda bu etkinin düşük sıcaklıklarda (55-60°C) sinerjistik etki gösterdiği, 62°C'den yüksek sıcaklıklarda ise ısıtma işleminin tek başına öldürücü etkisi olduğu belirtilmiştir (Edelson-Mammel ve ark., 2005).

4.4.3. *L. monocytogenes*’in elma suyundaki D değerleri

Bu araştırmada elma suyuna farklı konsantrasyonlarda ilave edilen (%0,1 ve %0,2) LOY içeren örneklerin ve kontrol (%0 LOY) örneğinin dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60 ve 62,5°C) *L. monocytogenes* varlığında ısıtılma tabi tutulması sonucu elde edilen veriler Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanarak D değerleri (dak.) hesaplanmış olup Tablo 4.13.’de verilmiştir. Her sıcaklık değerinde ayrı ayrı LOY ilavesinin D değerinin azalmasında istatistiki olarak öneminin olup olmadığı One-Way ANOVA, Duncan (Post Hoc) çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($p<0,05$).

55°C’deki elma suyunun inaktivasyon eğrilerinin Log-Lineer modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol (%0 LOY) örnekleri için 12,71 dak., %0,1 LOY ilave edilen örnekler için 11,57 dak., %0,2 LOY ilave edilen örneklerde ise 10,41 dak. hesaplanmıştır ($r^2>0,91$). Log-Lineer modele uyumlanarak hesaplanan D değerlerinde farklılığın hangi kategoriden kaynaklandığı Duncan çoklu karşılaştırma testi sonucunda; kontrol ve %0,1 ve 0,2 LOY ilave edilen örnekler arasında istatistiki olarak anlamlı farklılığın olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri ise; kontrol örnekleri için 11,63 dak., %0,1 LOY ilave edilen örneklerde 10,95 dak. ve %0,2 LOY ilave edilen örneklerde 7,73 dak. olarak hesaplanmıştır ($r^2>0,95$). Weibull modelinde ise kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY ilavesinde D değerlerinin istatistiki olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($p> 0,05$). Log-Lineer modele uyumlanan D değerleri için LOY ilavesi ile kontrol örnekleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunurken Weibull modelde bulunmamasının nedeni Weibull modelin ısıtılma işlemin etkisine karşı daha esnek olması ve Log-Lineer model için bu durumun olmaması, Log-Lineer modelde sadece LOY ilavesinin etkisinin değerlendirilmesidir (Tablo 4.13.).

57,5°C’de inaktivasyon eğrilerinin Log Lineer modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 1,80; 1,24 ve 1,18 dak. ($r^2>0,98$) belirlenmiş ve LOY konsantrasyonları arasında istatistiki olarak fark bulunmazken ($p>0,05$) bunlar ile kontrol grubu arasında D değerleri istatistiki olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen

D değerleri ise kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 1,87; 1,31 ve 1,16 dak. belirlenmiştir ($r^2 > 0,98$) ve değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Her iki model içinde LOY ilavesinde yakın D değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.13.).

60°C’de belirlenen inaktivasyon eğrilerinin Log Lineer ve Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 1,56; 1,14; 0,94 dak. ($r^2 > 0,97$) ve 1,62; 1,17 ve 0,90 dak. ($r^2 > 0,97$) belirlenmiştir. Yapılan çalışmadaki verilerin her iki modele uyumlanması sonucu kontrol ve %0,1 ve %0,2 LOY ilave edilen örnekler arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). 60°C sıcaklıkta ısıtıl işlem uygulanması ve LOY ilavesi sırasında sinerjistik etki belirlenmiştir (Tablo 4.13.)

62,5°C’deki inaktivasyon eğrilerinin Log Lineer ve Weibull modele uyumlanması sonucu elde edilen D değerleri; kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY örnekleri için sırasıyla 0,62; 0,61 ve 0,53 dak. ($r^2 > 0,96$) ve 0,66; 0,58 ve 0,49 dak. ($r^2 > 0,97$) olarak belirlenmiştir. Elma suyuna %0,1 ve 0,2 LOY ilavesi ile kontrol örnekleri karşılaştırıldığında *L. monocytogenes*’in iki modele de uyumlanarak hesaplanan D değerleri arasında istatistiki fark yoktur ($p < 0,05$). Bu durum 62,5°C’de ısıtıl işlem uygulanmasının *L. monocytogenes*’e karşı yüksek bir sıcaklık değeri olduğunu, LOY varlığına gerek olmadan *L. monocytogenes*’in ısıtıl işlem uygulanması ile inaktive edilebileceğini göstermektedir (Tablo 4.13.).

Tablo 4.13. *L. monocytogenes*'in Log-Lineer ve Weibull modele göre hesaplanan D değerleri

Isıl işlem sıcaklığı	LOY Konsantrasyonu (%)	Log-Lineer	Weibull
		D Değeri (dak.)	D Değeri (dak.)
55°C	0	12,71±0,11 ^a	11,63±0,10 ^a
	0,1	11,57±0,07 ^b	10,95±0,00 ^a
	0,2	10,41±0,08 ^c	7,73±2,65 ^a
57,5°C	0	1,80±0,02 ^a	1,87±0,04 ^a
	0,1	1,24±0,04 ^b	1,31±0,01 ^b
	0,2	1,18±0,00 ^b	1,16±0,05 ^c
60°C	0	1,56±0,02 ^a	1,62±0,06 ^a
	0,1	1,14±0,00 ^b	1,17±0,06 ^b
	0,2	0,94±0,00 ^c	0,90±0,00 ^c
62,5°C	0	0,62±0,00 ^a	0,66±0,03 ^a
	0,1	0,61±0,00 ^a	0,58±0,02 ^{ab}
	0,2	0,53±0,06 ^a	0,49±0,06 ^b

(a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sütunda farklı harflerle gösterilen D değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05; n=2).

Mazzotta (2001) pH'ı 3,9 olan elma suyunda yapılan çalışmada *L. monocytogenes*'in D değerlerini 56, 60 ve 62°C için sırasıyla 1,59, 0,45 ve 0,17 dak., aynı koşullarda ortak suyu için D değerlerini 2,05; 0,49 ve 0,21 dak., beyaz üzüm suyunda ise 2,29; 0,59 ve 0,29 dak. hesaplamıştır. Gabriel ve Nakano (2009) ise elma suyunda 55°C' de D değerini 1,32 dak. hesaplamıştır. Pagal ve Gabriel (2020) portakal suyunda (pH 3,9) 50, 53, 55, 57, 60°C' de ısıtım işlemi sonucunda *L. monocytogenes*'in termal inaktivasyonuna ait D değerlerini sırasıyla 2,53; 0,85; 0,72; 0,40 ve 0,20 dak. rapor etmiştir. Topalcengiz ve ark. (2019) yılında nar suyunda yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes* için hesaplanan D değerlerini 50, 52 ve 54°C'de sırasıyla 4,09; 2,56 ve 1,56 dak. olarak belirlemiştir. Munoz ve ark. (2010) TSBYE besiyeri ortamında 55; 57,5; 60 ve 62,5°C'de ısıtım işlemi uyguladıkları *L. monocytogenes* için D değerlerini 17,4; 4,7; 1,2 ve 0,4 dak. hesaplamıştır. Carlier ve ark. (1996) jambonda *L. monocytogenes* varlığını inhibe edebilmek için ise D değerini 55 ve 60°C için 19,2 ve 3,48 dak. olarak hesaplamıştır. Aynı sıcaklık değerlerinde farklı D değerleri elde edilmesinin nedeni, ısıtım işlemi uygulanan besiyeri ortamının pH'ı, kimyasal bileşimi, *L. monocytogenes*'in suşunun doğasından gelen ve sonradan kazandığı özellikleri ve ısıtım işleme karşı uyguladığı direnç bağıdır (Pagal ve Gabriel, 2020).

L. monocytogenes'in suştan kaynaklanan ısıtım direnç farklılıklarını belirlemek için Aryani ve ark. (2015) 12 farklı suşla çalışmışlardır. Brain Heart Infusion (BHI) besiyeri ortamında *L. monocytogenes* suşlarında D değerlerini 55, 60 ve 62,5°C için ortalama olarak 15,9; 1,43 ve 0,18 hesaplamıştır. *L. monocytogenes*'in termal

direncinin suştan etkilendiği belirtmiştir. Hücrelerin termal direncinde fizyolojik durumu, büyüme geçmişi sırasında ortamın stres koşullarına (tuz konsantrasyonu, pH, formülasyondaki yağ miktarı vb.) adaptasyonunun etkili olduğunu rapor etmiştir.

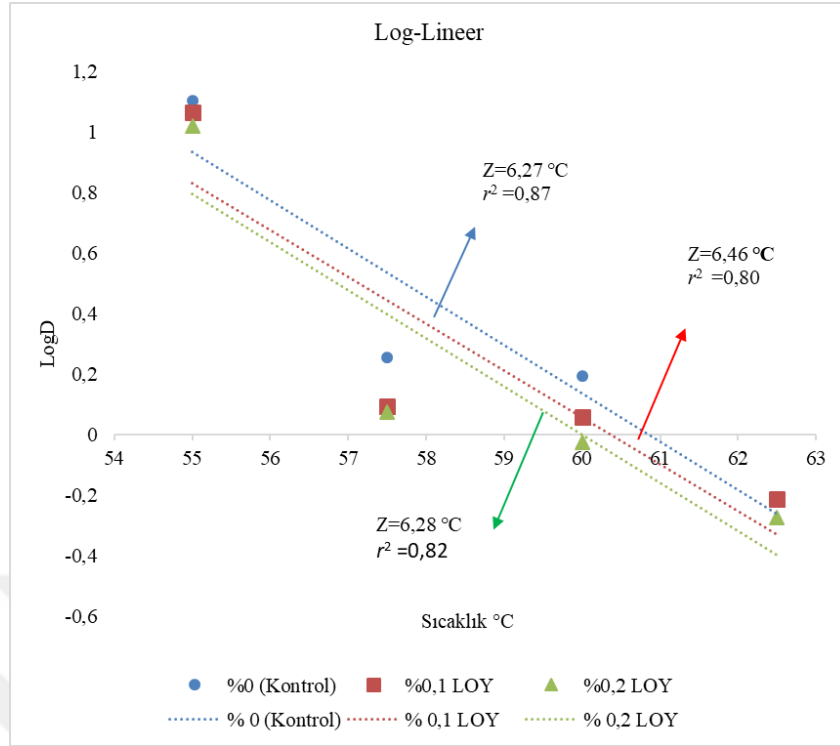
4.4.4. *L. monocytogenes*'in elma suyundaki z değeri

Farklı sıcaklıklarda ısıtıl işlem uygulanan elma suyunda (%0; 0,1 ve 0,2 LOY) elde edilen *L. monocytogenes*'e ait veriler Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanmış ve hesaplanan D değerlerinin logaritması sıcaklığa bağlı olarak grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.19.-4.20.). Bu eğrinin eğiminin negatif tersinden z değeri Tablo 4.14.'deki şekilde hesaplanmıştır. 55-62,5°C aralığındaki ısıtıl işlem uygulaması sonucu z değerleri; Log-Lineer modele uyumlan değerler için 6,46 ile 6,27°C arasındayken Weibull modele uyumlanan değerler için ise 6,74 ve 6,43°C arasında hesaplanmıştır (Tablo 4.14).

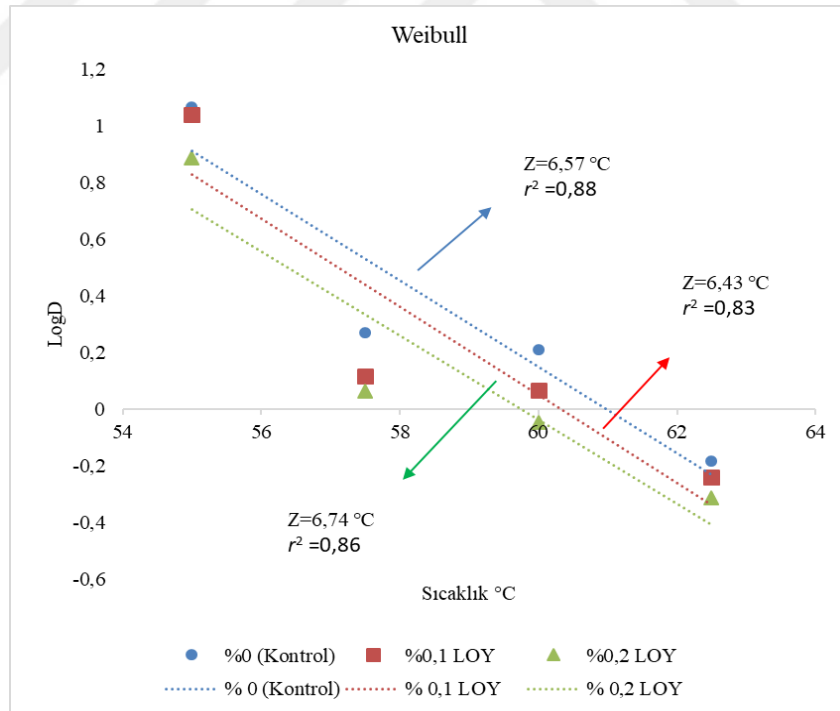
Tablo 4.14. *L. monocytogenes*'in Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanması ile hesaplanan z değerleri

LOY Konsantrasyonu (%)	Log-Lineer	Weibull		
	z değeri	r^2	z değeri	r^2
0	6,27	0,87	6,57	0,88
0,1	6,46	0,80	6,43	0,83
0,2	6,28	0,82	6,74	0,86

Limon otu yağı ilavesinin elma suyunda ısıtıl işlem uygulaması ile kombine edilmesinin *L. monocytogenes*'in inaktivasyonu üzerine bir etkisi olmasına rağmen, z değerleri incelendiğinde sıcaklığa duyarlılığını değiştirmedeği tespit edilmiştir. Log-Lineer ve Weibull modellerine uyumlanarak hesaplanan D değerlerine göre 60°C'ye kadar olan ısıtıl işlem uygulamalarında LOY'nın etkisi görülmüş ve sıcaklık 62,5°C çıkarıldığında ise LOY'nın etkisi önemsiz bulunmuştur. Bu etki LOY eklenmesi ile belirli bir sıcaklığa kadar *L. monocytogenes*'in ısıya karşı direncinin kırıldığını fakat sonrasında etkili olmadığını ve *L. monocytogenes*'in hem ısıtıl işlem hem de LOY ilavesine karşı dirençli olduğunu göstermiştir. Ayrıca Şekil 4.19 ve 4.20.'deki eğrilerin birbirine paralel olması LOY ilavesinin bakterinin ısıtıl işleme karşı olan direncinin kırılmasında etkisinin az olduğunu göstermektedir. z değerlerinin kontrol ve LOY ilave edilen örneklerde birbirine yakın olması sonucu bu durum doğrulanmıştır.



Şekil 4.19. *L. monocytogenes* 'in Log-Lineer modele göre hesaplanan z değerleri



Şekil 4.20. *L. monocytogenes* 'in Weibull modele göre hesaplanan z değerleri

Tablo 4.15. *L. monocytogenes*'in z değeri ile ilgili literatür verileri

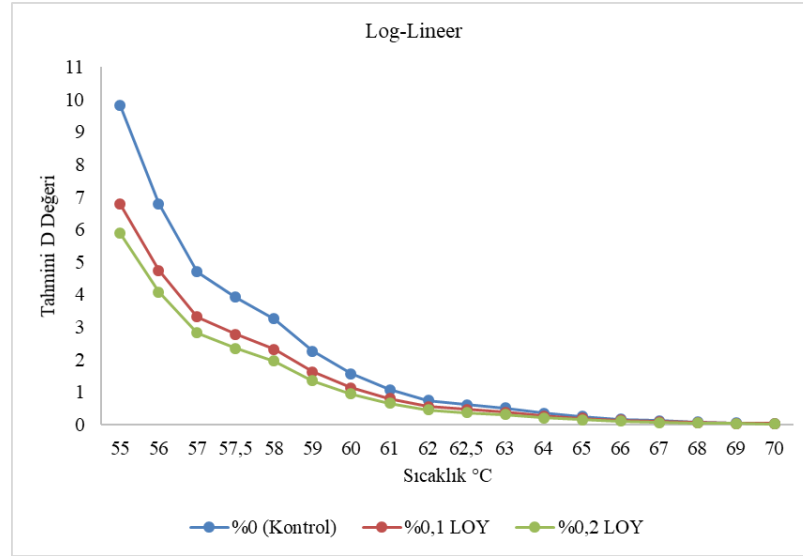
Isıl İşlem Ortamı	z değeri (°C)	Kaynak
Elma suyu	6,17	Siguemoto ve ark. (2018)
Elma suyu	6,3	Mazzotta (2001)
Portakal suyu	6,0	Mazzotta (2001)
Portakal suyu	9,40	Pagal ve Gabriel (2020)
Beyaz üzüm suyu	6,6	Mazzotta (2001)
Yarım yağlı süt	6,13	Roda ve ark. (2012)
Yarım yağlı süt +1800 ppm vanilin	6,12	Roda ve ark. (2012)
Yarım yağlı süt + 900 ppm vanilin	6,48	Roda ve ark. (2012)
Jambon	6,74	Carlier ve ark. (1996)
BHI Broth	5,1	Aryani ve ark. (2015)
TSBYE	6,17	Munoz ve ark. (2010)

Listeria monocytogenes'in ısıl direnci ile ilgili yapılan çalışmalarda çok farklı sonuçlar elde edilmiş ve Tablo 4.15.'de belirtilmiştir. Literatür çalışmasında geniş sıcaklık aralığında hesaplanan z değerindeki değişimin bakterinin en duyarlı suşuna göre değiştiği tespit etmiştir (Aryani ve ark., 2015). Bakterinin sıcaklıktaki değişime ne kadar duyarlı olduğu z değeri ile belirlenmektedir (Roda ve ark., 2012). *L. monocytogenes* ısıl işlem ve LOY gibi ortama inhibitör madde ilavesine dirençli olduğu için bu çalışmada bütün örneklerde z değeri için birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan literatür çalışmasında hesaplanan z değerleriyle bu çalışma sonucu hesaplanan z değerleri yakın bulunmuştur. LOY'nın *L. monocytogenes*'in direncinin azalması üzerine etkisi sabittir.

4.4.5. *L. monocytogenes*'in elma suyundaki tahmini D değerleri

4.4.5.1. *L. monocytogenes*'in Log-Lineer modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri

Çalışmada 60°C için hesaplanmış olan Log-Lineer modele uyumlanan D değeri, Bolton ve ark. (2013) tarafından hazırlanan denklem 3.5.'de yerine yazılarak diğer sıcaklıklardaki tahmini D değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.21. Tablo 4.16.).



Şekil 4.21. *L. monocytogenes*'in Log-Lineer modele göre hesaplanan tahmini D değerleri

Elma suyundaki *L. monocytogenes*'e ait verilerden hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY içeren örnekler için göre Tablo 4.16.'ya aktarılmıştır. 55°C' de üç örnek grubu (kontrol, %0,1 ve %0,2 LOY) için de gözlenen D değeri tahmini D değerinden daha yüksek çıkmıştır. Bu durum *L. monocytogenes*'in 55°C gibi daha düşük ılımlı sıcaklık uygulamalarında ısıtma işlemi karşı direncinin beklenenden daha yüksek olması ve bakteride daha az termal stres oluşmasıyla açıklanabilir. 57,5°C'de ise üç örnekte de gözlenen D değerleri tahmini D değerlerinden daha düşüktür. Sıcaklık artışı ile birlikte LOY ve ısıtma işlemi uygulaması arasında sinerjistik etki oluşmuş, *L. monocytogenes* tahmin edilen durumdan daha kolay bir şekilde inaktive edilmiştir. 62,5°C'de ısıtma işlemi uygulamasında *L. monocytogenes*'in termal toleransı azalmış ve canlı hücreler daha kısa sürede inaktif hale gelmiştir. Bu sıcaklıkta LOY ilavesinin bakterinin ısıtma direncinin kırılmasına karşı önemli bir etkisi olmadığı görülmüş olup ısıtma işlemi uygulanan sıcaklık değerinin etkisi fazla olduğu için tahmini ve gözlenen D değerlerinde yakın sonuçlara ulaşılmıştır.

Tablo 4.16. *L. monocytogenes* 'in Log-Lineer modele uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri

Log-Lineer						
	%0 (Kontrol)		%0,1 LOY		%0,2 LOY	
Sıcaklık °C	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen
55	9,81	12,71	6,78	11,57	5,89	10,41
56	6,80		4,74		4,08	
57	4,71		3,32		2,83	
57,5	3,92	1,80	2,78	1,24	2,36	1,19
58	3,26		2,33		1,96	

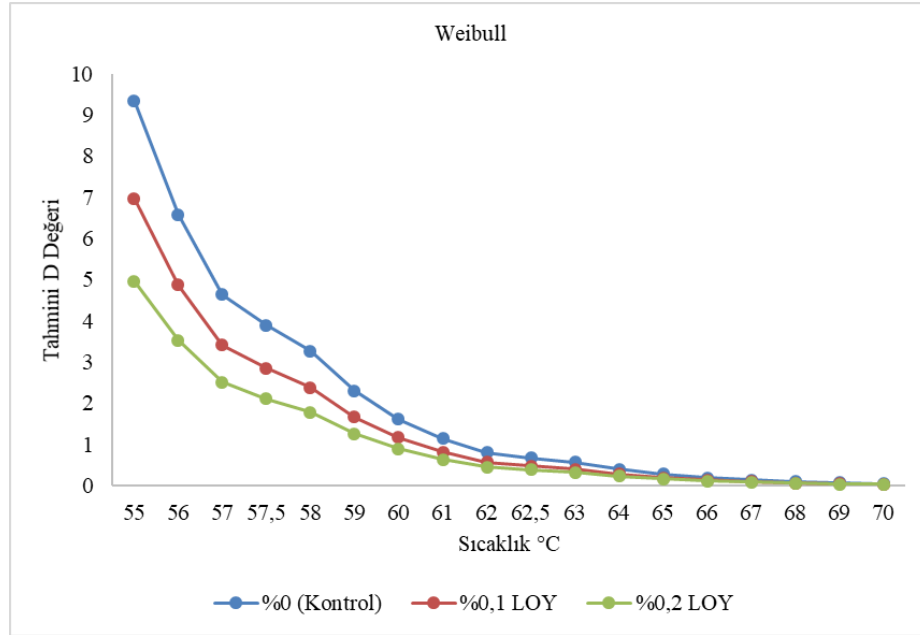
Tablo 4.16. (Devamı)

59	2,26		1,63		1,36	
60	1,56	1,56	1,14	1,14	0,94	0,94
61	1,08		0,80		0,65	
62	0,75		0,56		0,45	
62,5	0,62	0,62	0,47	0,61	0,38	0,53
63	0,52		0,39		0,31	
64	0,36		0,27		0,22	
65	0,25		0,19		0,15	
66	0,17		0,13		0,10	
67	0,12		0,09		0,07	
68	0,08		0,07		0,05	
69	0,06		0,05		0,03	
70	0,04		0,03		0,02	

Tahmini D değerlerinin hesaplanmasında 60°C'deki D değeri referans olarak kullanılmıştır.

4.4.5.2. *L. monocytogenes*'in Weibull modeline uyumlanması ile elde edilen tahmini D değerleri

4.4.5.1.'de anlatıldığı biçimde Weibull modele uyumlanarak hesaplanan D değerlerinden z değeri hesaplanmıştır. z değeri ve 60°C için Weibull modele uyumlanarak hesaplanmış D değerine ait veriler Bolton ve ark. (2013) tarafından hazırlanan denklem 3.5.'de yerine koyulmuş ve tahmini D değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. *L. monocytogenes*'in Weibull modele göre hesaplanan tahmini D değerleri

Kontrol (%0 LOY), %0,1 ve %0,2 LOY örneklerine ait elma suyundaki *L. monocytogenes*'in tahmini ve gözlenen D değerleri göre Tablo 4.17.'deki şeklinde hesaplanmıştır. 55°C'de gözlenen D değerleri tahmin edilen D değerlerinden daha yüksektir, *L. monocytogenes* elma suyu ortamında bu sıcaklıkta daha dirençlidir ve %0,2 LOY ilavesi ile bu direnç biraz azalmıştır. 57,5°C'de ılımlı ısıtım işlem uygulaması ve LOY arasında sinerjistik etki olduğundan tahmin edilen D değeri gözlenen D değerinden daha düşük hesaplanmıştır, bakterinin ısıtım direnci LOY etkisi ile kırılmıştır. 62,5°C'de ise LOY ilavesinden çok sıcaklık artışının bakterinin termal direncini daha kolay kırması etkili olmuş, gözlenen ve tahmini D değerleri birbirine yakın hesaplanmıştır. Tahmini ve gözlenen D değerleri arasında fark olmasının nedeni D değerine etki eden faktörler ile aynıdır. Weibull modele uyumlanarak hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri sonuçları ile Log-Linear model için hesaplanan sonuçlar karşılaştırıldığında paraleldir.

Tablo 4.17. *L. monocytogenes* 'in Weibull modele uyumlanması ile hesaplanan tahmini ve gözlenen D değerleri

Weibull						
Sıcaklık °C	%0 (Kontrol)		%0,1 LOY		%0,2 LOY	
	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen	Tahmin	Gözlenen
55	9,34	11,63	6,98	10,95	4,96	7,73
56	6,58		4,88		3,53	
57	4,63		3,41		2,51	
57,5	3,89	1,86	2,85	1,30	2,11	1,16
58	3,26		2,38		1,78	
59	2,30		1,66		1,27	
60	1,62	1,62	1,16	1,16	0,90	0,90
61	1,14		0,81		0,64	
62	0,80		0,57		0,45	
62,5	0,67	0,66	0,48	0,58	0,38	0,49
63	0,57		0,40		0,32	
64	0,40		0,28		0,23	
65	0,28		0,19		0,16	
66	0,20		0,14		0,12	
67	0,14		0,09		0,08	
68	0,10		0,07		0,06	
69	0,07		0,05		0,04	
70	0,05		0,03		0,03	

Tahmini D değerlerinin hesaplanmasında 60°C'deki D değeri referans olarak kullanılmıştır.

Doğruyol ve ark., (2020) somona inoküle edilen *L. monocytogenes*'i inhibe etmek için 55; 57,5; 60 ve 62,5°C ısıtım işlem uygulanmış ve D değerleri sırasıyla 33,38; 9,54; 3,10 ve 1,40 dak. belirlemiştir. Geniş bir aralıktaki D değerini hesaplamaya yarayan Bolton ve ark. (2003) tarafından hazırlanan denklem kullanılarak tahmini D değerleri 55; 57,5

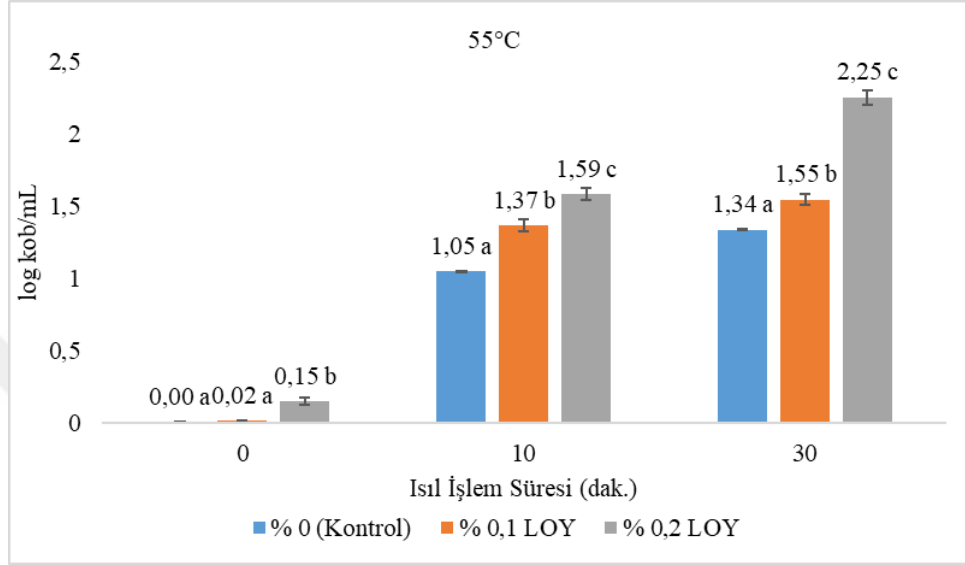
ve 62,5°C için sırasıyla 25,15; 8,84 ve 1,49 dak. hesaplanmıştır. Bu çalışmada olduğu gibi daha düşük sıcaklık uygulamalarında 55-57,5°C’de tahmini D değeri gözlenen D değerinden daha düşük çıkmıştır, bu durumun nedeni besiyeri ortamı, pH, suş farklılığı ve ortamdaki *L. monocytogenes*’in ısıtılma direncine göre değişmektedir. 62,5°C ise bakterinin direnci kırılmış, tahmini ve gözlenen D değerleri birbirine yakın hesaplanmıştır. Yüksek sıcaklıklarda inhibisyon çok hızlı gerçekleştiğinden D değerinin belirlenmesi zordur. *L. monocytogenes*’in tahmini D değerlerini hesaplamak diğer sıcaklıklarda ısıtılma sürelerini hesaplamada yardımcı olacaktır.

4.4.6. *L. monocytogenes*’in membranı zarar görmüş hücre sayısı

Bu çalışmada elma suyundaki *L. monocytogenes*’e karşı dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60; 62,5°C) ılımlı ısıtılma uygulaması ile kombine edilen LOY etkisi tespit etmek için SMPT tekniği kullanılmıştır. Yapılan literatür çalışmasında besiyeri ortamını selektif hale getirmek için TSA + %3 veya 4 (ağırlık/hacim) NaCl ilavesi yapıldığı görülmüştür (Yu ve Fung, 1993; Novak ve Juneja, 2003). Bu çalışmada ise %3 sodyum klorür (NaCl) içeren besiyeri ortamı membranı zarar görmüş hücre sayısını belirlemek için kullanılmıştır. Seçilen sıcaklık değerlerinde sublethal hasar meydana gelecek kadar süre ısıtılma uygulanmıştır. Isıtılma uygulamasından sonra örnekler %0 ve %3 NaCl TSA besiyerinde 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. %0 ve %3 NaCl içeren besiyeri ortamlarında elde edilen sayım sonuçlarının farkından membranı zarar görmüş hücre sayısı (log kob/mL) tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda *L. monocytogenes*’e uygulanan ısıtılma süresi ve LOY konsantrasyonu arttıkça membranı zarar görmüş hücre sayısının arttığı belirlenmiştir.

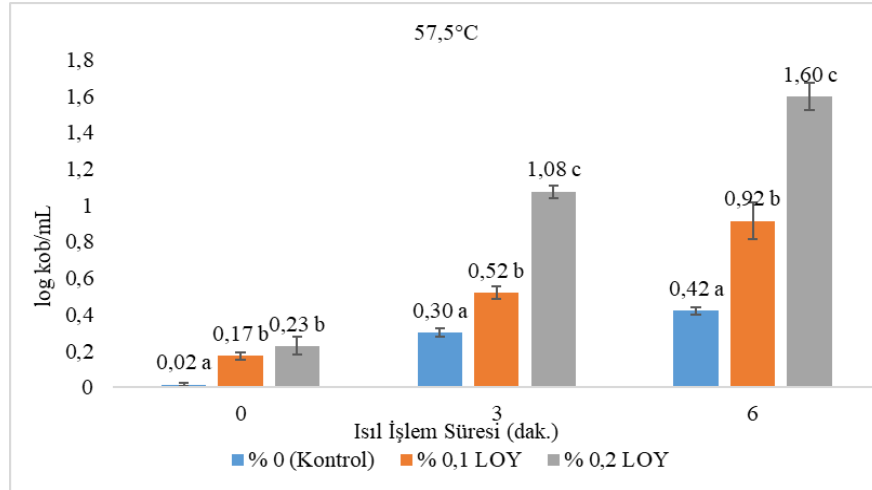
55°C’de ısıtılma tabii tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*’in membranı zarar görmüş hücre sayısında 0, 10 ve 30. dak. için LOY konsantrasyonu kategorilerine kıyasla tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). LOY ilavesinin *L. monocytogenes*’in direncini kırarak membranına zarar verdiği tespit edilmiştir. LOY konsantrasyonu arttıkça membranı zarar gören hücre sayısında artış meydana gelmiştir fakat sadece 30. dak. %0,2 LOY ilavesinde aradaki fark 2 log (kob/mL)’dan fazla olmuştur yani canlı kalan hücre sayısının %90’ından

fazlasının membranı zarar görmüştür. *L. monocytogenes*'in 55°C'de hala ısıl işleme karşı dirençli olduğu ve bu durumun LOY ilavesi ile uzun bir ısıl işlem süresinde kırıldığı anlamına gelir, diğer süre ve LOY ilavesi kombinasyonlarında membranı zarar gören hücre sayısı %90'dan daha azdır (Şekil 4.23.)



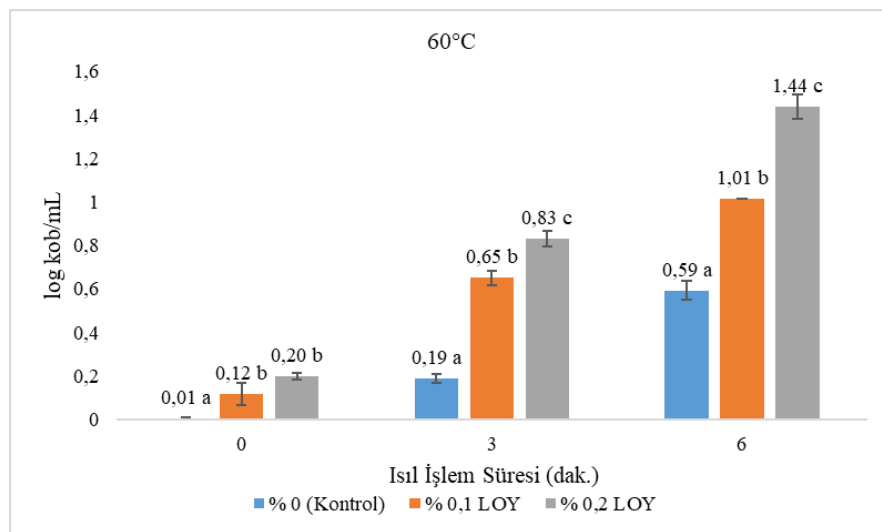
Şekil 4.23. 55°C' de ısıl işleme tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$; $n=2$).

57,5°C' de ısıl işleme tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısında 0, 3 ve 6. dak. için LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0,05$). Isıl işlem süresi ve LOY konsantrasyonu arttıkça membranı zarar gören hücre sayısında artış meydana gelmiştir. Isıl işlem süresi ve LOY konsantrasyonundaki artış bakterinin direncinin kırılmasında sinerjistik etki göstermiş olup bu durum membranı zarar gören hücre sayısındaki artıştan belirlenmiştir. Ancak *L. monocytogenes* ısıl işlem ortamına ve uygulanan ısıl işlem koşullara karşı dirençli bir bakteri olduğu için daha az hücrenin membranı zarar görmüştür (Şekil 4.24.).



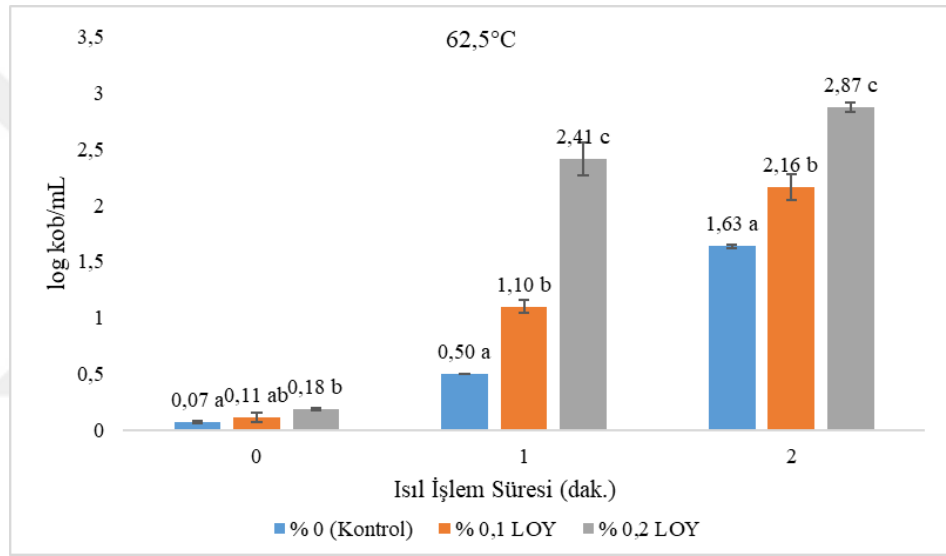
Şekil 4.24. 57,5°C de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).

60°C' de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısında 0, 3 ve 6. dak. için LOY konsantrasyonun kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). Bu sıcaklıkta uygulanan ısıtılma süresi ve LOY konsantrasyonu arttıkça bakterinin direncindeki kırılmaya karşı sinerjistik etki oluşmuş ancak *L. monocytogenes* bulunduğu ortam ve sıcaklığa karşı dirençli bir bakteri olduğu için en fazla membranı zarar gören hücre sayısı 6. dak. ısıtılma süresinde %0,2 LOY varlığında 1,44 log (kob/mL)'yi geçememiştir (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. 60°C de ısıtılma tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayıları arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).

62,5' de ısıtılma işlemine tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısında 0, 1 ve 2. dak. için LOY konsantrasyonu kategorilerine göre tekerrür ortalamaları arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). 1, ve 2. dak.'da %0,2 LOY ilavesinde membranı zarar görmüş hücre sayısındaki fark 2, 41 ve 2,87 log (kob/mL)'dir, bu durum seçilen sıcaklık ve uygulanan ısıtılma işlem sürelerinde *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısındaki en yüksek farktır. Sıcaklık 62,5°C olduğunda ısıtılma işlemi ve LOY arasında *L. monocytogenes*'e karşı sinerjistik etki oluşmuş olup membranı zarar gören hücre sayısı artmıştır, bu sıcaklıkta bakteri ısıtılma ortamına karşı direnç gösterememiştir (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. 62,5°C de ısıtılma işlemine tabi tutulmuş elma suyundaki *L. monocytogenes*'in membranı zarar görmüş hücre sayısı, (a-c): Aynı sıcaklıkta, aynı sürede farklı harflerle gösterilen membranı zarar görmüş hücre sayısı arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$; $n=2$).

Somonilos ve ark. (2008) Mc-Ilvaine's tampon çözeltisinde bulunan *L. monocytogenes*'in membranı zarar gören hücre sayısı belirlenmek için TSA+ %5 NaCl ve Potato Dextrose Agar (PDA) + %7 NaCl ilave edip selektif besiyeri ortamı oluşturmuşlardır. Bu çalışma sonucunda *L. monocytogenes*'in membranı zarar gören hücre sayısının 2 log'dan fazla olduğunu ve bu durumda hayatta kalan hücrelerinin %99'dan fazlasının ölümcül şekilde yaralı olduğunu rapor etmiştir. NaCl'nin besiyeri ortamına selektivite katarak hücrenin sitoplazmik membranına zarar verdiğini böylece osmoregülatör fonksiyonların kaybına sebep olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca *L. monocytogenes* hücrelerinin membranının zarar görmesinde ısıtılma işlemi uygulanan

besiyeri ortamının pH'ı ve bileşimi, sitral ilavesi gibi durumların etkili olduğu tespit edilmiştir.



BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada limon otu yağının elma suyunda *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in ısıl direnci ve termal inaktivasyon kinetiği üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada limon otu yağının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı konsantrasyon (%0 (kontrol), %0,1 ve %0,2) ve zamana bağlı öldürücü etkisi dört farklı sıcaklıkta (55; 57,5; 60 ve 62,5°C) incelenmiştir.

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar limon otu yağının *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in ısıl direncini düşürdüğünü göstermiştir. Antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen inaktivasyon eğrilerinin hem Log-Lineer hem de Weibull modele uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak Weibull modelinin klasik inaktivasyon modelinden daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiş olup termal inaktivasyonun daha gerçekçi bir şekilde modellenmesine ve dolayısıyla gıda güvenliğinin iyileştirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

55°C 'de yapılan çalışmada daha uzun süre ısıl işlem uygulanması gerektiği belirlenirken 57,5°C ve sonraki sıcaklıklarda bakteri direnci azalarak daha kısa sürede inhibe etki görülmüştür. 57,5°C sonrasında limon otu yağı ve ısıl işlem birleşimi *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı sinerjistik etki göstermiştir. Ayrıca ısıl işlem sıcaklığı ve limon otu yağı konsantrasyonu arttıkça membranı zarar görmüş hücre sayısının da arttığı gözlenmiştir. Bu şekilde sinerjistik etki gösteren kombine yöntemler ile hücrelerin hasarını iyileştirip çoğalmasının önüne geçilebilir. Böylece kalite kayıpları aza indirilir ve gıda güvenliği açısından daha iyi ürünler sunulabilir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre limon otu yağı; ısıl işlemle dayanıklı hale getirilen meyve sularında koruyucu olarak kullanılabilir ve daha düşük sıcaklıkta ısıl işlem uygulanmasına olanak sağlayacağından meyve suyunun duyu özelliklerinin

ve besin değerinin korunmasına katkıda bulunabilir. Ayrıca, çalışmada hesaplanan kinetik parametrelerin (D ve z değerleri) gıda endüstrisinde faaliyet gösteren meyve suyu üreticilerine ısııl işlem koşullarının belirlenmesinde yararlı olabileceği düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Ababouch, L.H., Gritmit, L., Eddafry, R., Busta, F.F., 1995. Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 669–676
- Abdulazeez, M.A.; Abdullahi, A.S.; James, B.D. 2016. Lemongrass (*Cymbopogon* spp.) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Preedy, V.R., Ed.; Academic Press: Oxford, UK, 509–516.
- Achir, N. Dhuique-Mayer, C., Hadjal, T., Madani, K., Pain, J.P., Dornier, M. 2016. Pasteurization of citrus juices with ohmic heating to preserve the carotenoid profile. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33, 397–404
- Adhikari, A., Bary, A., Cogger, C., James, C., Ünlü, G., Killinger, K. 2016. Thermal and starvation stress response of *Escherichia coli* O157:H7 isolates selected from agricultural environments. *J. Food Prot.*, Vol. 79, No. 10, 1673–1679.
- Adukwu, E. Bowles, M., Jones, V., Bone, H. 2016. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9619–962.
- Ağçam, E. Akyıldız, A., Dündar, B., 2018. Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices. *Fruit Juices.* 309-338.
- Ahmed, N.M. Conner, D.E., Huffman, D.L. 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.* 60, 606– 610.
- AIJN (European Fruit Juice Association), 2019. Liquid Fruit Market Report.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., Pagán, R., 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12, 320–329.
- Angelo, K. Conrad, A., Saupe, A. 2017. Multistate outbreak of *L. monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. *Epidemiol. Infect.*, 145, 848–856..

- Arocha, M. McVey, M., Loder, S., Rupnow, J., Bullerman, L. 1992. Behavior of Hemorrhagic *E. coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J Food Prot.* 1992 May; 55(5):379-381.
- Arroyo, C., Condón, S., and Pagán, R. 2009. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 110–118.
- Aryani, D.C. den Besten, H.M.W., Hazeleger, W.C., Zwietering, M.H. 2015. Quantifying variability on thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 130–138.
- Attokaran, M. 2011. *Natural Food Flavors and Colorants*. IFT Press, Blackwell Publishing Ltd, Iowa, USA. ISBN: 978-1-119-11476-5.
- Ayala-Zavala, J.F. Del Toro Sanchez, L., Alvarez Parrilla, E., Gonzalez A. 2008. High relative humidity in package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems *J. Food Sci.* 73, R41–R47.
- Baranyi, J. Jones, A., Walker, C., Kaloti, A., Robinson, T.P., Mackey, B.M. 1996. A combined model for growth and subsequent thermal inactivation of *Brochothrix thermosphacta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1029–1035.
- Baskaran, S A. Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. 2010. Inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *Int. J. Food Microbiol.* 126–139.
- Bassolé, I.H.N. Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Obame, O.L.C.; Ilboudo, A.J.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R.C.; Dicko, M.H. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine.* 18, 1070–1074.
- Bell, C. Kyriakides, A. 2009. *L. monocytogenes* foodborne pathogens, hazards, risk analysis and control Blackburn. P. J. McClurre (Eds.). In C. W. 675–717..
- Besser, R. E. Lett, J. T., Weber, M. P., Doyle, T. J., Barrett, J. G., Wells, Griffin. P. M. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *E. coli* O157:H7 in freshpressed apple cider. *JAMA* 269:2217–2220.
- Beuchat, L.R., Bracket, R.E., Hao, D.Y.-Y., Conner, D.E., 1986. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 791–795.
- Bhaduri, S.P.W.S., Palumbo, S.A., Turner-Jones, C.O., Smith, J.L., Marmer, B.S., Buchanan, R.L., Zaika, L.L., Williams, A.C. 1991. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiol.* 8, 75–78.
- Bigelow, W. D. Esty, J. R. 1920. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Dis.* 602–617.

- Bigelow, W. D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 29(5), 528–536.
- Bignon, J. 1997. Cold pasteurizers hyperbar for the stabilization of fresh fruit juices. *Fruit Process.* 6, 46–48.
- Black, D. G. Ye, X. P., Harte, F., Davidson. P. M. 2010. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 when grown statically or continuously in a chemostat. *J. Food Prot.* 73:2018–2024.
- Bolton, D.J., Pearce, R., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., 2003. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. *J. Appl. Microbiol.* 94, 1036–1042.
- Boziaris, I. Nychas, G. 2006. Effect of nisin on growth boundaries of *L. monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. *Food Microbiol.* 23(8):779-84.
- Braddock, R.J., 1999. Single strength orange juices and concentrate. *Handbook of Citrus By-products and Processing Technology.* Wiley, New York.
- Brul, S. Coote, P. 1999. Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1-17.
- Burt, S. 2004. Essential Oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A Review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253
- Byrne, B. Dunne, G., Bolton, D.J. 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol.* 23 803–808.
- Carlier, V. Augustin, J.C., Rozier, J. 1996. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* (Phagovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340): D- and z-Values in Ham. *J. Food Prot.* 59, No.6, 1996, Pages 588-591.
- Carlson, L.H.C., Machado, R.A.F., Spricigo, C.B., Pereira, L.K., Bolzan, A. 2001. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *J. Supercritical Fluids*, 21: 33-39.
- CDC 1997. Outbreaks of *E. coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider – Connecticut and New York, October 1996. *J Am Med Assoc*, 277:781-787
- Celina, A. Rahmawati, D., Permana, T. 2019. Application of Lemongrass Essential Oil as a Natural Preservative Agent for Pineapple Juice. *Iconiet Proceeding* 2(2):69-78
- Char, D.C. Guerrero, S.N., Alzamora, S.M. 2010. Mild Thermal Process Combined with Vanillin Plus Citral to Help Shorten the Inactivation Time for *Listeria innocua* in Orange Juice. *Food Bioprocess Technol* 3:752–761.

- Chhabra, A.T., Carter, W.H., Linton, R.H., Cousin, M.A., 1999. A predictive model to determine the effects of pH, milkfat and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 62, 1143–1149.
- Chilton, P., Isaacs, N.S., Mañas, P., Mackey, B.M. 2001. Biosynthetic requirements for the repair of membrane damage in pressure-treated *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 101–104.
- Clark, M. 2019. South African *Listeria* outbreak impacted food choices of students, *News Desk*, 2.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., Mafart, P. 2006. General Model, Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial. *AEM*, 6493–6502
- Coşansu, S. 2018. Survival kinetics of heat-stressed *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* cells as post-fermentation contaminants in kefir during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 635–641.
- Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N., Mafart, P., Leguerinel, I., 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *Int. J. Food Microbiol.* 101:73–81
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., And Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170.
- De Skaria, P., Joy, P., Mathew, S., Mathew, G. 2016. Lemongrass. *Handbook of Spices Vol. 3* (Ed. K.V. Peter). Woodhead Pub. Pvt. Ltd., Cambridge, UK, 400-419.
- Desmarchelier, P., Fegan, N., Vanderlinde, P. 2004. The prevalence and concentration of *E. coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 97(2):362-70.
- Dewi, G.; Nair, D.V.T.; Peichel, C.; Johnson, T.J.; Noll, S.; Johnny, A.K. 2021. Effect of lemongrass essential oil against multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg and its attachment to chicken skin and meat. *Poult. Sci.*, 101116.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.
- Doyle, M., Gonzalez, F. D., Hill, C. 2019. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 5. Baskı, ASM Yayınları, 1-1100.
- Edelson-Mammel, S.G., Whiting, R.C., Joseph, S.W., Buchanan, R.L., 2005. Effect of prior growth conditions on the thermal inactivation of 13 strains of *Listeria monocytogenes* in two heating menstrual. *J. Food Prot.* 68, 168–172.
- Enache E, Mathusa EC, Elliot PH, Black DG, Chen Y, Scott VN, Schaffner DW. 2011. Thermal resistance parameters for Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in

- apple juice. *J. Food Prot.* 74(8): 1231–1237. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-488
- Espina, L, Gelaw, T. K., de, L.-C., Pagán, R., García-Gonzalo, D. 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PLoS One*, 8(2).
- Espina, L. Condón, S., Pagán, R., García-Gonzalo, D. 2014. Synergistic Effect of Orange Essential Oil or (+)-limonene with Heat Treatments to Inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in Orange Juice at Lower Intensities while Maintaining Hedonic Acceptability. *Food Bioprocess Technol* 7:471–481.
- Espina, L. García-Gonzalo, D., Pagán, R. 2016. Detection of thermal sublethal injury in *Escherichia coli* via the selective medium plating technique: Mechanisms and improvements. *Front. Microbiol*, 7.
- Espina, L. Somolinos, M., Pagan R., Garcí'A-Gonzalo D. 2010. Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *J. Food Prot.* Vol. 73, No. 12, 2189–2196.
- Faille, C., Lebert, V., Gavini, P., Maigonnat, J.-F., 1997. Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores suspended in buffer and in poultry meat. *J. Food Protect.* 60, 544–547.
- Farber, J. Kozak, G., Duquette, S. 2011. Changing regulation: Canada's new thinking on *Listeria*. *Food Control* 22(9):1506-1509.
- Fernandez, A. J. Collado, L. M. Cunha, M. J. Ocio, and A. Martinez. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *Int. J. Food Microbiol.* 77:147–153.
- Fernandez. T.F. 2008. *E. coli* O157:H7. *Veterinary World*, Vol.1(3): 83-87.
- Folsom, J. P. FRANK, J. F. 2000. Heat inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple juice exposed to chlorine. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No. 8, 1021–1025.
- Food and Drug Administration (FDA). 2015b. (21CFR182.20). Title 21, Vol 3.
- Food and Drug Administration (FDA). 1998. Guidance for industry Juice HACCP hazards and controls guidance.
- Food and Drug Administration (FDA). 2002. Issues juice guidelines. *Food Technol*, 56:24.
- Food and Drug Administration (FDA). 2004. Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables: Guidance for Industry, first ed. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), 2.

- Food and Drug Administration (FDA). 2015a. (21CFR182.20).. Title 21, Vol 3.
- Food and Drug Administration (US FDA), 2001. Hazard Analysis and Critical Point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. Fed. Regist. 66, 33829–33830.
- Food and Drug Administration: 1998. Food labeling: warning and notice statements; labeling of juice products; final rule. Federal Register, 63:37055-37056.
- Friedman, M. Henika, P., Levin, C., Mandrell, R. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem* 22;52(19):6042-8.
- Gabriel, A. Nakano, A.H., 2009. Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *L. monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. *Food Control* 20, 443–446.
- Gabriel, A.A. 2015. Combinations of selected physical and chemical hurdles to inactivate, *Food Control* 50:722- 728.
- Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P., 1998. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Sci.* 63, 887–889.
- Gandhi, M. Chikindas, M. L. 2007. *L.*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.*, 113(1), 1–15.
- Ganjewala, D. Luthra, R. 2010. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. *Nat. Prod. Commun.*, 5, 163–172.
- García, D., Mañas, P., Gómez, N., Raso, J., and Pagán, R. (2006). Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *J. Appl. Microbiol.* 100, 428–435
- Gayan, E. Cambré, A., Michiels, C., Aertsena. 2016. Stress-induced evolution of heat resistance and resuscitation speed in *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888. *Appl Environ Microbiol* 82: 6656–6663.
- Gayan, E. Geensa, E., Berdejo, D., García-Gonzalo, D., Pagán, R., Aertsena, A., Michiels, C.W. 2020. Combination of mild heat and plant essential oil constituents to inactivate resistant variants of *Escherichia coli* in buffer and in coconut water. *Food Microbiol.*103388
- Geeraerd, A.H. Valdramidis, V. P., Van Impe, J.F. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int. J. Food. Microbiol.*, 102(1), 95-105.
- Gilling, D. Ravishankar, S., Bright, K. 2019. Antimicrobial efficacy of plant essential oils and extracts against *E. coli*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 54(7):608-616.

- Gölküçü, M. Tokgöz, H., Toker, R., Çelikyurt, M.A., Tuğrul Ay, S., 2012, Tıbbi ve Aromatik Bitki İşletmelerinin Yapısal Analizi, Erdem Ofset, Antalya, 1-88.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G. Warmington, J.R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 26, 194–198.
- Hammer, K.A. Carron C.F., Relay T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 86: 985.
- Haque, A. Remadevi, R., Naebe, M., 2018. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments, Cellulose 25:5455–5477.
- Hassoun, A.; Emir Çoban, Ö. 2017. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. Trends Food Sci. Technol. 68, 26–36
- Heddlson, R. Doores, S. 1994. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens. J Food Prot, 57(11):1025-1037.
- Holley, R. A. and D. Patel. 2005. Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22:292–309.
- Jagadish Chandra K.S. 1975. Cytogenetical evolution in some species of *Cymbopogon*. In: Kachroo P (ed) Advancing Frontiers in Cytogenetics. Hindustan Publ Co, New Delhi India.
- Jamshidi, A. Zeinali, T. 2019. Significance and Characteristics of *L. monocytogenes* in Poultry Hindawi International J. Food Sci.1-7.
- Janisiewicz, W.J. Conway, W. S., Brown, M.W., Sapers, G. M., Fratamico, P., Buchanan, R. L. 1999. Fate of *E. coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. Appl. Environ. Microbiol. 65:1–5.
- Juno Thomas, M.D. Nevashan Govender, M.Sc., M.P.H., Kerrigan M. McCarthy, M.D., Linda K. Erasmus, M.D., Timothy J. Doyle, Ph.D., Mushal Allam, Ph.D., Arshad Ismail, Ph.D., Ntsieni Ramalwa, M.P.H., Phuti Sekwadi, M.P.H., Genevieve Ntshoe, M.P.H., Andronica Shonhiwa, M.P.H., Vivien Essel. 2020. Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. N Engl J Med, 382:632-643
- Kim, S.S., Kang, D.H., 2017. Combination treatment of ohmic heating with various essential oil components for inactivation of food-borne pathogens in buffered peptone water and salsa. Food Control 80, 29–36.
- Kisko, G. Roller, S. 2005. Carvacrol and p-cymene inactivate *E. coli* O157:H7 in apple juice. BMC Microbiology 5:36.

- Knight, K. P. McKellar, R. C. 2007. Influence of cinnamon and clove essential oils on the D- and z-values of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider. *J. Food Prot.* Vol. 70, No. 9, 2089–2094.
- Kotzekidou, P. Giannakidis, P., Boulamatsis, A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT* 41, 119–127.
- Kpoviessi, S. Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., Accrombessi, S., Frédérick, M., Moudachirou, M., Quetin-Leclercq, J. 2014. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol* 151(1): 652–659.
- Krug, M.D. Chapin, T.K., Danyluk, M.D., Goodrich-Schneider, R.M., Schneider, K.R., Harris, L.J., Worobo, R.W. 2020. Outbreaks of foodborne disease associated with fruit and vegetable juices. *Food Sci. Hum. Nutr. Dep* 12-04, 1–7. FSHN12-04.
- Kumar, G.D. Williams, R.C., Sumner, S.S., Eifert, J.D. 2016. Effect of ozone and ultraviolet light on *L. monocytogenes* populations in fresh and spent chill brines. *Food Control*, 59, 172–177.
- Kumar, P. Mishra, S., Malik, A., Satya, S. 2013. Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf.(Poales:Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1, 8-cineole). *Parasitol Res* 112(1):69–76.
- Lapena, N. Colas-Meda, P., Vinas, I., Alegre, I. 2022. Inactivation of *E. coli*, *Salmonella Enterica* and *L. monocytogenes* on apple peel and apple juice by ultraviolet C light treatments with two irradiation devices. *Int. J. Food Microbiol.* 109535.
- Leite, C.J.B. Pereira De Sousa, J., Da Costa Medeiros, J.A., Da Conceição, M.L., Dos Santos Falcaão-Silva, V., De Souza, E.L. 2016. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Enteritidis* by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. Essential Oil in Pineapple Juice. *J. Food Prot.*, Vol. 79, No. 2, 213–219.
- Lewinsohn, E., Dudai, N., Tadmor, Y., Katzir, I., Ravid, U., Putievsky, E., Joel, D.M. 1998. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). *Ann. Bot.*, 81: 35-39.
- Leyer, G. Wang, L., Johnson, E. 1995. Acid adaptation of *E. coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ Microbiol.* 61(10): 3752–3755.
- Li H. Gänzle M. 2006. Some like it hot: heat resistance of *Escherichia coli* in food. *front microbiol* 7: 1763.
- Lim, J.Y. Yoon, J., Hovde, C. 2010. A Brief Overview of *E. coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J. Microbiol Biotechnol*, 20(1): 5–14.

- Ling, J. L.P., Kormin, F., Abidin, N., A., Z., Anuar, N., A., F., M. 2018. Characterization and stability study of lemongrass oil blend microemulsion as natural preservative. International Conference on Biodiversity, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 269 012026.
- Mackey, B.M., 2000. Injured bacteria. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), The Microbiological Safety and Quality of Food. Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, 315–341.
- Mafart, P. Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weibull frequency distribution model. Int. J. Food Microbiol. 72, 107– 113.
- Marcen, M., Ruiz, V., Serrano, M. J., Condón, S., & Mañas, P. 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. Int. J. Food Microbiol., 241, 198–205.
- Marechal, P.A. Ma´rtinez de Marnan˜o’n, I., Poirier, I., Gervais, P. 1999. The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. Trends in Food splitScience & Technology 10, 15– 20.
- Massilia, R. Melgar, J., Belloso, O. 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella Enteritidis*, *E. coli*, and *L. innocua* in fruit juices. J. Food Prot:69(7):1579-86.
- Mazzotta, A.S. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. Journal Of Food Protection, Vol. 64, No. 3, 2001, 315–320.
- Meng, J. LeJeune, J. T., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.). Food microbiology, fundamentals and frontiers. (4th ed. Washington DC: ASM Press. 287–309
- Michino, H. Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Miyazaki, M., Ono, A., Yanagawa, H. 1999. Massive outbreak of *E. coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am J Epidemiol, 150(8):787-96.
- Miller, F.A., Brandão, T.R.S., Teixeira, P., Silva, C.L.M. 2006. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. Int. J. Food Microbiol. 112, 261–265.
- Moon, K. Delaquis, P., Toivonen, P., Bach, S., Stanich, K., Harris, L. 2005. Destruction of *E. coli* O157:H7 by vanillic acid in unpasteurized juice from six apple cultivars. J. Food Prot, 542–547.
- Moreira, M. R. A. G. Ponce, C. E. del Valle, S. I. Roura. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT Food Sci. Technol. 38:565–570.

- Mukarram, M. Choudhary, S., Khan, M.Ah., Poltronieri, Khan, M.M.A., Ali, J., Kurjak, D., Shahid, M., 2022. Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities. *Antioxidants*.11, 20.
- Mukarram, M.; Khan, M.M. Lemongrass Essential Oil and the Underlying Mechanism for Its Insecticidal Activity. In A.; Zehra, A.; Choudhary, S.; Naeem, M.; Aftab, T. 2021. *Biosynthesis of Medicinal and Aromatic Plants Healthcare and Industrial Applications*; Aftab, T. Hakeem, K.R., Eds.; Springer: Switzerland, 429–443.
- Munoz, M. Guevara, L., Palop, A., Fernández, P.S. 2010. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. *Food Microbiol.* 27, 468-475.
- Muturi, E.J. Selling, G.W.; Doll, K.M.; Hay, W.T.; Ramirez, J.L. 2020. *Leptospermum scoparium* essential oil is a promising source of mosquito larvicide and its toxicity is enhanced by a biobased emulsifier. *PLoS ONE*, 15, e0229076.
- Naik, M. I. Fomda, B. A., Jaykumar, E., Bhat, J. A. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3: 7, 535-538.
- Naik, M.I. Fomda, B.A., Jaykumar, E., Bhat, J.A., 2012. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3 (7), 535–538.
- Negrelle, R.R.B. Gomes, E.C. 2007. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Rev Bras Pl Med* 9:80–92.
- Nguyen, Y. Sperandio, V. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(90), 1–7.
- Noriega, E. Velliou, E.G., Van Derlinden, E., Mertens, L., Van Impe J.F.M. 2014. Role of growth morphology in the formulation of NaCl-based selective media for injury detection of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria innocua*. *Food Research International* 64, 402–411.
- Novak, J.S. Juneja, V.K. 2003. Effects of refrigeration or freezing on survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in under-cooked ground beef. *Food Control*, 14(1), 25–30.
- Oliveira, E.F. Nguyena, C.H., Stepaniana, K., Cossua, A., Nitina, N. 2019. Enhanced bacterial inactivation in apple juice by synergistic interactions between phenolic acids and mild food processing Technologies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 56, 102186.
- Onawunmi GO, Yesiak WAB, Ongulana EO. 1984. Antibacterial constituent in the essential oil of *ymbopogon citratus*. *J Ethanopharmacol*; 12 (3): 279-86.

- Oteiza, J.M., Giannuzzi, L., Califano, A.N., 2003. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by composition of the product. *Food Res. Int.* 36, 703–712
- Öztekin, S. Soysal, Y., 1998. Tıbbi ve aromatik bitkilerde ekstraksiyon yöntemleri. 18. Ulusal Tarımsal Mekanizasyon Kongresi. Tekirdağ, 731-745.
- Pagal, G.A. Gabriel, A.A. 2020. D- and z- values of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in heated orange juice. *Philippine Journal of Science* 149 (2): 261-268.
- Pagán, E., Berdejo, D., Espina, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2018. Antimicrobial activity of suspensions and nanoemulsions of citral in combination with heat or pulsed electric fields. *Lett. Appl. Microbiol.* 66, 63–70.
- Pagan, R., Condo' n, S., Sala, F.J., 1997. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3225–3232.
- Peleg M. 2006. Isothermal microbial heat inactivation. *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems, models for predicting growth and inactivation*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 1-456.
- Peleg, M. 2000. Microbial survival curves—the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International* 33, 531– 538.
- Peleg, M. Pechina, C.M. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40:159–172.
- Peleg, M., Cole, M.B., 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science* 38, 353–380.
- Pengelly, A. 2004. *The Constituents of medicinal plants (Eds): An Introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*. CABI Publishing, United Kingdom, pp: 85-103.
- Perni, S., Chalise, P. R., Shama, G., & Kong, M. G. (2007). Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects. *Int. J. Food Microbiol*, 120(3), 311–314.
- Petruzzi, L. Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. 2017. Thermal treatments for fruit and vegetable juices and beverages: a literature overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 668–691.
- Plata-Rueda, A., Rolim, G. D. S., Wilcken, C. F., Zancunio, J. C., Serrão, J. E., & Martínez, L. C. (2020). Acute toxicity and sublethal effects of lemongrass essential oil and their components against the granary weevil. *Sitophilus granarius*. *Insects*, 11(6), 379.
- Ranade G.S. 2004. Essential oil (Lemongrass oil), *FAFAI J.*, 6(3), 89.

- Ranade, S.S. 2015. Lemon grass. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 35, 162–167.
- Rangel, J. Sparling, P., Crowe, C., Griffin, P., Swerdlow, D. 2005. Epidemiology of *E. coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002.
- Reij, M. Den Aantrekker Ranade, S., Thiagarajan P. 2015. Lemon grass, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*; Makale No. 30, 162-167.
- Riley, L. Semis, R., Helgerson, S., McGee, H., Wells, J., Davis, B., Hebert, R., Olcott, E., Johnson, L., Hargrett, N., Blake, P., Cohen, M. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
- Roda, R.M.C. Taboada, A., Palop, A., López-Gómez, A., Marin-Iniesta, F. 2012. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 314–318.
- Rodrigues, C.S. Gonçalves Cordeiro de Sá. C.V., Barros de Melo, C. 2017. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Microbiology, Cienc. Rural* 47-2.
- Roering, A. M. Luchansky, J. B., Ihnot, A.M., Ansay, S.E., Kaspar, C.W., Ingham, S.C. 1999. Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT 104, *L. monocytogenes*, and *E. coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 46:263–269.
- Roller, S. 2003. *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Edited by: Roller S. Cambridge, UK. Woodhead Publishing Ltd; 1-256.
- Rowan, N.J., Anderson, J.G., 1998. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2065– 2071
- Russo, M. Galletti, G. C., Bocchini, P., Carnacini, A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3741–3746.
- Semanchek, J.J., Golden, D. A. 1998. Influence of growth temperature on inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 by heat, acid, and freezing. *J. Food Prot.* 61(4), 395–401
- Sharma, M. Adler, B.B., Harrison, M.D., Beuchat L.R. 2005. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 448–453.
- Shigeharu, I. Toshio, T., Hideyo, Y. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 565-73.

- Siguemotoa, E.S. Wilhelms Guta., J.A., Martinez, A., Rodrigoc, D. 2018. Inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in apple juice by microwave and conventional thermal processing. IFSET 45, 84–91.
- Silva, C. Guterres, S.S., Weisheimer, V., Schapoval, E.E.S. 2008. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Braz. J. Infect. Dis.* 12, 63–66.
- Silveira, S.M. Júnior, A.C., Scheuermann, G.N., Secchi, F.L., Vieira, C.R.W., 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogen. *Ciênc. Rural St. Maria* 42 (7), 1300–1306.
- Sivakumar, D., and S. Bautista-Baños. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Prot.* 64:27–37.
- Smith, R.L. Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Adams, T.B. 2005. GRAS flavoring substances 22. *Food Technol.* 59 (8), 24–62.
- Somolinos, M. Garcia, D., Paga'n, R., Mackey. B. 2008. Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7570–7577.
- Somolinos, M., D. Garc'ia, S. Cond'on, B. Mackey, and R. Paga'n. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *J. Appl. Microbiol.* 108:1928–1939.
- Splittstoesser D.F. Churey J.J., Lee C.Y. 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J Food Prot.* 57:1080-1083.
- Splittstoesser, D.F., McLellan, M.R., Churey, J.J. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Prot.* 59, 226– 229
- Steenstrup, L.L. Floros, J.D. 2002. Statistical Modeling of D- and z-value of *E. coli* O157:H7 and pH in Apple Cider Containing Preservatives *Journal of Food Science* (Wiley-Blackwell). Mar 2002, Vol. 67 Issue 2, 793-796.
- Stratford, M. Hofman, P.D., Cole, M.B. 2000. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks, In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, and G. W. Gould (ed.), *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publisher, Gaithersburg, MD. 836–869.
- Stringer, S.C. George, S.M., Peck, M.W. 2000. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 88, 79-89.
- Sung, H. Song, W., Kim, K., Ryu, S., Kang, D. 2013. Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *L. monocytogenes* in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 147–153.

- Swamy, M.; Akhtar, M.S.; Sinniah, U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 3012462.
- Taj Karimi, M. İbrahim, S.A. 2012. Phytochemicals as Antimicrobial Food Preservatives. In: Patra, A., Ed., *Dietary Phytochemicals and Microbes*, Springer, Dordrecht, 207-235.
- Tisserand, R. Young, R. 2013. *Essential oil safety: a guide for health care professionals*, 2nd edn. Livingstone, Churchill.
- Topalcengiz, Z. Işık, S., Alan, Y. 2019. Thermal Resistance of Acid Adapted and Non-Adapted Stationary Phase *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in Pomegranate Juice. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* 7(7): 1000-1007.
- Tosun, H., Gönül, Ş. A. 2003. *E. coli* O157: H7'nin Aside Tolerans Kazanması ve Asidik Gıdalarda Önemi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* Cilt: 01 Sayı: 10 Sayfa: 10-17.
- Tüfekçi, H.B. Fenercioğlu, H. 2010. Türkiye’de Üretilen Bazı Ticari Meyve Sularının Kimyasal Özellikler Açısından Gıda Mevzuatına Uygunluğu. *Akademik Gıda* 8 (2) 11-17.
- Ukuku, D. O., Jin, T., and Zhang, H. 2008. Membrane damage and viability loss of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg by thermal death time disk treatment. *J. Food Prot.* 71, 1988–1995.
- Uljas, H. E. Ingham, S.C. 1999. Combinations of interventions and treatments resulting in 5-log-unit reductions in numbers of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 organisms in apple cider. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1924–1929.
- Ultee, A. Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.
- Ultee, A. Kets, Epw., Smid, E.J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4606-4610.
- van Boekel, M.A.J.S., 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 139– 159.
- Vazirian, M.; Kashani, S.T.; Ardekani, M.R.S.; Khanavi, M.; Jamalifar, H.; Fazeli, M.R.; Toosi, A.N. 2012. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) essential oil against food-borne pathogens added to cream-filled cakes and pastries. *J. Essent. Oil Res.* 24, 579–582

- Venkitanarayanan, K. S., T. Zhao, and M. P. Doyle. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by combinations of GRAS chemicals and temperature. *Food Microbiol.* 16:75–82.
- Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V., 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J. Food Prot.* 71, 356–364.
- Walkling-Ribeiro, M. Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J. G., Morgan, D. J. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields *J. Food Sci.*, 73(8), M395–M399.
- Wang, G., & Doyle, M. P. 1998. Heat shock response enhances acid tolerance of *E. coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26(1), 31–34.
- Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., and Ryser, E. T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J. Food Protect.* 72, 1121–1138.
- Wood, J.M. 2011. Bacterial osmoregulation a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 215–238.
- World Health Organisation, Food and Agriculture Organisation (WHO/FAO), 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. ICMSF.
- Yavuz, M., Korukluoğlu, M. (2010). *L. monocytogenes*'in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. dergipark.org.tr/tr/pub/ziraatuludag/issue/16755/174187. Erişim Tarihi: 08.12.2021
- Yu, L.S. Fung, D.Y. 1993. Five-tube most-probable-number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 18(2), 97–106.
- Zaika, L. L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Saf.* 9:97–118.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice EREN

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ankara Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Gıda Mühendisliği	2013
Lise	Mustafa Kemal Anadolu Lisesi	2007

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2016-Halen	İzmit İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü	Mühendis

YABANCI DİL

İngilizce

ESERLER

Görev aldığı projeler

Limon Otu Yağının Meyve Suyunda Koruyucu Olarak Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje no: 2020-9-33-92 (GAP-B), Araştırmacı, (2021-Devam ediyor)

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulmuş Bildiriler

Eren, H. Cosansu, S. 2022. Effect of Lemon Grass Oil On The Heat Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice. ISPEC 13th International Conference on Engineering & Natural Sciences March 19-20, 2022 Burdur/TÜRKİYE