ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Utku ATAMAN

KAKAO TOZUNDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* SPORLARININ ISIL DİRENÇLERİNİN BELİRLENMESİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAKAO TOZUNDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* SPORLARININ ISIL DİRENÇLERİNİN BELİRLENMESİ

Utku ATAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez ../../2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....……	İmza.....	İmza.....……
Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA	Prof. Osman ERKMEN	Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No :

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2008YL52

- Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAKAO TOZUNDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* SPORLARININ ISIL DİRENÇLERİNİN BELİRLENMESİ

Utku ATAMAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Yıl : 2008, Sayfa:65
Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Prof. Dr. Osman ERKMEN
Doç. Dr. Hatice Korkmaz GÜVENMEZ

Bu çalışmada Hollanda'daki çeşitli marketlerden temin edilen 5 farklı kakao tozu örneğinden, *Bacillus* cinsi bakteriler izole edilerek selektif besiyerinde gelişim ve koloni özellikleri ve sporlarının ısısal dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kakao tozu örneklerinden izole edilen suşların 20 tanesinin mezofilik tür olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu suşlar içerisinde 6 tür canlılık ve spor oluşturma özelliklerinin yüksek olması nedeni ile seçilmiş ve çalışmaya ısıl direnci yüksek bu 6 tür üzerine odaklanılarak devam edilmiştir. Çalışılan türlerin 4'i yapılan identifikasyon işlemleri ile *Bacillus subtilis* (suş 81, 101, 125, 162A) olarak, bir tanesi ise *Bacillus licheniformis* (suş 49*)* olarak tespit edilmiştir. Suş 64 'ün ise identifikasyonu gerçekleştirilememiştir. Uygulanan inaktivasyon işlemleri (95-130˚C'de 0.25-12 dakika) ile en yüksek ısıl dirence sahip bakteri suş 162A olarak tespit edilmiştir. Bu suşun 130ºC'de 1 dakika ısıl işleme tabi tutulmuş ve inaktive edilebilmiştir.

Elde edilen sonuçlar Weibull ve First order matematiksel modelleri ile analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kakao tozu, *Bacillus*, Isıl direnç, Matematiksel modelleme

ABSTRACT

MSc THESIS

DETECTION OF HEAT RESISTANCE PROPERTIES OF *BACILLUS* SPORES ISOLATED FROM COCOA POWDER

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2008, Pages:65
Jury: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Prof. Dr. Osman ERKMEN
Assoc. Dr. Hatice Korkmaz GÜVENMEZ

In this research, the growth and colony forming characteristics of *Bacillus* species which are isolated from 5 different cocoa powder and the heat resistant characteristics of their spores were detected. The isolated cultures were kept in frozen vials to prevent mutations and contaminations. Frozen cultures were prepared using mesophilic and thermophilic strains. These frozen vials used for making frozen stock cultures. By this way they could be preserved without any mutation and contamination.

The isolated *Bacillus* strains were identified by API 50CHB isolation system. Six *Bacillus* strains detected with higher survival and spore forming abilities at higher temperature and they were used in further research. Four of them are *Bacillus subtilis* (strain 81, 101, 125, 162A), one is *Bacillus licheniformis* (strain 49) and the other one has not been identified (Strain 64).

Strain 162A was identified as most heat resistant bacterium from high temperature (at 95-130˚C for 0.25-12 min.) applied experiments. This strain was exposed to heat treatment at 130˚C for 1 minute to inactivating all the spores.

For evaluating the inactivation results two different mathematical methods, Weibull model and First order model were used.

Key Words: Cocoa powder, *Bacillus*, Thermal resistance, Mathematical modeling

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, her konuda bana yol gösteren, yardımcı olan, yakın ilgisi ile beni her zaman teşvik ve motive eden saygı değer hocam Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın Hollanda Wageningen Üniversitesinde tamamladığım bölümünde yardımlarını esirgemeyen Araştırma görevlisi Lidia Rebelo Lima'ya ve dr.ir. MJR Rob Nout'a teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT I
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ V
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
RESİMLER DİZİNİ VII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1 Kakao 4
2.1.1 Kakao Çekirdeğinin Fermantasyonu 4
2.1.2 Kakao Tozu Üretimi 5
2.1.3 Kakao Tozunun Mikroflorası 7
2.2. *Bacillus* Türleri 9
2.2.1. Genel Bilgiler 9
2.2.2. *Bacillus* Sporlarının Isıl Dirençleri 10
2.2.3. Gıda Endüstisinde *Bacillus*'ların neden olduğu sorunlar 12
2.2.4. *Bacillus*'ların Isıl Dirençleri İle İlgili Yapılmış Çalışmalar 14
2.3. *Bacillus.*'ların İnaktivasyonun Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler 15
3. MATERYAL VE METOT 20
3.1. Materyal 20
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler 20
3.1.2. Çalışılan Bakteri Kültürleri 21
3.2. Metot 21
3.2.1 Kakao Örneklerinden *Bacillus* Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması 21
3.2.1.1. API Test Kiti ile *Bacillus* Suşlarının Tanımlanması 22
3.2.2.Stok Kültür Hazırlama 22
3.2.3. *Bacillus* Sporlarının Elde Edilmesi 22

3.2.4.*Bacillus* Sporlarının Isıl Dirençlerinin Belirlenmesi.....24
3.2.5.Matematiksel Model Seçimi ve Fitleme Değeri 25
3.2.6. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 26

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....27
4.1. Kakao Tozundan *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması ……...27
4.2. *Bacillus* Suşlarının Spor Oluşturma Özellikleri 28
4.3. *Bacillus* İzolatlarının İnaktivasyon Kinetikleri 29
4.4. *Bacillus* İzolatlarının First Order ve Weibull Modellerine Ait İstatistiksel İndisleri 34
4.5. *Bacillus* İzolatlarından Elde Edilen İnaktivasyon Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....42
4.6. *Bacillus* Sporlarının İnaktivasyon Kinetiği ve Sonuçların İstatistiksel Yorumu 45
4.7. *Bacillus* İzolatlarının D ve Z Değerlerinin Hesaplanması 45

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....48
5.1. Sonuçlar.....48

KAYNAKLAR.....50
ÖZGEÇMİŞ.....55
EKLER 65

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 2.1. 1. Fermantasyon ve kavurma işleminden sonra elde edilen kakao tozunun kimyasal bileşim 7
Çizelge 2. 2. Kakao tozundan izole edilen mikroorganizmaların türleri…….....……8
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler 20
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan mikroorganizma türleri 21
Çizelge 3.3. Tüm suşlara ait inaktivasyon koşulları. 25
Çizelge 4.1. Çalışılan *Bacillus* Suşları ve Özellikleri ……...…….27
Çizelge 4.2. Analiz edilen suşlara ait ölüm kinetiğinin istatistiksel verileri.....……43
Çizelge 4.3. Analiz edilen suşlara ait ölüm kinetiğinin istatistiksel verileri...…...…44
Çizelge 4.4. Tüm suşlara ait D ve δ değerleri ……..…….....……46
Çizelge 4.5. Tüm suşlar için Hesaplanan Z değerleri ……...……...…....……..…47
Çizelge 5.1. Suş 49'a ait inaktivasyon sonuçları.……...……55
Çizelge 5.2. Suş 64'e ait inaktivasyon sonuçları……...…..……56
Çizelge 5.3. Suş 81'e ait inaktivasyon sonuçları……...…..……57
Çizelge 5.4. Suş 101'e ait inaktivasyon sonuçları...……..……58
Çizelge 5.5. Suş 125'e ait inaktivasyon Sonuçları…...……..……59
Çizelge 5.6. Suş 162A'ya ait inaktivasyon sonuçları…….…...……...……..……60
Çizelge 5.7. 0,1 M Potasyum fosfat çözeltisi birleşim oranları…….62
Çizelge 5.8. Mineral çözeltisi bileşim oranları……...……63
Çizelge 5.9. Mineral bileşikleri molekül ağarlıları…...……..64

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 2.1. Kakao tozu üretim basamakları ……..…….....6
Şekil 2.2. *Bacillus* 'ların spor yapısı…….…….....….....10
Şekil 2.3. Spor oluşumu ve germinasyonu…….……12
Şekil 4.1. Suş 49'a ait termal ölüm grafiği …...…….……..30
Şekil 4.2. Suş 64'e ait termal ölüm grafiği ……...…….……..31
Şekil 4.3. Suş 81'e ait termal ölüm grafiği ...…….……..32
Şekil 4.4. Suş 101'e ait termal ölüm grafiği ……...……...……..33
Şekil 4.5. Suş 125'e ait termal ölüm grafiği ...……...……..33
Şekil 4.6. Suş 162A'ya ait termal ölüm grafiği …...……...……...……..34
Şekil 4.7. Suş 49'a ait Weibull grafiği …...……...……...……..36
Şekil 4.8. Suş 49'a ait First-order grafiği …...……...……...……...……..36
Şekil 4.9. Suş 64'e ait Weibull grafiği …...……...……...……...37
Şekil 4.10. Suş 64'e ait First-order grafiği …...……...……....……...……..37
Şekil 4.11. Suş 81'e ait Weibull grafiği …...……...……...……..38
Şekil 4.12. Suş 81'e ait First-order grafiği …...……...……....……...……..38
Şekil 4.13. Suş 101'e ait Weibull grafiği ….....……...……...……..39
Şekil 4.14. Suş 101'e ait First-order grafiği …...……...……....……...……....39
Şekil 4.15. Suş 125'e ait Weibull grafiği …...……....……...……..40
Şekil 4.16. Suş 125'e ait First-order grafiği …...……...……....……...……....40
Şekil 4.17. Suş 162A'ya ait Weibull grafiği …...……...…….....……...……..41
Şekil 4.18. Suş 162A'ya ait First-order grafiği …...……...….....……...……....41

RESİMLER DİZİNİ **SAYFA**

Resim 2.1. Nutrient agar besiyeri çerisinde gelişim gösteren *Bacillus* türleri…….....9
Resim 3.1. Stres koşullarındaki *Bacillus* hücreleri…….28

1. GİRİŞ

Kakao çekirdeği, Meksika kökenli olan "*Theobroma cacao*" ağacının meyvesidir ve tropik Amerika ve Bati Afrika'da yetişmektedir. Kakaonun bileşiminde teobromin, kafein ve kakao yağı bulunmaktadır. Ayrıca %40 karbonhidrat, % 18 protein içermektedir. Kakao yağı çıkarılmadan, çikolata, şeker üretiminde ve pomatlarda da kullanmaktadır. Kakao çekirdeğinden elde edilen kakao tozu ise, başta çikolata olmak üzere, dondurma, kakaolu kaplamalar, çikolata sosları ve kakao içeren birçok ürünün en önemli hammaddesidir. Türk Gıda Kodeksi "Kakao ve Kakao Ürünleri Tebliği'nde kakao tozu; Kakao kekinin öğütülmesiyle elde edilen ve kuru madde üzerinden kütlece en az % 20 oranında kakao yağı içeren toz halindeki ürün" şeklinde tanımlanmıştır (TGK, 2000). Ülkemizde kakao tozu üreten işletmelerin büyük bir çoğunluğu Marmara Bölgesinde faaliyet göstermektedir (Anon, 2009 a).

Kakao taneleri, kabukları içerisinde genellikle sterildir. Kakao tozu elde etmek için kabuklar açılır, fermente edilir, kavrulur kurutulur, öğütülür ve preslenir. Kakao tozu %8'in altında nem içerir ve pH'sı doğal hali ile 5,5-6,6'dır.Alkalizasyon işlemine tabi tutulmuş kakao tozunda ise pH : 7,8-8,0'dır.

Kavrulmuş kakao tanesinde oluşabilecek en önemli bozulma ise genellikle küflenmedir. *Aspergillus* ve *Penicillium* türler kavrulmuş kakao tanelerinde bulunabilen küflerin başında gelir. Tanelerde küf gelişmesi genellikle kurutma sırasında bazende fermantasyon sırasında meydana gelebilir. Eğer kurutma işlemi çok yavaş yapılıyorsa veya depolama sırasında taneler yeterince kurutulmamış işe küf kabuktan tane içerisine nüfuz edebilir. Kakao tanelerinin küf gelişmesi %8'in altındaki nem oranlarında azalır. Genelde kakao tanelerinin %8'in altındaki nem oranlarına izin verilirse de ideal nem oranı %6'dır.Kakao tanelerinin kabuğunda küflenme sonucu aflatoksin ve diğer mikotoksinlere rastlanabilir ancak kakao tanesinde mitoksinlerin bulunma olasılığı oldukça düşüktür. Kakao tanelerinde bulunan kafeinin *Aspergillus parasiticus*'un toksin üretimini engellediği konusunda görüşler bulunmaktadır (Ayhan, 2000).

Fermente olmuş, işlem görmemiş kakao tanelerin bakteriyel yükü yüksektir ($5x10^6$/g civarında). Ancak daha sonra kakao işlenirken uygulanan teknik işlemler (kavurma, alakalizasyon ve benzeri işlemler) mikrobiyal yükü azaltmaktadır ve maya, küf sporsuz bakterilerin sayısını azaltır. Sporlu bakteriler dışındaki mikroorganizmaların yüksek sayıda bulunması kavurma işleminin yetersiz olduğunu ve işlem sonrası kontaminasyon olduğunu ya da depolamada nem içeriğinin yüksek olduğunu gösterir.

Kakaonun toz haline getirilmesi aşamasında özellikle nem miktarı fazla ise tekrar mikrobiyal yük artar. Gerek kavurma işlemi öncesi gerekse sonrasında kakaonun mikroflorasında en sık rastlanan bakteri cinsi *Bacillus*'lardır. Çeşitli çalışmalarda izole edilen *Bacillus* türleri arasında *B. stearothermophilus, B. coagulans, B. subtilis, B. licheniformis, B. alvei, B. megaterium* ve *B. cereus* sayılabilir. Bu bakterilerden özellikle termofil sporlu olanlar puding gibi su aktivitesi yüksek olan kakaolu ürünlerin bozulmasında rol oynayabilmektedir. *Bacillus* dışında kavurma öncesi kakao yüzeyi veya tane içinde rastlanabilen mikroorganizmalar arasında enterik bakteriler de bulunur ancak kavurma işlemi ile mikrobiyal yük önemli ölçüde azalmaktadır. Ayrıca kakao da bulunan antosiyaninin antimikrobiyal etkisi bulunduğu ve bunu depolama sırasında bakteri popülasyonunda önemli bir azalmaya yol açtığı konusunda görüş birliği vardır.(Ünlütürk ve Turantaş, 1998)

Kakao tozu üretimi, sanayide 120–150°C de 5–8 dakika aralığında gerçekleştirilmektedir. Bu işlem kakao tozunda bulunan spor yapma özelliğindeki bakterilerin inaktivasyonu için yeterlidir. Ancak kavurma işleminin etkinliği ve bu aşamadan sonra kaynaklanabilecek olası kontaminasyon risklerine karşı herhangi bir inaktivasyon işlemi ya da düzeltme basamağı bulunmamaktadır. Gerek son ürün kalitesini arttırmak gerekse gıda güvenliği açısından birçok kakaolu ürünün ana bileşeni olan kakao tozunun mikrobiyal yükünü mümkün olduğunca azaltmak gerekmektedir.

Bacillus cinsine ait 34 tür bulunmakta olup, doğada toprak, su ve gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. *B. anthracis* sığır, koyun ve insanlar için patojendir. *B. cereus,* insanda gıda zehirlenmesine neden olmaktadır. *Bacillus coagulans* (*B. thermoacidurans*) ve *B. stearothermophilus* gibi ısıya dirençli spor oluşturan

termofilik türleri, özellikle konserve gıdalarda bozulma etkenidirler (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Bacillus sporlarının neden olduğu önemli sorunlardan biri de ekmek ve diğer unlu mamullerde görülen rope hastalığıdır. Söz konusu ürünlerde, genellikle sporlarının ısıya daha dirençli olmasından dolayı başta *Bacillus mesentericus'*un gelişmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ancak, *Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. megaterium, B. pumilus* ve *B. cereus* gibi diğer *Bacillus* cinsine ait bakterilerin de rope oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir. *Bacillus subtilis,* toprak kökenli bir bakteri olması nedeniyle sporları genellikle unda, nadiren mayada bulunmaktadır. Daha önce de belirtildiği üzere, sporları fırında pişirme sıcaklıklarına dirençlidir (Jensen, 1998).

Bacillus cereus ürettiği enterotoksinlerden; diyare (ishal etkeni) ve emetik (kusma etkeni) toksinler ile gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açan önemli bir türdür (Granum, 2001). Diğer *Bacillus* türlerinin gıda kaynaklı zehirlenmelerde etkin rol almadığı düşünülse de, konu ile ilgili yapılan yeni çalışmalarla bu türlerin içerisinde de diyare ve emetik toksinler üretebildiği belirlenmiştir. Enterotoksin ürettiği bilinen türler; *B. subtilis, B. pumilus, B. subtilis, B. pumilus,* ve *B. licheniformis'* dir (Kramer ve Gilbert.,1989; Pedersen ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki *Bacillus* cinsi bakteriler kakao tozunda bulunan baskın mikroorganizma türleridir (Gabis, 1974). Bu bakteriler spor yapabilme yetenekleri sayesinde endüstride üretim boyunca canlı kalabilmektedir. İnaktive edilemeyen bakteri sporları germinasyonla aktif hale geçerek insan sağlığında ve gıda bileşiminde sorunlara neden olabilmektedir.

Bu çalışmada, kakao tozu üretim basamaklarından kaynaklanan ve depolama koşullarında oluşabilecek kontaminasyonlar sonucu kakao yapısında bulunan *Bacillus* cinsi bakterilerin ısıl dirençlerinin ve termal ölüm kinetiklerinin tespit edilerek, kakao tozu ve kakaolu ürünlerde risk teşkil eden baskın mikroorganizma türünün belirlenmesi, bu mikroorganizmaların ısıl dirençlerin anlaşılması ve etkin bir sterilizasyon için seçilebilecek hedef mikroorganizmanın belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kakao

Kakao ağacının (*Theobroma cacao)* meyvesi olan kakao podları, çekirdeklerinin fazla olgunlaşmasına izin verilmeden hasat edilmektedir. Kakao podları kakao ağacının gövdesine bağlı olarak yetişmektedir. Her kakao podu yaklaşık 30-40 kakao çekirdeği içermektedir. Her çekirdek kotiledon ve embriyo olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Çekirdeklerin yeni bir bitki oluşturmak için kullandığı en büyük besin kaynağı kakao yağıdır. Kuru kakao çekirdeği %40 oranında kakao yağı içerebilmektedir. Kakao çekirdeklerinin etrafı beyaz, süngerimsi bir tabaka ile kaplıdır. Yoğun olarak müsilaj maddeleri ve şeker içeren bu tabakada fermantasyon için gerekli bileşenler bulunmaktadır. Kakao podları açıldığı anda çekirdek ve posa sterildir fakat çevresel kaynaklardan, çalışanların ellerinden, böceklerden, taşıma amacıyla kullanılan tanklardan vb. gelen çeşitli mikroorganizmalar tarafından kontamine olurlar.

2.1.1. Kakao Çekirdeğinin Fermantasyonu

Kakao çekirdeğinin fermantasyon işlemi mayaların posa içindeki şekeri alkol ve karbondioksite dönüştürmesi ile başlar. Daha sonra bakteriler alkolü, laktik aside dönüştürürler ve sonrasında koşullar daha aerobik hale dönüştüğünde asetik asit oluşur. Bu olay ile ısı oluşturur ve ilk 24 saat içerisinde sıcaklık yükselir. Posa kırıldığı ve dışarı aktığı zaman, bakteriler fermantasyon tamamlanana kadar aktivitesini sürdürmeye devam eder. Kakao fermantasyonunda bulunan mayalar toprak, ağaç gibi çevredeki ortamlardan kakao çekirdeğine bulaşmaktadır. Fermantasyonda aşamasında en sık rastlananlar *Saccharomyce* türleridir (*S. Cerevisiae,* kısmen ise *Candida krusei, Kloeckera apiculata, Pichia fermentans, Hansenula anomola* ve *Schizosaccharomyces pombe*). Hansen ve Welty tarafından yapılan çalışmalar mayaların fermantasyon esnasında çok hızlı bölündüğünü ve kurutma ile depolama aşamalarında canlılığına devam ettirebildiklerini göstermiştir.

Depolanmış çekirdekte 10^7 maya/g 'a kadar bulunmuştur (Schwan ve Wheals, 2004; Beckett, 1994).

2.1.2. Kakao Tozu Üretimi

Kakao çekirdeklerinin fermantasyondan sonra kurutulup, kavrulur. Kavurma işlemi, endüstride 120–150°C de 5–8 dakika aralığında gerçekleştirilmektedir. Kavurma ve fermantasyon işleminin ardından kakao kitlesine alkalizasyon işlemi uygulanarak, kakaoya kendine özgü aromasını ve rengi kazandırılmaktadır (Lopes ve Dimick, 1995).

Kavrulan taneler öğütülerek, kakao yağının ayrıştırılması işlemine geçilir. Bu işlem sırasında, kakao çekirdeğinin zarı ve kabukları vantilasyon ile kakao kitlesinden uzaklaştırılmaktadır. Yağı alındıktan sonra, elde edilen kakao kitlesi istenilen partikül büyüklüğüne göre öğütülerek kakao tozu elde edilir. Kakao tozu nem almayacak ambalajlara doldurularak taşıması ve depolanması gerçekleştirilmektedir. Bu işlem basamaklarından geçen kakao, ticari ürünlere işlenirken hemen hemen birçok üründe süt ile birlikte kullanılmaktadır (Schwan ve Wheals, 2004). Şekil 2.1.'de kakao tozu üretim basamakları özetlenmiştir. Elde edilen kakao tozunun kimyasal bileşimi; uygulanan kavurma işlemine, kakao bitkisinin yetiştirildiği bölgeye, iklim, toprak ve yağış koşullarına göre farklılık göstermesine karşın genel olarak bileşimi ve oranları Çizelge 2.1 de verilmiştir. Kakao tozu üretimi genel olarak Şekil 2.1'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmektedir.



Hasat

↓



Çekirdeklerin Çıkartılması



↓

Çekirdeklerin Fermantasyonu

↓

Kavurma

(120–150°C de 5–8 dakika)



↓



Öğütme

↓

Kakao Tozu

Kakao Likörü





Şekil 2.1. Kakao tozu üretim basamakları

Çizelge 2.1. Fermantasyon ve kavurma işleminden sonra elde edilen kakao tozunun kimyasal bileşimi (Beckett, 1994)

Bileşen	Kotiledon % Maksimum	Kabuk % Maksimum
Su	3.2	6.6
Yağ	57	5.9
Kül	4.2	20.7
Toplam azot	2.5	3.2
Teobromin	1.3	0.9
Kafein	0.7	0.3
Nişasta	9	5.2
Ham lif	3.2	19.2

Daha önce de açıklandığı gibi, kakaoya uygulanan kavurma işlemi (120–150°C de 5–8 dakika) teoride kakao tozundaki mikroorganizma sayısını sıfıra indirmeye yeterlidir. Ancak bu işlemin ne derece etkin yapıldığı, tüm kakao kitlesinin aynı sıcaklığa ulaşamaması ve kakao tozu üretiminden sonraki aşamalarda oluşan kontaminasyon kaynakları büyük risk teşkil etmektedir.

Kakaonun 140°C üzerinde uzun süre kavrulması sonucunda, aşırı kavrulmaya bağlı olarak yanık tat ve arzu edilir kakao tadında bozulmalar görülebilmektedir (Drouden, 1996).

2.1.3. Kakao Tozunun Mikroflorası

Kakaonun mikroflorasını belirlemek adına yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Söz konusu çalışmalara göre, kakao ve tozunda en çok, aerobik spor oluşturan *Bacillus* ve *Micrococus* cinsi bakterilerin baskın mikroflora olarak

belirtilmektedir. Kakao tozunun mikroflorası, kakao çekirdeklerinin fermantasyonunun ardından gerçekleşebilecek kontaminasyonlardan kaynaklanmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Gabis ve ark. (1970) yaptıkları çalışmada, 10 farklı kakao tozu örneğinden izole ettikleri mikroorganizmalar ve sayım sonuçları Çizelge 2.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 Kakao tozundan izole edilen mikroorganizma türleri (Gabis ve ark., 1970)

Mikroorganizma	KOB/ml
Bacillus licheniformis	233
B. cereus	102
B. megaterium	54
B. subtilis	40
B. alvei	11
B. badius	11
B. larvae	11
B. pumilus	8
B. pantothenticus	7
B. lentus	6
B. circulans	5
B. firmus	5
B. polymyxa	4
B. laterosporus	3
B. brevis	2
B. coagulans	2
B. macerans	2
B. pulvifaciens	1
B. sphaericus	1
B. stearothermophilus	1
Micrococcus freudenreichii	5
M. luteus	2
M. colpogenes	2
M. agilis	1

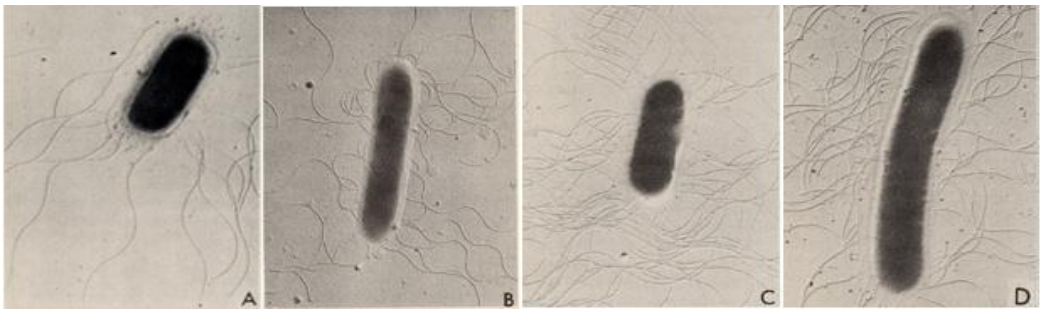
2.2. *Bacillus* Türleri

2.2.1. Genel Bilgiler

Birçok türü bulunan *Bacillus'*lar toprak, su hava ve çeşitli gıdalarda bulunurlar. *Bacillus anthracis*, insan ve hayvanlarda şarbon hastalığına neden olurken diğer bazı *Bacillus* suşları ise insanlarda gıda zehirlenmesine neden olabilmektedir. *B. coagulans* ve *B. stearothermophilus* pH 4,2 gibi oldukça düşük değerlerde gelişebilirler ve özellikle konserve gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *B. stearothermophilus* sporları, bakteri sporları arasında ısıya en dirençli sporlardır ve bu bakteriler gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, ishal, sepsis şarbon ve çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Ayhan, 2000).

Bacillus cinsi bakterilerin ortak özellikleri; gram pozitif, sporlu, aerobik ya da fakültatif anaerobik, katalaz pozitif olmalarıdır (Gabis ve ark., 1970, Turnbull ,1996). *Bacillus* cinsi bakteriler patojen özellik göstermelerinin yanı sıra, ürettikleri toksinlerde gerek ürün kalitesi ve gıda bileşiminde neden oldukları sorunlar gerekse insan sağlığına olumsuz etkileri yönünden büyük risk oluşturmaktadır.

Farklı türlere ait *Bacillus* hücreleri Resim 2.1 de görülmektedir.

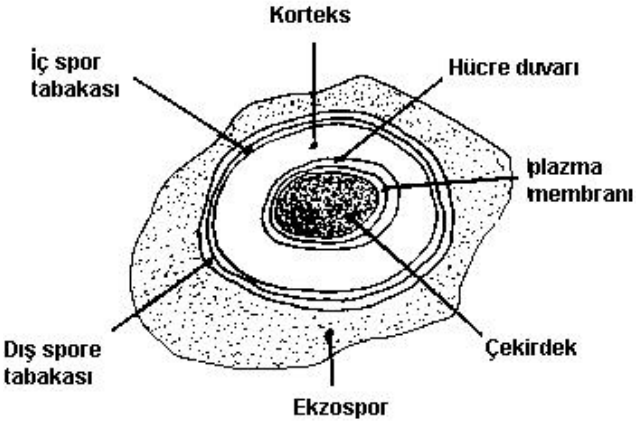


Resim2.1 Nutrient agar besiyerinde gelişim gösteren *Bacillus* türleri. (15000x büyütme gücü) A: *B. subtilis*, B: *B. polymyxa, C*: *B. laterasporis, D: B. alveli* (Anon, 2005a)

Vejetatif hücreler 0,5×1,2 μm ile 2,5×10 μm çapındadır. *Bacillus* cinsi bakterilerin koloni morfolojisi büyük çeşitlik göstermektedir. Çoğunlukla beyaz veya

krem renkli kolonilere sahip olup, bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah pigmentli kolonilere de rastlanmaktadır (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Bacillus ların en büyük ayırt edici özelliği spor oluşturma yetenekleridir. Spor bir çekirdek zarı ile çevrilidir tür özelliğine göre hücreler ekzospor içerebilmektedirler. Spor oluşumu, ortamdaki elzem besin elementlerinin azalması, ortam ve hücre içi su konsantrasyonun azalması ile radyasyon ve diğer hücre gelişimini kısıtlayacak koşulların varlığında başlama özelliğine sahiptir.



Şekil 2.2. *Bacillus* 'ların spor yapısı

Sporun iç ve dış tabakaları sporun ısıl, kimyasal, fiziksel ve radyasyon direncini sağlar. Bu tabakaların kalınlığı hücrenin inkübasyon koşullarında maruz kaldığı ısı, ışık yoğunluğu, besin yetersizliği, ortam pH'sı, ortam mineral içeriği ve su konsantrasyonu gibi stres koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

2.2.2. Bacillus Sporlarının Isıl Dirençleri

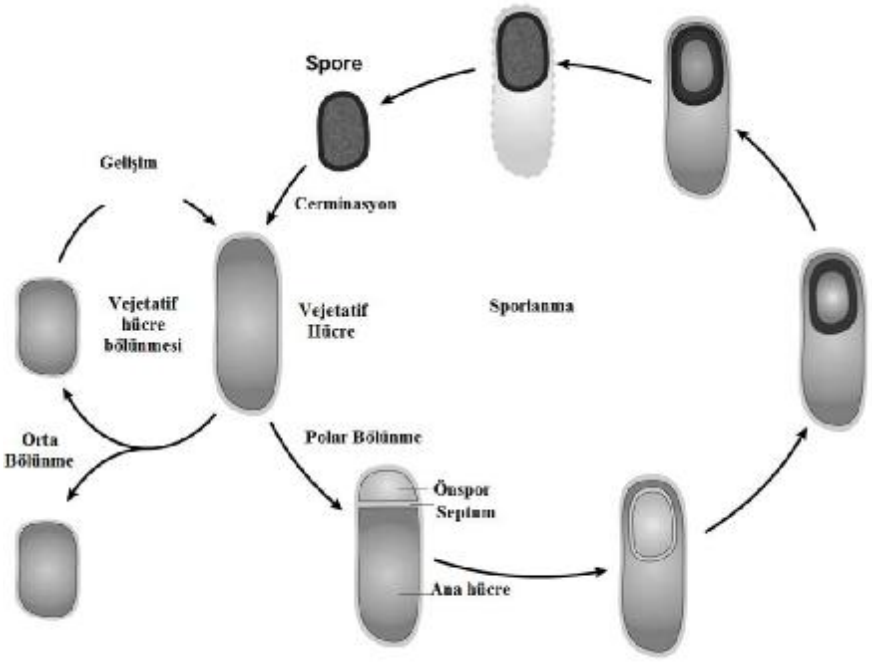
Bacillus sporlarının ısıl dirençlerini belirlemek amacıyla yapılan laboratuar çalışmalarında, sporların ısıl direncinin birden fazla faktöre bağlı olarak değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu faktörler; spor oluşturan türün genetik özellikleri,

bakterinin spor oluşturma safhaları, spor tabakalarının kalınlığı, bileşimi ve geçirgenliği, sporun nem içeriği, spor merkezinin mineral konsantrasyonu, spor DNA sının α/β-tipi küçük asitte çözünebilen protein yoğunluğu ve bu proteinlerin spor oluşturmada ve germinasyon aşamalarında zarar gören büyük makro molekülleri tamir edebilme mekanizmalarına bağlıdır (Wayne, 2000).

Bacillus cinsine ait türlerin, genetik özelliklerine bağlı olarak spor tabakalarının kalınlığı, mineral içeriği, ısıya dirençli ya da dirençsiz protein yapısı ve benzeri özellikler farklılık göstermektedir.

Genel olarak, mikroorganizmaların spor oluşturma safhalarının uzunluğu ve ortamda bulunan mineral madde konsantrasyonu, spor tabakalarının kalınlığına ve bu tabakaların kimyasal bileşimine farklılıklar kazandırmaktadır. Ortamda bulunan metal iyonlarının spor oluşum safhalarında kullanılmasının ardından spora uygulanacak ısıl işlem metal iyonlarının daha yoğun ısı tutma özelliklerinden ötürü farklı letal etki yapmasına neden olmaktadır (Condon, 1992).

Spor katmanlarının geçirgenliği, spor merkezine iletilecek su ve mineral madde miktarı ile ilişkilidir. Spor merkezinin su içeriği uygulanacak ısıl işlemin öldürücü etkiyi arttırmaktır. Spor merkezinin su miktarı ısıl işlem sırasında ısı taşıyıcısı gibi görev yaparak ısının, sporun genetik materyaline kadar taşınmasını sağlamaktadır. Genetik materyalin ısıl işlem ile zarar görmesi ise canlılık faaliyetlerinin kısıtlamasına neden olmaktadır (Setlow, 1999).



Şekil 2.3. Spor oluşumu ve germinasyonu (Errington, 2003)

Şekil 2.3.'de spor oluşumu ve spor germinasyonu verilmiştir. Safaların oluşumu *Bacillus* suşlarının özelliklerine göre farklılık gösterebilmektedir.

Bacillus'lar toprak, hava ve su kaynaklarında doğal olarak bulunabilmektedirler. Geniş yaşam spektrumları sayesinde 75˚C ve altında (termofilik türler) ila –8˚C ve üzeride (psikrofilik türler) ortam asitliğine göre ise pH 2-10 arasında ve birçok tür %7,5 tuz konsantrasyonunda gelişim gösterebilmekte ve gıda kaynaklı ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Anon., 2005a).

2.2.3. Gıda Endüstrisinde *Bacillus* 'ların Neden Olduğu Sorunlar

Bacillus cinsi bakteriler çok geniş sıcaklık spektrumunda gelişim gösterebilmektedir. Ayrıca toprak, hava ve su kaynaklı olarak gelişim göstermeleri gıda ürünlerine kontaminasyon riskini oldukça arttırmaktadır.

B. cereus'a ait hücrelerin vücuda çok sayıda alınması gıda zehirlenmesine yol açabilmektedir. Özellikle *Bacillus cereus* ile kontamine olmuş gıdaların üretiminden

tüketimine kadar geçen sürenin uzun olması sonucu ısıl direnci yüksek sporların germinasyon ile çoğalarak gıda zehirlenmesine neden olabilmektedirler. Stres koşullarında hücreler spor oluştururlar bu sporlar uzun süre uyku fazında kalarak uygun gelişme koşullarına ulaştıklarında germinasyon gerçekleştirebilirler. Bakterilerin gıda zehirlenmesi yaratabilmeleri için 10^6 /g konsantrasyonuna ulaşması gerekmektedir (Pichhardt, 2004).

Bacillus sporları hidrofilik özelliktedirler, bu özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde çelik, cam ve plastik yüzeylere yapışarak üretim hattı boyunca sorunlara neden olabilmektedirler. Yüzeylere tutunmuş halde bulunan sporların inaktivasyonu, çözelti haldeki sporların inaktivasyonuna oranla daha güçtür (Svensson, 2000).

Bacillus cereus'un psikrotrof türleri ile kontamine olan süt ürünlerinde, ürünün soğukta muhafazasında gelişim göstererek toksin oluşturdukları tespit edilmiştir (Özdemir, 2003).

Bacillus cereus iki farklı özellikte toksin üretmektedir. Bunlardan birisi 40 kDa ağırlığında ısıya dayanıklı bir protein olan enterotoksindir. Gıda zehirlenmesine neden olan bu toksin 126˚C'de 90 dakikada inaktif hale gelmektedir. Diğer toksin ise 5–7 kDa ağırlıkta, ısıya dayanıklı olan bir peptittir. 60˚C'de birkaç dakikada tahrip olmaktadır (Tunail, 2000).

Sporlu bakterilerin yüksek ısıl dirençlerinden ötürü bazı türlerin (*Bacillus stearothermophilus*) yaş-ısı sterilizasyonda biyolojik indikatör olarak kullanılmakta olduğu belirtilmektedir (Periago ve ark. 1998; Sang-Wook ve Sim, 2006).

Bacillus cereus ürettiği enterotoksinlerden; diyare (ishal etkeni) ve emetik (kusma etkeni) toksinler ile gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açan önemli bir türdür (Granum, 2001). Diğer *Bacillus* türlerinin gıda kaynaklı zehirlenmelerde etkin rol almadığı düşünülse de, konu ile ilgili yapılan yeni çalışmalarla bu türlerin içerisinde de diyare ve emetik toksinler üretebildiği belirlenmiştir. Enterotoksin ürettiği bilinen türler; *B. subtilis, B. pumilus, B. subtilis, B. pumilus,* ve *B. licheniformis*'dir (Kramer ve Gilbert.,1989; Pedersen ve ark., 2002).

2.2.4. *Bacillus* 'ların Isıl Dirençleri İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Foschino ve ark. (1990), yaptıkları çalışmada ısıl direnci yüksek *Bacillus* suşlarının UHT yöntemi ile üretilen sütlerde sterilizasyondan sonra bile canlı kalabildiklerini göstermişlerdir.

Petterssonve ark. (1996), yeni bir tür olan *Bacillus sporothermodurans*'ın UHT teknolojisi ile üretilen sütlerde canlı kalabildiğini kanıtlamıştır.

Benzer bir çalışmada, *Bacillus sporothermodurans*'ın çok yüksek ısı direncine sahip olduğu ve UHT yöntemi ile uygulanan sterilizasyon sonunda canlı kalabildiğini tespit etmişlerdir (Huemer ve ark., 1998).

Palop ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada bakteri sporlarının yüksek ısıl dirençlerinin hücre protoplazmasının içerdiği su miktarıyla doğrudan bağlantılı olduğunu ispatlamışlardır.

Cazemire ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada hücre içi mineral içeriği ($Ca^{2+,}$ $Mn^{2+,}$ $Mg^{2+,}$ Fe^{2+} ve K^{+}) yüksek *Bacillus* türlerinin ısıl dirençlerinin normal koşullardaki *Bacillus* suşlarına oranla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *B. Sporothermodurans'*ın UHT yöntemi ile üretilen sütlerde inaktivasyonu için gerekli sıcaklığın 130-140 ℃ arasında olması gerektiği saptanmıştır.

Giffel, (2002), *Bacillus, Aneurinibacillus* ve *Paenibacillus* cinsine ait bazı bakterilerin 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda canlılıklarını koruduklarını tespit etmişlerdir.

Simmonds ve ark. (2003), *Bacillus* cinsi bakteri sporlarının yüksek hidrofobik özellikleri sayesinde üretim proseslerindeki alet ve ekipmanlarına kontamine olarak ısıl işlem basamaklarından sonra bile canlı kalabildikleri kanıtlanmıştır.

Sheldemann ve ark. (2005) UHT yöntemi ile sterilize edilmiş sütte *B. sporothermodurans, Paenibacillus lactis, Brevibacillus borstelensis, B. sphaericus, B. licheniformis* ve *Brevibacillus brevis* cinsi bakterilerin varlığını tespit etmişlerdir.

Sporlu bakterilerin yüksek ısıl dirençlerinden ötürü bazı türlerin (*Geobacillus stearothermophilus*) yaş-ısı sterilizasyonda biyolojik indikatör olarak kullanılmakta olduğu belirtilmektedir (Periago ve ark. 1998 ; Sang-Wook ve Sim, 2006).

2.3. *Bacillus* 'ların İnaktivasyonun Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntem

İnaktivasyon sonuçlarının değerlendirilmesinde matematiksel modelleme planları kullanılmaktadır ve bu modelleme planlarından elde edilen veriler inaktivasyon gelişimini yorumlamakta kullanılmaktadır. Bu amaç ile birçok modelleme planı kullanılmaktadır.

Matematik modelleme planları gıda içerisindeki ve gıda üretimi sırasında inaktive edilmek istenen mikroorganizmaların ölüm kinetiklerinin anlaşılması ve yorumlanmasında 1920 yılından beri yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu anlamda yapılan ilk çalışma konserve endüstrisinde *C. botulinum*'un inaktivasyonudur. Yapılan çalışmada *C. botulinum*'un inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesine odaklanılmıştır (Hersom, 1980).

Günümüzde gıdalarda risk teşkil eden mikroorganizmalar daha net bilinmekte ve inaktivasyonları için daha fazla çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalarda inaktive edilmeye çalışılan mikroorganizmaların ölüm kinetiklerini yorumlamak amacıyla birçok modelleme planı geliştirilmiştir.

Klasik inaktivasyon modeli olan First-order modelinde (lineer modelle) inaktivasyonun kinetiğini doğrusal grafikler ile yorumlamaya olanak verir. Ölüm kinetiği doğrusal ve doğrusala yakın olmayan mikroorganizmalar için bu modellin kullanılması tutarlılığı düşük sonuçlar vermektedir (Campenella, 2001).

İnaktivasyonun lineer grafiklere açıklanamayacak mikroorganizmalar için daha kompleks modelleme planları geliştirilmiştir.

Stringer ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada lineer olmayan modeller için 2 açıklama üretmişlerdir. Bu amaç ile geliştirilen modelde sabit sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen seri inaktivasyonlar sonucu elde edilen verileri kullanarak muhtemel

inaktivasyon değerini veren bir formülasyon geliştirmişlerdir. İnaktivasyon grafiklerini omuz ve kuyruk olarak nitelendirdikleri içbükey ve dışbükey grafik şekillerine ait doğru denklemlerini kullanarak herhangi bir inaktivasyon koşulunda mikroorganizma sayısında gerçekleşmesi beklenen desimal azalmanın formülasyonunu geliştirmişlerdir.

İnaktivasyon kinetiğini incelemede özellikle yüksek dirence sahip mikroorganizmaların ölüm eğrilerinde sabit bir dağılım görülmemektedir. İnaktivasyon grafiği genellikle parabolik bir eğri şeklindedir. Çalışılan mikroorganizmanın sahip olduğu koruyucu faktör (inaktivasyon koşullarına gösterdiği direnç) genellikle hücre zarı ve tabakaları, kapsül ve veya enzim sistemlerinden kaynaklanmaktadır. Bu koruyucu özelliğin ortadan kalkması inaktivasyon işleminin yoğunluğuna (ısı, ışık, kimyasal vb) etmenler ile ani değişimler gösterebilmektedir. Öldürücü etkinin sağlanması ile inaktivasyon sonuçlarında ani düşüşler görülebilmekte ve alınan sonuçların doğrusal modelleme planları ile açıklanması tutarsız sonuçların alınmasına neden olabilmektedir.

Son yıllarda inaktivasyon kinetiğinin hesaplanmasında kullanılan modeller içerisinde Weibull modeli oldukça popüler olmuştur. Bu modelde elde edilen inaktivasyon verileri kullanılarak herhangi bir zamanda mikroorganizma sayısındaki en muhtemel azalma oranı tespit edilebilmektedir (Van Boekel, 2002).

İnaktivasyon kinetiğinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan modelleme planları First-order modeli ve Weibull modelidir. Doğrusal grafiklerin için First-order modeli ve parabolik grafikler için Weibull modeli seçilmesi daha tutarlı sonuçlar vermektedir.

First-order modeli aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir;

$$\ln N_t = \ln N_0 - kt \qquad (3.1)$$

N_t değeri t süresindeki mikroorganizma sayısını, N_0 başlangıç mikroorganizma sayısını ve k değeri first-order oran sabitini ifade etmektedir. Desimal düşüş zamanı

(D değeri) eşitlik 2 ile bulanabilir: (3.2)

$$\boxed{D = \frac{2.303}{k}}$$

Weibull modeli ise aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmektedir;

$$Log\frac{N_t}{N_0} = LogS(t) = -\left(\frac{t}{d}\right)^p \quad (3.3)$$

N_t t süresindeki mikroorganizma sayısını, N_0 başlangıç mikroorganizma sayısını, p şekil parametresi dir. δ değeri ilk desimal düşüş süresini ifade etmektedir.

Bu değer eşitlik 3.1 'deki D değerinden faklıdır. δ değeri uygulanan ilk ısıl işlem sıcaklığında oluşan ilk desimal düşüşü göstermektir. Ancak D değeri sıcaklar ortalamasıdır. Yani burada first order modeline ait, D değeri ile Weibull modeline ait δ değeri karşılaştırılarak değerlendirme yapabilmeye olanak vermektedir.

D ve δ öldürücü bir uygulamada (ısıl işlem, kimyasal madde uygulaması) canlı türünün 1 logaritma birimi ölmesi için gereken süredir ve dakika ile ifade edilir. Z değeri ise D değerinde 1 log değişim için gereken sıcaklık derecesinin değişimidir. Ve bir sıcaklık derecesini belirtir. Bir Z değeri bulmak için D değerlerinden oluşan bir grafiğin eğiminden yararlanılmaktadır. Yani en az 3 D değeri kullanılarak çizilen grafiğin(tek D değeri ile inaktivasyona ait 1 nokta, 2 D değerinden ise ancak bir doğru elde edilebilir) eğimi ile Z değeri elde edilebilir.

Ortalama Hatalar karesi (MSE_{model}) aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmiştir.

(3.4)

$$MSE_{model} = \frac{RSS}{DF} = \frac{\sum_{i=1}^{n} (\log N^{i}_{observed} - \log N^{i}_{fitted})^2}{n - s}$$

RSS (residual sum of squares) : fark toplam kareleri (analiz sonucunda elde edilen değer ile grafiğin verdiği fit değerleri arasındaki farkın kareleri toplamıdır.)

DF: (degrees of freedom) bağımsızlık derecesi

n: grafik üzerindeki veri noktalarını sayısını

s: modeldeki parametre sayısını

$N_{observed}$: Bulunan popülasyon seviyesini

N_{fitted} : Grafiğin fit ettiği popülasyon seviyesini ifade etmektedir.

Ortalama Hata Kareleri toplamı(MSE) : değerinin küçük oluşu modelin verileri daha iyi açıkladığını göstermektedir.

Regresyon katsayısı (R^2) Microsoft Excel programında R^2 çözücüsü ile hesaplanmaktadır.

R^2 modeli ile derecelendirilmiş toplam değişkenliklerin oranıdır. Bu değere 0 ile 1 arasındadır. Değerin 1'e yakınlığı seçilen modelin daha iyi bir fitleme yaptığı söylenebilir.

Af(accuracy factor) Doğruluk faktörü aşağıdaki eşitlik ile bulunmuştur.

$$A_f = 10^{\frac{\sum_{i=1}^{n} \log\left|(predicted / observed)\right|}{n}}$$

(3.5)

A*f* değeri modelin doğruluğunu yani grafik için çizilen ortalama ve tespit edilen noktaların nasıl fit ettiğinin açıklamasıdır. Yani doğruluk faktörü 1 ise modelin mükemmeldir denilebilir. Eğer doğruluk faktörü 1in üzerindeyse doğruluk

oranı düşer: Örneğin doğruluk faktörü 2 ise beklenen değerler tespit edilen değerlerin 2 katı üzerinde demektir. (Mafart, 2002 , Couvert ve ark. , 2005)

Bu iki yöntemin kullanılmasındaki amaç ısıl inaktivasyon işlemlerinden alınan sonuçların grafik olarak çizilmesinde inaktivasyonun doğrusal ya da parabolik olarak gelişimlerine en uygun grafiğin çizilmesi ve iki yöntemin tutarlılık sonuçlarının karşılaştırılmasıdır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Hollanda'da daha önceden temin edilen 5 farklı firmaya ait kakao tozu örnekleri analize alınarak, *Bacillus* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Çalışma, Hollanda'nın Wageningen Üniversitesi, Gıda Mikrobiyolojisi Bölümü laboratuarında yürütülmüştür.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler ve kullanım amaçları Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler

Besiyeri/ Çözelti	Bileşim	Kullanım Amacı	İnkübasyon Koşulları
Nutrient Broth	Hazır besiyeri	İzole edilen mikroorganizmaların çoğaltılması	37 ºC'de 12 saat
Nutrient Agar	Hazır besiyeri	İnaktivasyondan önce ve sonra mikroorganizmaların gelişimi	37 ºC'de 1- 7 gün, Aerob
Mineral içerikli Nutrient Agar Besiyeri	Hazır besiyeri	Spor gelişimi (mineral içeriği kakao tozuna yakın)	37 ºC'de 1-6 gün, Aerob
0,01M Fosfat tampon Çözeltisi		Bakterileri sitoplazma içeriğini dengede tutmak	
0,01M Fosfat tampon çözeltisi(% 0,1lik tween çözeltisi karışımı)		Ekzosporların süspansiyon hale getirmek	
Gliserol Çözeltisi		Donmuş stok kültür hazırlama	
Pepton Seyreltme çözeltisi		Seyreltme	

3.1.2. Çalışılan Bakteri Kültürleri

Çalışmaya 100 *Bacillus* suşu ile başlanmış olup, daha sonraki esas çalışmaya ise ısı direnci yüksek 6 suş üzerine yoğunlaşılarak devam edilmiştir. Çizelge 3.2' de araştırmada kullanılan bakteri suşları ve kod numaraları verilmiştir.

Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan *Bacillus* bakteri kültürleri

Bakteri	Suş no
Bacillus licheniformis:	49
Bacillus subtilis:	81, 101, 125, 162A
Tanımlanamayan suşlar	64

3.2. Metot

3.2.1. Kakao Örneklerinden *Bacillus* Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Kakao tozu örnekleri 80˚C de 5 dakika pastörizasyon işlemine tabi tutularak vejetatif hücrelerin inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Örnekler Nutrient agar besiyerine ekilerek 30˚C, 32˚C, 37˚C ve 42˚C'lerde inkübasyona bırakılmıştır. Koloni morfolojilerine göre seçilen suşlara gram boyama ve katalaz testi uygulanmış ve böylece suşların *Bacillus* ya da *Micrococcocea* cinsine ait olup olmadıkları belirlenmiştir. *Bacillus* suşları izole edildikten sonra, koloni morfolojisi incelenerek kodlanmıştır. Daha sonra, söz konusu suşların, saflık, canlılık ve aktivite özellikleri test edildikten sonra API 50CHB yöntemi ile identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre tanımlanan suşlar *Bacillus subtilis* (suş 81, 101, 125, 162A) *Bacillus licheniformis* (suş 49) olarak tespit edilmiştir. Suş 64 ün tanımlanması gerçekleştirilememiştir.

3.2.1.1. API Test Kiti ile *Bacillus* Suşlarının Tanımlanması

Elde edilen kültürlerin bazı biyokimyasal özelliklerini değerlendirmek amacıyla API 50CHB (Biomeriux) test kiti kullanılmıştır. API sistemindeki biyokimyasal testlere göre elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar bilgisayar programında değerlendirilmiştir (Biomerieux, 2003).

3.2.2. Stok Kültür Hazırlama

Çalışmada her koloni şekli, oluşum süresi, rengi ve gelişim sıcaklıklarına göre suşlara kod numaraları verilmiştir. Saflık derecesi ve aktivitesi yüksek, spor oluşturan suşlar seçilerek çalışmaya devam edilmiştir. Bu suşlar, nutrient agar besiyeri içerisinde çoğaltılarak olası mutasyon ve kontaminasyon riskine karşı korunmak için -80ºC de gliserol çözeltisi içerisinde muhafaza edilmiştir. Her suş için 7 tüp hazırlanmıştır. (Ek 1)

3.2.3. *Bacillus* Sporlarının Elde Edilmesi

Çalışmanın ilk aşamasında, stok kültürden alınan *Bacillus* suşu, 50 ml Nutrient Broth içeren 250 ml lik erlen içerisine inokule edilmiştir (Ek 2). Suşun sıcaklık gereksinimine göre (mezofilik türler için 37 ºC, termofilik türler için 42ºC) çalkalamalı su banyosunda (Julabo sw22) 12 saat inkübe edilmiştir. Kontrol amacı ile *Bacillus* suşu içermeyen başka bir erlen de su banyosunda aynı süre ve sıcaklıklarda bekletilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, su banyosundaki kontrol örneğinin şeffaf ve parlaklığına bakılarak, besiyerden kaynaklanan bir kontaminasyon olup olmadığı değerlendirilmiştir. Daha sonra, *Bacillus* suşlarının geliştiği erlenlerden preparat hazırlanarak, mikroskop altında vejetatif hücrelerin saflığı ve şekli incelenmiştir.

Seyreltme işleminde kullanılmak üzere 9 ml lik Pepton seyrelme çözeltisi tüpleri hazırlanmıştır. (Ek 3) Seyreltme tüplerinden alınan 100 µl lik örnekler nutrient agar içeren petri kutularına ekilerek gerekli inkübasyon süreleri boyunca beklenilmiş ve her

suş için KOB/ml değeri hesaplanmıştır. Erlenlerden alınan 100µl lik örnekler spektrofotometre (Novaspec II pharmacia biotech) de optik yoğunlukları ölçülmüş ve bulgular kayıt edilmiştir.

Bu işlemin ardından erlenlerden alınan 1 ml lik örnekler spor oluşum besiyerine aktarılarak gerekli sıcaklık ta inkübasyona terk edilmiştir. Her suş için 7 adet spor oluşum petrisi hazırlanmıştır.

Çalışmanın üç, dört ve beşinci gününde spor oluşum besiyerlerinden alınan örnekler, mikroskop altında incelenerek, *Bacillus* hücrelerinin; vejetatif, serbest spor ve sporlanma aşamalarından hangisinde olduğu değerlendirilmiştir. Mikroskop görüş alanı içerisinde %90-95 verime ulaşan serbest spor konsantrasyonu, petri kutularından da spor eldesine hazır hale geldiklerini ifade etmektedir.

Bu işlemin ardından, spor eldesi aşamasına geçilmiştir. Sporların yıkama işleminde, +4ºC de muhafaza edilen fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Her petri kutusu için 5 ml fosfat çözeltisi otomatik pipetler ile spor oluşum petri kutularının yüzeyine enjekte edilerek, spatül ile yayma işlemi yapılarak yüzeyde gelişen bakteri sporları ile fosfat çözeltisinin bir süspansiyon oluşturulması sağlanmıştır. Oluşan çözelti tekrar otomatik pipet kullanılarak "Granineer" marka santrifüj tüpleri içerisinde toplanmıştır. 7 petri kutusunun içeriği 50 ml lik granieer tüpleri içersinde toplanmıştır.

Elde edilen spor çözeltisi saflaştırmak ve yabancı partiküllerinden uzaklaştırılmak amacıyla santrifüj (Eppendorf 5804R) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi, başlangıçta 6000 rpm ve 7 dakika süre boyunca ve +4ºC de gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi % 99 saflığa ulaşılıncaya kadar kademeli olarak arttırılarak 4 gün boyunca uygulanmıştır. Elde edilen spor sedimentine, 30 ml fosfat çözeltisi ilave edilerek stok spor çözelti hazırlanmıştır.

Uygulanacak ısıl inaktivasyonun etkinliğini anlayabilmek için stok kültürün spor titresinin (çözeltinin içerdiği spor yoğunluğunun) bilinmesi gerekmektedir. Bu amaç için, spor çözeltisinden alınan 100µl örnek nutrient agar örneği petri kutularına ekilerek gerekli sıcaklık ve süre boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon ardından yapılan sayım sonuçları ile mevcut çözeltinin spor yoğunluğu hesaplanmıştır.

Standart bir analiz yapabilmek için spor konsantrasyonu tüm suşlar için $10x10^7$ kob/ml olarak ayarlanmıştır.

$10x10^7$ konsantrasyonda ve % 99 saflıkta spor içeren spor çözeltileri ısıl inaktivasyon işlemine hazır hale gelmiş olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. *Bacillus* Sporlarının Isıl Dirençlerinin Belirlenmesi

İnaktivasyon işlemi her suşun ısı direncine göre ayrı ayrı seçilmiştir. İnaktivasyon çalışmasına düşük sıcaklıklar ve süreler ile başlanılmış ve bu değerler kademeli olarak arttırılarak devam edilmiştir.

Uygulanacak ısıl inaktivasyon işlemi olarak "Kooiman Metodu" izlenmiştir. Bu yöntem gereğince kauçuk bir tabaka içeren vida kapaklı çelik tüpler, gliserol banyosu ve Hamilton şırıngası kullanılmıştır (Kooiman , 1973).

Hamilton şırıngasının kompartımanı çamaşır suyu çözeltisi sterilize edilerek, saf su ile kalıntılarından arındırılmıştır. Çelik tüpler içleri 9,8 ml tampon çözeltisi ile doldurulup 115ºC de 21 dakika sterilize edildikten sonra analize başlamadan sıcaklık derecesi ayarlanmış gliserol banyosu içersinde yarım saat bekletilmiştir. Tüp ve tüp içeriğinin analiz sıcaklığına ulaşmasının ardından Hamilton şırıngası ile spor çözeltisinden alınan 200 µl örnekler gliserol banyosunda bekletilen vida kapaklı tüplerin kauçuk membranı delinerek tüp içerisine inokülasyon yapılmıştır. Gerekli süre boyunca beklenilerek zaman kaybetmeden buzlu su içerisine daldırılarak soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüpler karıştırıcı da karıştırılıp (Vortex mana) tüp içeriği homojen hale getirilmiştir. Tüp içerisinden alınan 1 ml lik örnekler boş petri kutularına ilave edilerek üzerlerine sıvı nutrient agar besiyeri ilave edilerek 2 kez sekiz çizmek sureti ile tezgah üzerinde karıştırılarak katılaşıncaya kadar beklenmiştir. Katılaşan petri kutuları, çalışılan tüm suşların mezofilik olması nedeni ile 37ºC de inkübe edilmiştir.

Her suş için ayrı ayrı yapılan ısıl inaktivasyon işlemine ait sıcaklık ve süreler Çizelge 3.3. ' de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Tüm suşlara ait inaktivasyon koşulları

Suş	Sıcaklık	Zaman (dakika)						
Suş 49	**110°C**	1	3	5	7			
	115°C	1	2	3	5	6	7	8
	117.5°C	0,25	0,5	1,5	2	3	5	
	120°C	0,25	0,5	1	1,5	2	3	
	122.5°C	0,25	0,5	0,75	1			
Suş 64	**100°C**	2	4	6	8	10		
	105°C	1	1,5	2	3			
	107°C	0,25	0,5	1	1,5	2		
	110°C	0,25	0,5	1	2			
	115°C	0,25	0,5	1				
Suş 81	**100°C**	4	6	8	10	12		
	105°C	0,5	1	1,5	2	3		
	107,5°C	0,25	0,5	1	1,5	2	3	
Suş 101	**110°C**	4	6	8	10	12		
	115°C	0,5	1	1,5	2	3		
	117,5°C	0,25	0,5	1	1,5	2	3	
	120°C	0,25	0,5	1				
Suş 125	**95°C**	1	3	5	7			
	100°C	1	2	3	4	6	12	
	105°C	0,5	1	2	3			
	110°C	0,5	1					
	115°C	0,5	1					
Suş 162A	**117,5°C**	0,5	1	2	3	5	7	10
	120°C	1	3	5	7	10		
	122,5°C	1	2	3				
	125°C	0,25	0,5	0,75	1	2		
	130°C	0,25	0,5	0,75	1			

3.2.5. Matematiksel Model Seçimi ve Fitleme Değeri

İnkübasyon sonucu oluşan koloniler ikinci günden başlamak üzere dördüncü, beşinci ve altıncı gün olmak üzere sayılarak rapor edilmiştir. Sayım sonuçları ardışık

seyreltme faktörüne sahip petri kutuları için 15-300 arası koloni içeren petri kutuları dikkate alınarak yapılmıştır en yüksek seyreltme faktörüne sahip petri kutularından alınan koloni sayım sonuçları doğrudan kayıt edilmiştir. Isıl işlem öncesi birim hacim de bulunan mikroorganizma sayısının oluşturduğu koloni sayısın ısıl işlem sonucu oluşan koloni sayısına oranı ile ısıl inaktivasyonu etkinliği tespit edilmiştir.

İnaktivasyon işleminden elde edilen sonuçlar, Weibull (Mafart , 2002 ; Couvert ve ark., 2005) ve First-order (Van Boekel, 2002) modelleme planı ile değerlendirilmiştir.

3.2.6. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Elde edilen bulguların istatistiksel analizinde Weibull ve First order modelleme planları kullanılmıştır. Microsoft Excel programı ve bu programdan elde edilen sonuçların tutarlılığını kontrol etmek için ise TableCurve 2D programı (Windows v. 2.03) kullanılmıştır. İstatistiksel indislerden alınan sonuçların tutarlılığı iki model karşılaştırılarak belirlenmiştir (Den Besten ve ark., 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Donmuş kültürden seçilen mezofilik *Bacillus* sporlarına fosfat tampon çözelti içerisinde ısıl inaktivasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda suş 49, 64, 81, 101, 125 ve 162A en tutarlı sporlanma sonuçlarını vermiştir ve çalışmaya bu suşlar üzerine odaklanılarak devam edilmiştir.

4.1. Kakao Tozundan *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Analize alınan kakao tozu örneklerinden 100 izolat elde edilmiş ve izole edilen suşların API test kiti ile tanımlanması sonucunda, bunlardan biri *Bacillus licheniformis,* 4'ü *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmıştır. Suş 64, suş 1 ve suş 91'in tanımlanması gerçekleştirilememiştir. Çizelge 4.1'de çalışılan türlere ait özellikler gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* Suşları ve Özellikleri

Suş No	**Absorbans değeri** (600 nm)	**Hücre Morfolojisi**	**Spor tipi**	**İnkübasyon Sıcaklığı**
1	1,78	Kısa ve kalın ve hareketli	Spor oluşumu saptanmadı	10ºC, 20ºC, 30ºC,37ºC
49	14,6	Küçük, kalın ve harketli	Serbest	37ºC
64	2,07	Büyük, kalın ve hareketsiz	Ekzosporidum	37ºC
81	1,54	Kısa, hareketsiz ve ince	Serbest	37ºC
91	2,09	kısa, hareketli ve ince	Serbest	37ºC
101	2,61	Kısa, hareketli ve ince	Serbest	37ºC
125	1,37	Kısa, hareketsiz ve ince	Serbest	37ºC
162A	9.4	Küçük, kısa ve hareketli	Serbest	37ºC

4.2. *Bacillus* Suşlarının Spor Oluşturma Özellikleri

Suş 1 ile yapılan 3 farklı çalışmaya ve inkübasyon koşullarına (10ºC, 20ºC, 30ºC, 37ºC) rağmen spor oluşumu saptanamamıştır. 10ºC'de hücrelerin canlılığını yitirdikleri 30ºC ve 37ºC'lerde ise hücrelerin strese girdikleri ve oluşan stres sonucunda hücrelerin hareketleri azaldığı, üremede 2 yeni hücrenin birbirinden koparak ayrılmadığı gözlenmiştir (Resim 3.1).



Resim 3.1. Stres koşullarındaki *Bacillus* hücreleri (Suş 1)

Suş 49 çalışılan türler içerisinde en yoğun gelişimi gösteren suş olarak belirlenmiştir. Bu türe ait spor oluşum besiyerlerinin %90 saflığa ulaşmaları 3 gün sürmüştür. Hücre morfolojisi küçük ve kalın olarak gözlenmiştir.

Suş 64'ün büyük ve kalın hücre morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu suş diğer suşlardan farklı olarak ekzospor içermektedir. Ekzosporların hücre duvarından ayrılarak serbest hale geçmelerini sağlamak amacıyla fosfat tampon çözeltisi %0.1 lik Tween 80 çözeltisi ile karıştırılarak kullanılmıştır.

Suş 81'in kısa, hareketsiz ve ince hücre morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu suşun, spor oluşum besiyerinde %90 saflığa ulaşması 2 gün sürmüştür.

Suş 91'in kısa, hareketli ve ince hücre morfolojisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Spor oluşum besiyerinde %90 saflığa ulaşması 6 gün sürmüştür. Ancak otomatik pipetten kaynaklanan kontaminasyon sonucu bu suş kullanılamaz hale gelmiştir.

Suş 101'in kısa, hareketli ve ince hücre morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Spor oluşum besiyerinde %90 saflığa ulaşması 7 gün sürmüştür. En uzun spor oluşturma süresi bu suşta gözlenmiştir.

Suş 125'in kısa, hareketsiz ve ince hücre morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Spor oluşum besiyerinde %95 saflığa ulaşması 2 gün sürmüştür.

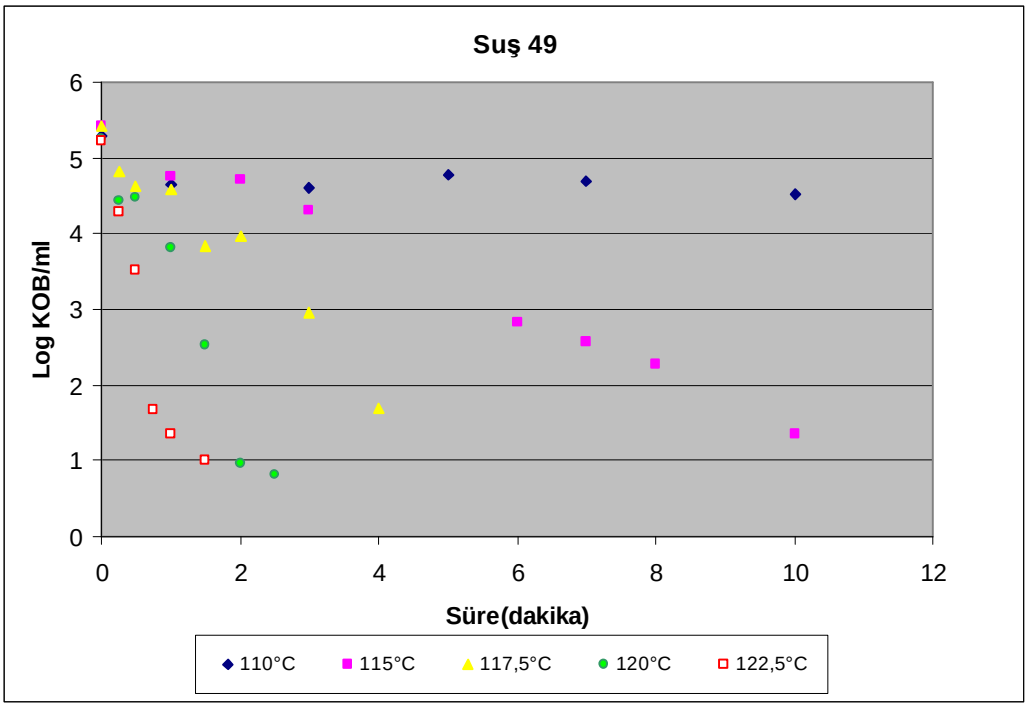
Suş 162A ile yapılan çalışmada ise hücre morfolojisin küçük, kısa, siyah renkli olduğu ve hücre içinde gri noktalar bulunduğu gözlenmiştir. Spor oluşum besiyerinde %95 saflığa ulaşması 6 gün sürmüştür.

Genel olarak suşların spor oluşumları 37˚C'de 2-7 gün içerisinde tamamlanmıştır. En hızlı spor oluşumu suş 81'de (2 gün) en yavaş spor oluşumu ise suş 101'de (7 gün) gözlemlenmiştir.

4.3. *Bacillus* İzolatlarının İnaktivasyon Kinetikleri

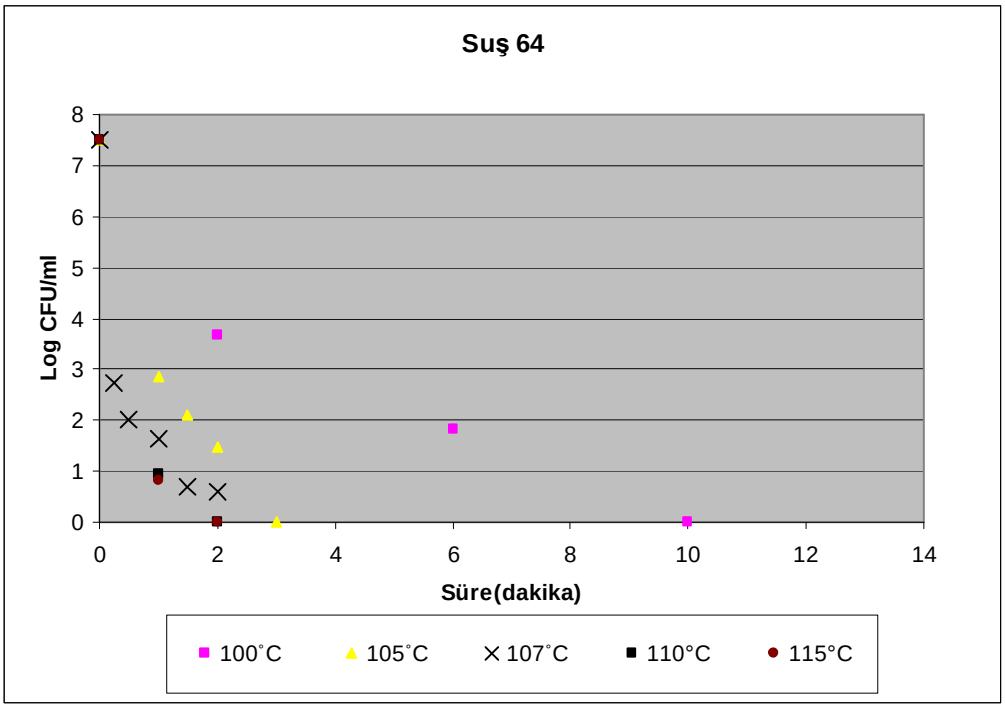
Bacillus türlerine ait 49, 64, 81, 101, 125 ve 163A suşlara ısıl işlem uygulanarak söz konusu suşların ayrı ayrı inaktivasyon kinetikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar grafik haline getirilerek yorumlanmıştır.

Şekil 4.1. Suş 49'a ait termal ölüm grafiği



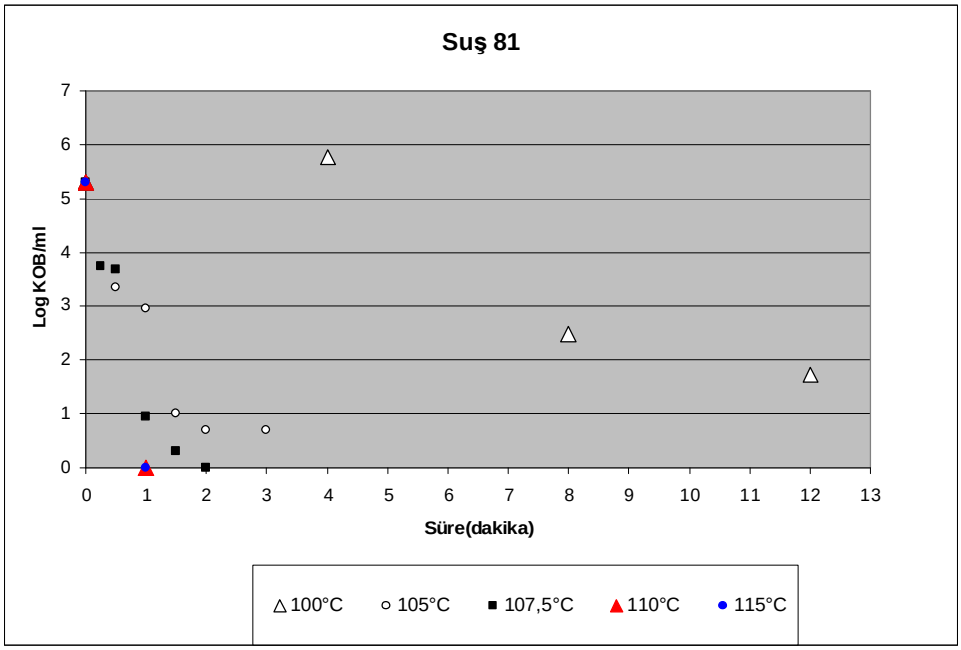
Suş 49 için 110ºC de inaktivasyondan bahsetmek güçtür. Çünkü inaktivasyon için uygulanan 115ºC'de 10 dakikalık ısıl işlem sonucunda sadece 4 logaritmik azalma saptanmıştır. 117,5ºC de is 3 dakika da 2 logaritmik azalma ve 1,5 dakika sonra ise tüm canlı hücrelerin öldüğü saptanmıştır. 120ºC'de 3 dakikada 5 logaritmik azalma ve 122,5ºC'de ise 4 logaritmik düşüşün 1 dakikada gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.1.).

Şekil 4.2. Suş 64'e ait termal ölüm grafiği



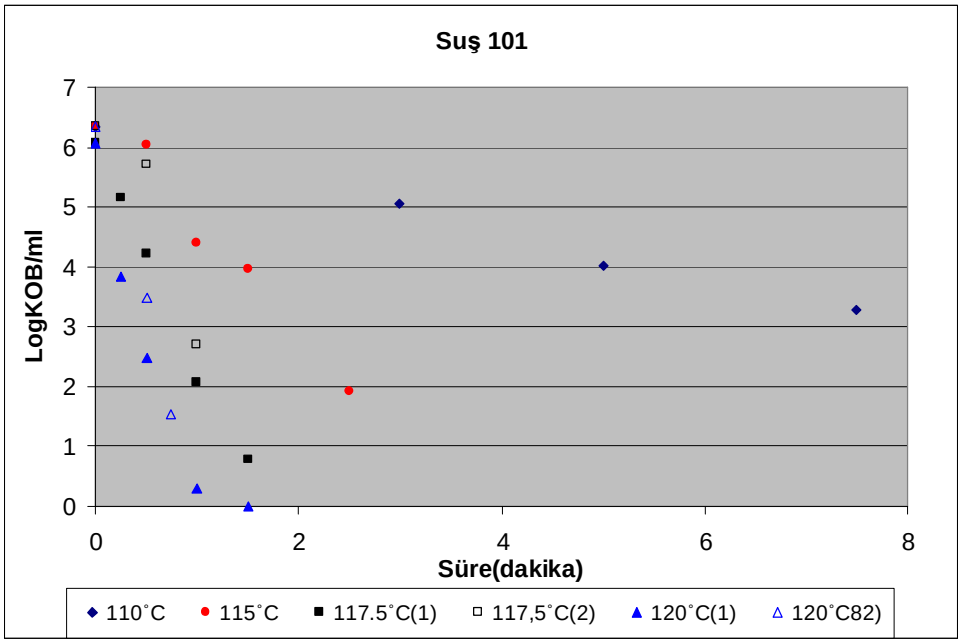
Suş 64 için, 100ºC de 10 dakika uygulanan ısıl işlem, 7,5 logaritmik azalma sağlamış olup, 105ºC bu değer 3 dakikaya 107,5ºC 'de 2 dakikaya ve 110ºC ve 115ºC de ise bu değerin 1 dakikaya düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.2.).

Şekil 4.3. Suş 81'e ait termal ölüm grafiği



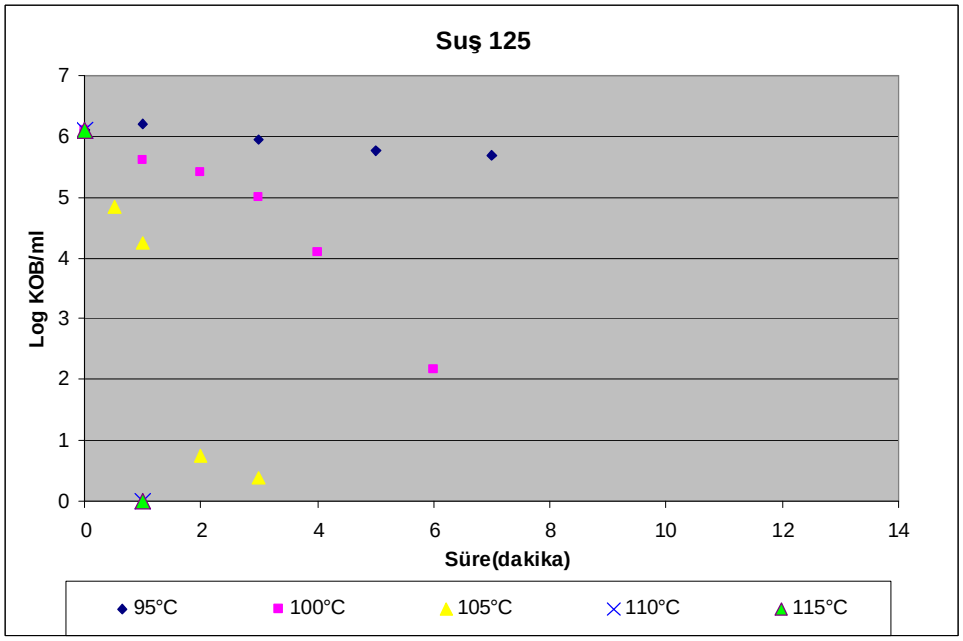
Suş 81'e ait inaktivasyon grafiği değerlendirildiğinde ise; başlangıçta 5,5 olan canlı hücre sayısı yarım logaritmik artış göstermiştir. 3 paralel ile yapılan bu çalışmadan alınan sonuçlar benzerdir. Uyku hali (veya durgun fazdaki) spor hücrelerinin uyku fazını halini kırmak için belirli bir enerji düzeyin üzerinde uyarıcıya gereksinim vardır. Bu etki düşük sıcaklıklar ile başlanan ısıl işlemde hücrelerin maruz kaldığı ısıl işlem önce spor yapıdaki hücrelerin spor yapılarını bozmaya zorlayarak toplam hücre sayısını arttırmıştır. Ayrıca, alınan enerjinin birikmesi(artması) ile öldürücü etki artmış ve düşüş başlamıştır. 100ºC'de 12 dakika süren ısıl işlem yaklaşık olarak 4 logaritmik düşüşe neden olmuştur. 105ºC'de 3 dakika süren ısıl işlem ile 5 logaritmik azalma 107,5ºC de 2 dakika da 5,5 logaritmik azalma ve son olarak 110ºC de 1 dakika da 5,5 logaritmik azalma görülmüştür (Şekil 4.3.).

Şekil 4.4 Suş 101'e ait termal ölüm grafiği



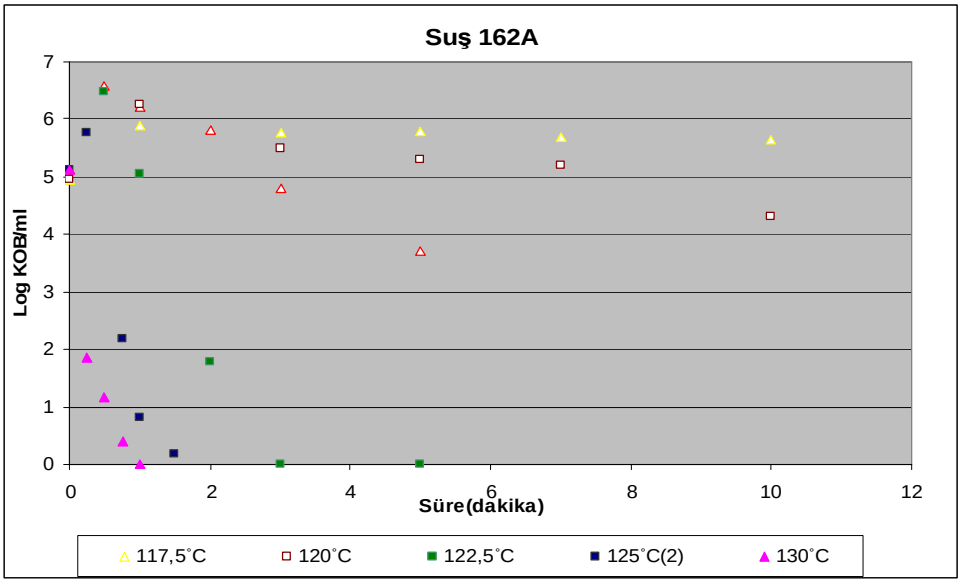
Suş 101 için 110ºC'de 7,5 dakikada 3 logaritmik azalma sağlanırken, 115ºC'de 2,5 dakikada 4 logaritmik, 117,5ºC de 6 logaritmik düşüş 1,5 dakikada ve 120ºC'de ise 1,5 dakikadan az sürede 6,5 logaritmik azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.4.).

Şekil 4.5 Suş 125'e ait termal ölüm grafiği



Suş 125 için; 95ºC'de 8 dakikalık ısıl işlem görmesine rağmen logaritmik azalma meydana gelmemiştir.100ºC de 6 dakika süren ısıl işlem 4 logaritmik azalma sağlamıştır. 105ºC'de 3 dakika süren ısıl işlem, 5,5 logaritmik azalmaya ve 110ºC ile 115ºC'de 1 dakika süre ile yapılan ısıl işlem 6 logaritmik azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.5.).

Şekil 4.6 Suş 162A'ya ait termal ölüm grafiği



Suş 162A için; başlangıçta 5 olan hücre sayısı 1,5 logaritmik artış göstermiştir. Bu durum suş 81 de olduğu gibi suşun uyku fazından kaynaklanmaktadır. 117ºC ve 120˚C'de inaktivasyonun gerçekleşmediği görülmektedir. 122,5ºC'de ise 3 dakikada yaklaşık olarak 5 logaritmik azalma saptanmıştır. 125ºC de 2 dakikada 5 logaritmik azalma ve 130ºC'de 1 dakikada ise 5 logaritmik azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.6.).

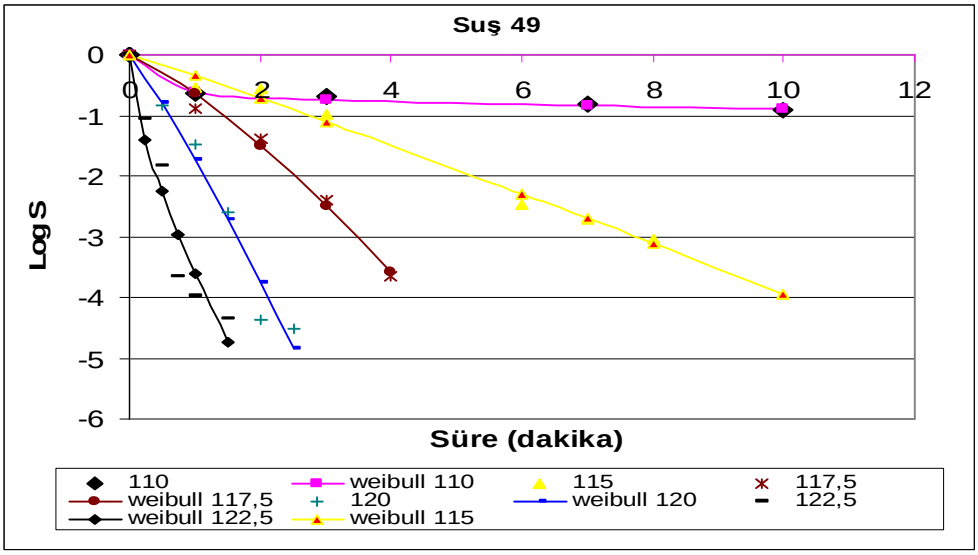
4.4. *Bacillus* İzolatlarının First Order ve Weibull Modellerine Ait İstatistiksel İndisleri

Tüm analizlerin sonuçları Weibull ve First order modeli kullanılarak inaktivasyon grafikleri çizilmiştir. Aşağıda bu modeller ile elde edilen grafikler görülmektedir.

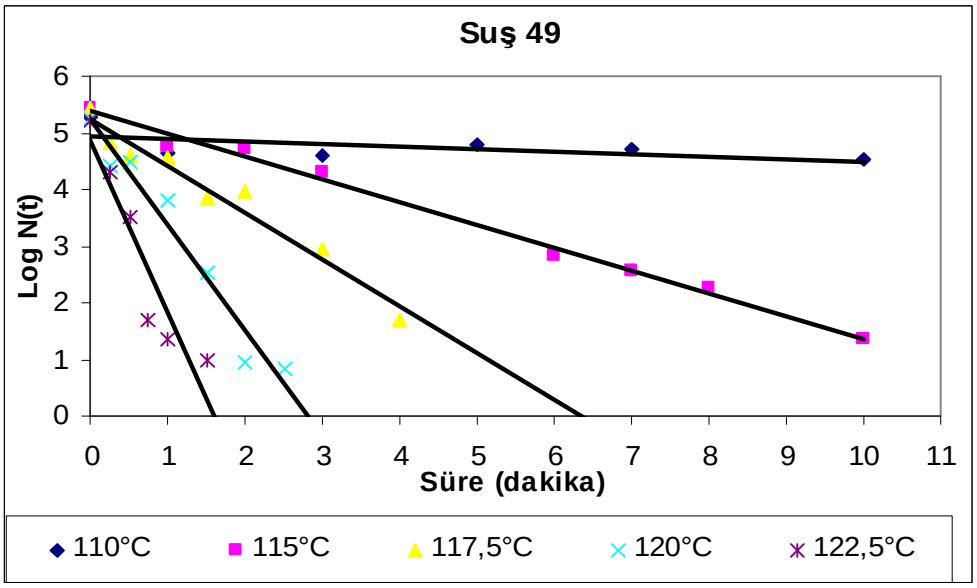
Grafiklerden elde edilen istatistiksel veriler yardımıyla D ve Z değerleri tespit edilmeye çalışılmış ve her suşun inaktivasyon sonucuna göre hangi modelleme planının

Tüm suşlara ait Weibull grafiğinde inaktivasyon eğrisi tespit edilen veriler ve bu veriler doğrultusunda hesaplanan en muhtemel grafik ile birlikte belirtilmiştir. Lineer grafikler çizen First-order modelinde ise inaktivasyon verileri ve bu verilere en yakın doğrusal grafikler ile gösterilmektedir.

Şekil 4.7. Suş 49'a ait Weibull grafiği

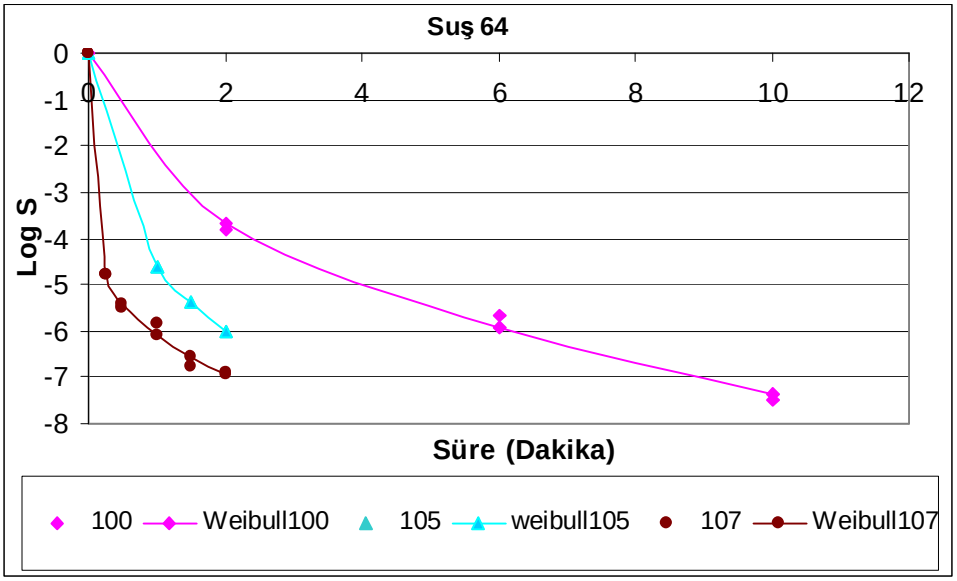


Şekil 4.8. Suş 49'a ait First Order grafiği

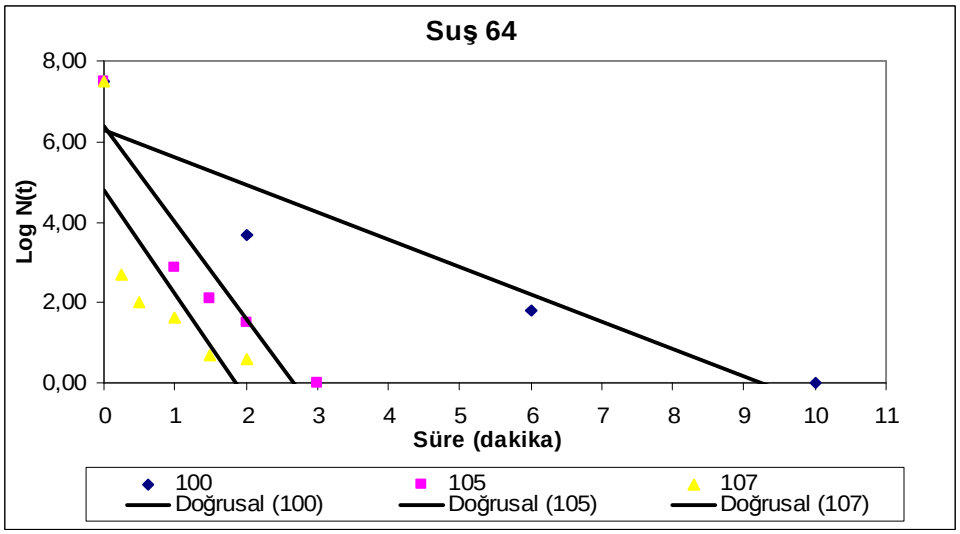


Suş 49'a ait grafiklerden anlaşılabileceği üzere inaktivasyon grafiği Weibull modellinde daha iyi fitleme yapmıştır. First-Order modelinde ise saptanan bulgulardan biraz uzak grafikler çizilebilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda suş 49 için seçilebilecek en uygun model Weibull modelidir. Ancak iki modelde tutarlı grafikler çizilmesine olanak vermiştir.

Şekil 4.9. Suş 64'e ait Weibull modeli grafiği

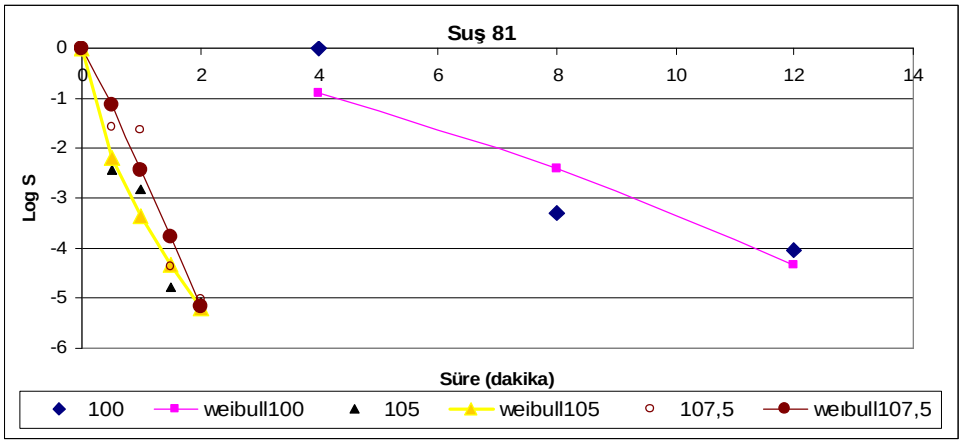


Şekil 4.10. Suş 64'e ait First Order grafiği

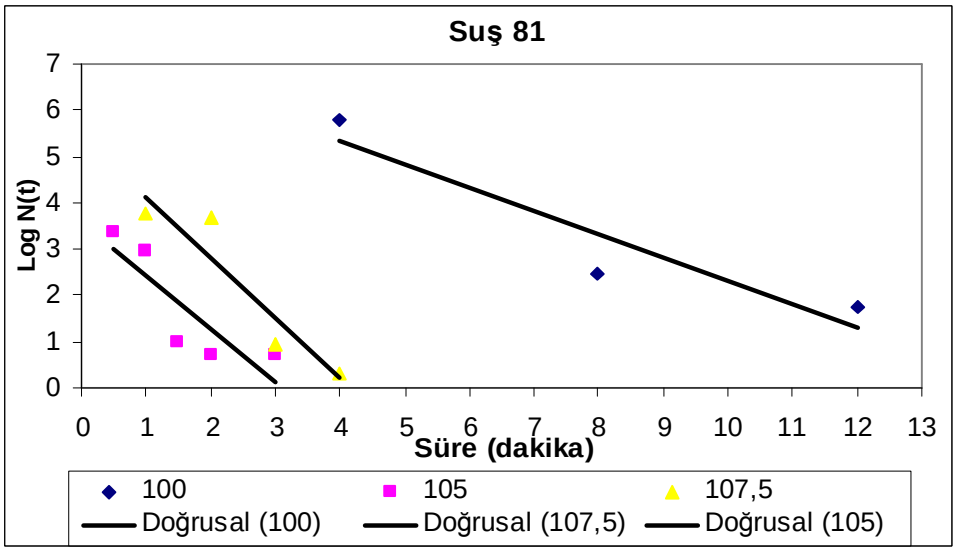


Suş 64'e ait grafiklerde Weibull modeli ile çizilen grafiklerin First order modeli ile çizilen grafiklere oranla daha etkin bir fitleme gösterdiği açıktır. Suş 64 için seçilebilecek en uygun model Weibull modelidir.

Şekil 4.11. Suş 81'e ait Weibull grafiği

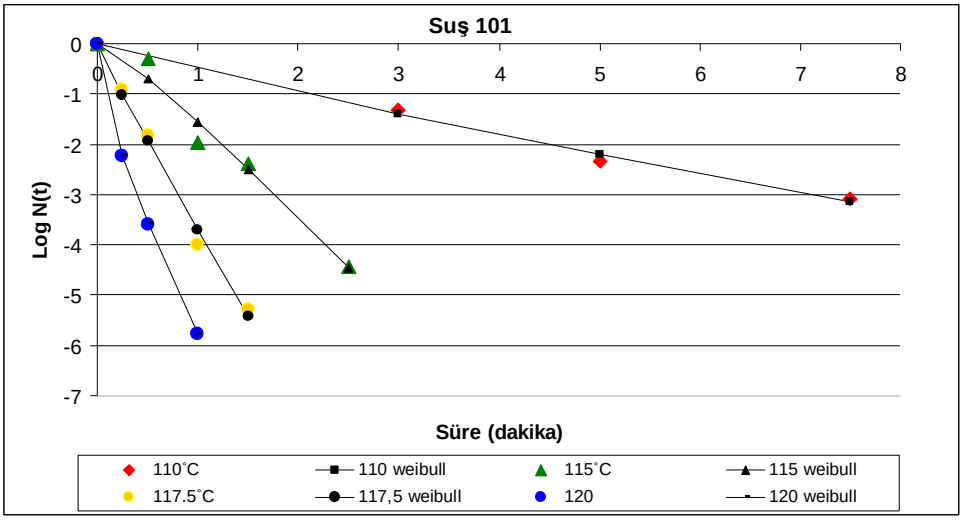


Şekil 4.12. Suş 81'e ait First Order grafiği

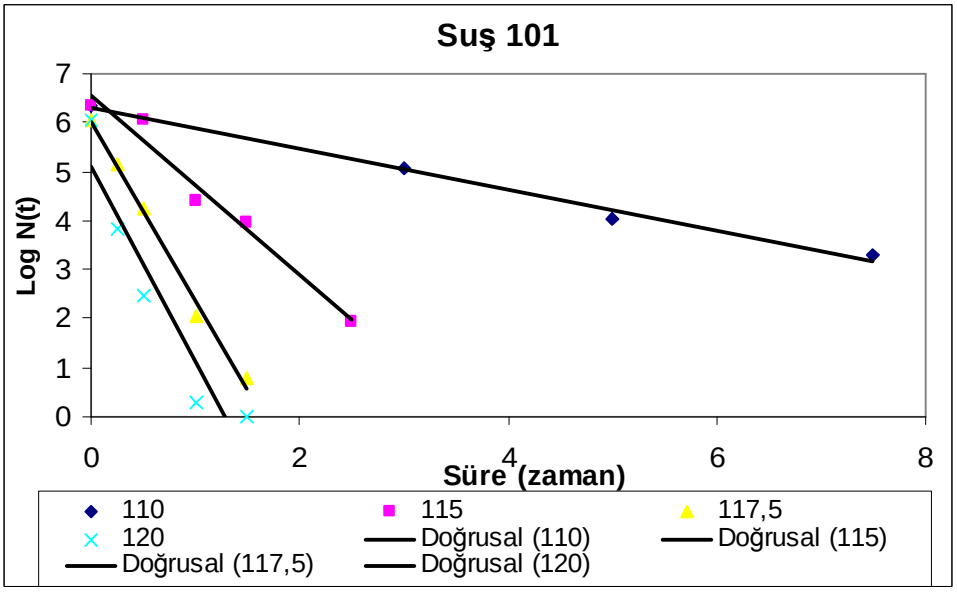


Suş 81'e ait First-order ve Weibull grafikleri oldukça benzer grafikler vermiştir. Seçilicek modelleme planı arasında ciddi bir fark olmadığı ve bu nedenle de, her iki modelin de seçilebileceği kanıtlanmıştır.

Şekil 4.13. Suş 101'e ait Weibull grafiği

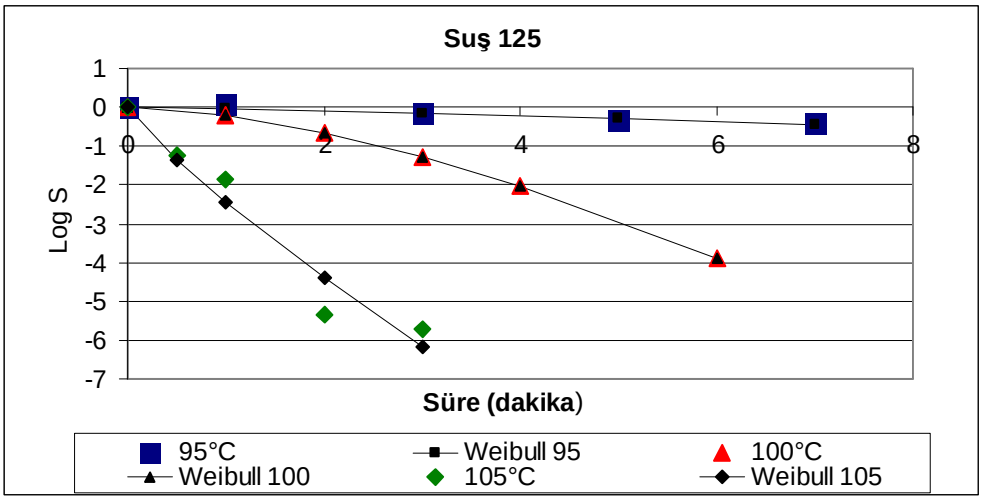


Şekil 4.14. Suş 101'e ait First Order grafiği

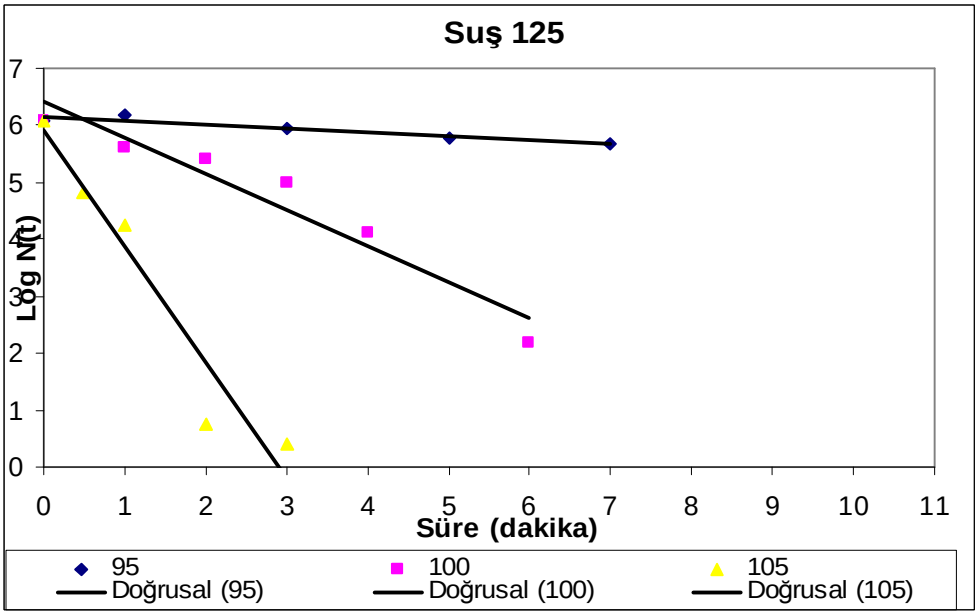


Suş101'e ait her iki modelde yine yakın sonuçlar vermiştir. Suş 81'de olduğu gibi suş 101'de de iki modelinde kullanılabileceği söz konusudur.

Şekil 4.15. Suş 125'e ait Weibull modeli

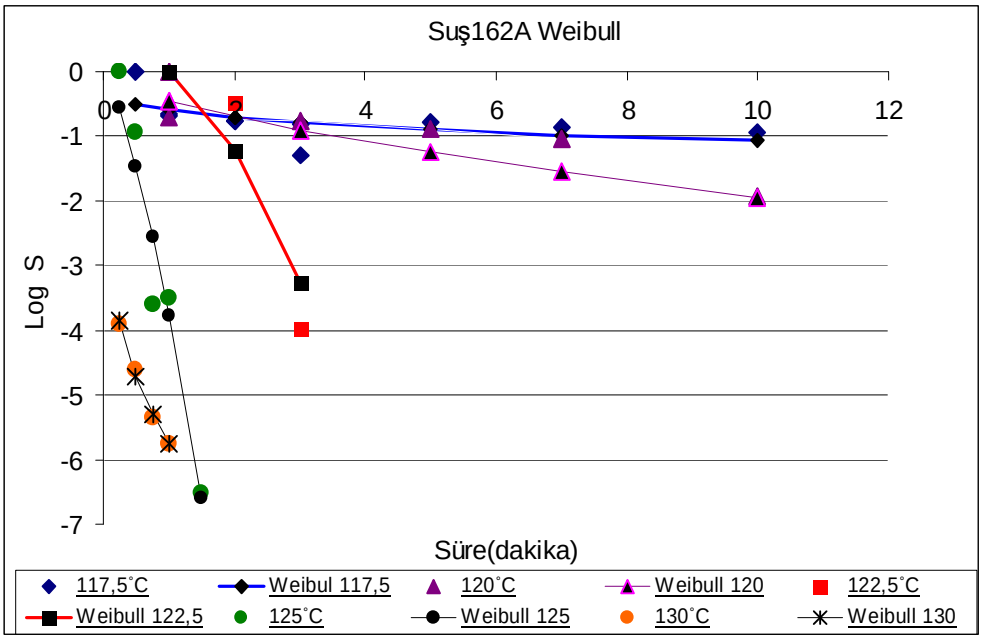


Şekil 4.16. Suş 125'e ait First Order grafiği

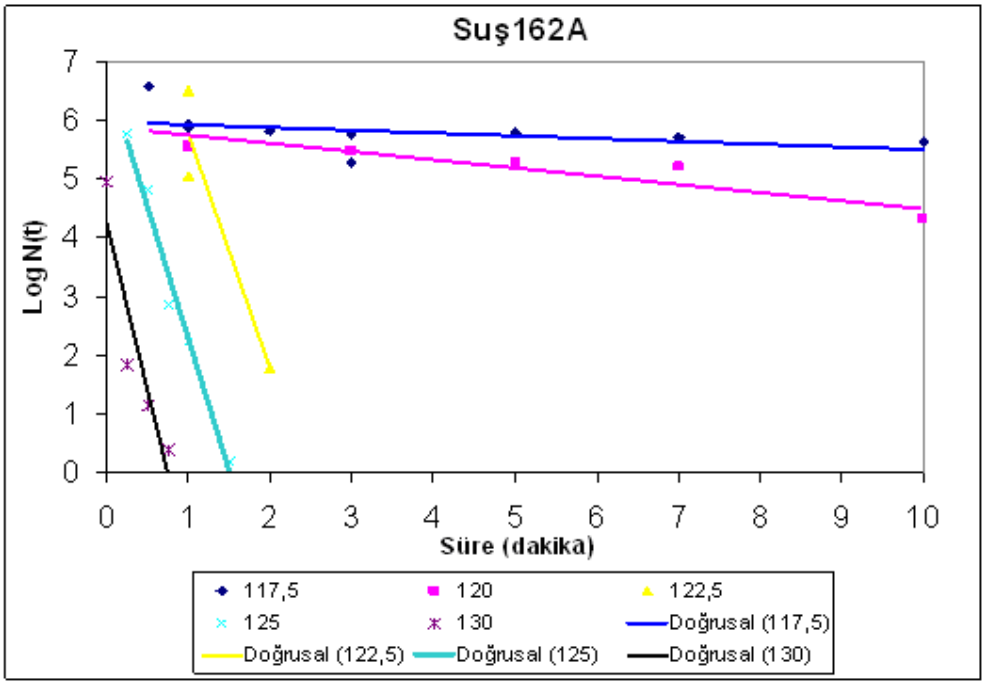


Suş 125'e ait grafiklerde Weibull modeline ait grafiğin daha uygun fitleme gerçekleştirdiği görülmektedir. Suş 125 için seçilebilecek en uygun model Weibull modeli olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.17. Suş 162A ya ait Weibull Modeli



Şekil 4.18. Suş 162A'ya ait First Order grafiği



Suş 162A'nın 117.5°C, 120°C, 122.5°C ve 125°C'de First-order modeli ile çizilen grafikleri daha uygun sonuçlar verirken, 130°C'de ise Weibull modeli ile çizilen grafiği daha uygun olduğu saptanmıştır.

4.5. *Bacillus* İzolatlarından Elde Edilen İnaktivasyon Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çizelge 4.2 ve 4.3'te First order ve Weibull modellerine ait istatistiksel indisler gösterilmektedir. Bu veriler doğrultusunda hangi yöntemin inaktivasyon kinetiğini açıklamada daha uygun olduğu belirlenmiştir.

İstatistiksel indislerin hesaplanmasında ve grafiklerin çizilmesinde kullanılan inaktivasyon sonuçları eklerde belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Analiz edilen suşlara ait ölüm kinetiğinin istatistiksel verileri

Suş Numarası	İstatistiksel indis	Lineer	Weibull	%95 Parametre p ye ait güven aralığı	
Suş 49	R^2	0,47	0,36	0,071094202	0.252194457
110°C	MSEmodel	0,08	0,11		
	Af	1,56	1,71		
Suş 49	R^2	0,99	0,72	0,891758735	1,228442243
115°C	MSEmodel	0,02	0,59		
	Af	1,27	3,24		
Suş 49	R^2	0,98	0,91	0,808539926	1,674038819
117,5°C	MSEmodel	0,06	7,12		
	Af	1,49	14,57		
Suş 49	R^2	0,97	0,95	0,630684312	1,605623503
120°C	MSEmodel	0,14	1,42		
	Af	1,78	5,71		
Suş 49	R^2	0,89	1,00	0,235575248	1,115204376
122,5°C	MSEmodel	3,45	4,81		
	Af	19,95	9,71		
Suş 64	R^2	0,89	1,00	0,262032936	0.595383737
100°C	MSEmodel	1,71	0,04		
	Af	6,92	1,32		
Suş 64	R^2	0,92	1,00	0,37121342	0.379846069
105°C	MSEmodel	0,31	6,52+E06		
	Af	2,04	1,00		
Suş 64	R^2	0,61	1,00	0,126729292	0.232670757
107,5°C	MSEmodel	3,22	0,03		
	Af	16,95	1,27		
Suş 81	R^2	0,81	0,84	-1,19200696	1,481276005
100°C	MSEmodel	1,18	1,66		
	Af	4,29	4,93		
Suş 81	R^2	0,94	0,97	0,180317188	1,067503731
105°C	MSEmodel	0,27	0,19		
	Af	2,47	1,86		
Suş 81	R^2	0,93	0,93	0,153314922	2,031601834
107,5°C	MSEmodel	0,30	0,38		
	Af	2,06	2,45		

Çizelge 4.3 Analiz edilen suşlara ait ölüm kinetiğinin istatistiksel verileri

Suş 101	R^2	0,97	0,97	0,58522081	1,700003106
100°C	MSEmodel	0,12	0,11		
	Af	1,70	1,53		
Suş 101	R^2	0,99	0,99	0,693438311	1,175681202
105°C	MSEmodel	0,05	0,04		
	Af	1,35	1,35		
Suş 101	R^2	0,97	1,00	0,679770486	0,69562826
107,5°C	MSEmodel	0,27	3,66E-05		
	Af	2,28	1,01		
Suş 125	R^2	0,91	0,91	-0,41921338	3,15499331
95°C	MSEmodel	0,01	0,01		
	Af	1,12	1,11		
Suş 125	R^2	0,94	0,99	1,280387755	1,976912949
100°C	MSEmodel	0,16	0,02		
	Af	2,05	1,22		
Suş 125	R^2	0,93	0,94	0,173208716	1,521244483
105°C	MSEmodel	0,58	0,51		
	Af	2,89	2,65		
Suş 162A	R^2	0,21	0,40	-0,04117490	0,55386091
117,5°C	MSEmodel	0,09	0,07		
	Af	1,48	1,46		
Suş 162A	R^2	0,82	0,79	-0,01140059	1,299537929
120°C	MSEmodel	0,09	0,17		
	Af	1,65	1,94		
Suş 162A	R^2	0,91	0,91	-1,60639209	2,145934209
122,5°C	MSEmodel	100,18	1,05		
	Af	5,02	3,05		
Suş 162A	R^2	0,90	0,94	0,41309019	2,327162774
125°C	MSEmodel	0,59	0,58		
	Af	2,93	3,14		
Suş 162A	R^2	1,00	0,98	Değer tespit	Değer tespit edilemedi
130°C	MSEmodel	0,00	0,02	edilemedi	
	Af	1,02	1,17		

4.6. *Bacillus* Sporlarının İnaktivasyon Kinetiği ve Sonuçların İstatistiksel Yorumu

R^2 , Ortalama Hatalar karesi (MSE_{model}) ve Doğruluk Faktörü (A_f) indislerinden alınan sonuçlara dayanarak Weibull modelinin First order modelinden daha tutarlı sonuçlar verdiğini söyleyebiliriz. Weibull modeline ait R^2 değerleri First order modelinden elde edilen R^2 değerleriyle karşılaştırılınca; Weibull modelinden elde edilen sonuçların 1'e daha yakın sonuçlar verdiğini anlaşılabilir. Bunun yanı sıra Suş49'un 110°C'de ve Suş 162A'nın 117,5°C'de ki R^2 değerleri oldukça düşük olduğu görülmektedir. İki modelinde bu sıcaklıklardaki inaktivasyonu yorumlamakta kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

%95 parametre P ye ait güven aralığına bakıldığında ise 1'i üzerinde sonuç veren her Weibull modelinin daha uygun sonuçlar verdiği ve 1'in altındaki tüm değerler için ise First Order modelinin daha uygun olduğunu söyleyebiliriz. Bu değerler incelendiğin de parametre P'nin 1'in altında olduğu tüm inaktivasyon uygulamaları düşük sıcaklıklarda gerçekleşmiştir. Yüksek sıcaklıklarda uygulanan ısıl işlemler de parametre 1'in üzerinde sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak düşük sıcaklıklar da uygulanan inaktivasyon işlemleri için First order modeli daha uygun sonuçlar verirken, yüksek sıcaklıklarda uygulanacak inaktivasyon işlemleri için ise Weibull modeli daha uygundur diyebiliriz.

4.7. *Bacillus* İzolatlarının D ve Z Değerlerinin Hesaplanması

Her iki modelden de alınan inaktivasyon sonuçları; suşların termal ölüm kinetiklerini belirlemek için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanılarak ilk logaritmik azalma (δ) ve D değerleri Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tüm suşlara ait D ve δ değerleri

Suşlar	Sıcaklık	D değeri (lineer)	δ değeri (Weibull)
Suş 49	110°C	18,42	21,20
	115°C	2,49	2,74
	117,5°C	1,13	1,44
	120°C	0,51	0,61
	122,5°C	0,32	0,15
Suş 64	100°C	1,47	0,10
	105°C	0,33	0,02
	107,5°C	0,39	4,21E-05
Suş 81	100°C	2,85	4,34
	105°C	0,43	0,14
	107,5°C	0,39	0,44
Suş 101	110°C	2,39	2,05
	115°C	0,55	0,68
	117,5°C	0,28	0,25
	120°C	0,18	0,078
Suş 125	95°C	13,74	12,47
	100°C	1,57	2,60
	105°C	0,49	0,35
Suş 162A	117,5°C	20,65	7,55
	120°C	6,27	3,52
	122,5°C	0,25	1,13
	125°C	0,24	0,38
	130°C	0,34	0,0023

Çizelge 3'te görüldüğü gibi, Suş 64'ün 107,5°C deki ve Suş 162A dışında her iki modelden de elde edilen sonuçlar birbirine oldukça yakındır.

First order ve Weibull modellerinden elde edilen D ve δ değerleri kullanılarak tüm suşlar için Z değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Çizelge 4.5'te tüm suşlara ait Z değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Tüm suşlar için Hesaplanan Z değerleri

Suşlar	Z Değeri (Lineer)	Z Değeri (Weibull)
Suş 49	8,28	6,01
Suş 64	11,78	16,53
Suş 81	8,18	6,43
Suş 101	8,71	15,37
Suş 125	6,90	5,45
Suş 162A	7,9	3,14

Çizelge 4.5'te çalışmada kullanılan First order ve Weibull modelleme yöntemleri kullanılarak elde edilen z değerleri gerek aynı türe ait iki model arasında gerekse mikroorganizma cinsine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Isıl direnci en yüksek suş olan Suş 162A'ya ait z değeleri ısıl direnci çok daha düşük olan diğer suşlara ait z değerlerinden oldukça düşük bulunmuştur.

Her bakteri suşuna ait inaktiasyon işlemleri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Suş 64'ün, 107,5˚C'de 2,5 dakika da tamamen inaktive olmasına karşın, suş 162A'nın aynı sıcaklıkta bir logaritmik azalma için 3,5 dakikalık bir süreye gereksinim duyduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, tüm suşlara aynı sıcaklık ve sürede inaktivasyon işlemi uygulanamadığı için elde edilen z değerlerinin karşılaştırılmalı yorumlanması olanaksız olmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu projede 8 farklı *Bacillus* türü ile çalışılmıştır. Çalışılan tüm suşlar mezofilik özelliktedir. İnkübasyon ve spor gelişimi için farklı sıcaklıklar denenmiştir ancak en iyi sonuçlar tüm mezofilik suşlar için 37°C'de alınmıştır. Bu türler içerisinden sadece suş 1 denenen hiçbir sıcaklıkta (10°C, 20°C, 30°C ve 42°C) spor oluşumu göstermemiştir. Suş 91 ise kontaminasyon sonucu çalışılamaz hale gelmiştir.

Sonuç alınan diğer 6 Suş kendi içlerinde iki gruba ayrılarak incelenmiştir. İlk grup ısıl direnci düşük grup olup 64, 81, 125 numaralı suşlar ve ikinci grup ise ısıl direnci yüksek grup olup 49, 101, 162A numaralı suşları kapsamaktadır.

Isıl direnci düşük grup için uygulanan en yüksek ısıl işlem derecesi, 107,5°C dir. Suş 64 dışında diğer iki suş bu sıcaklıkta canlılık göstermemiştir.

Isıl direnci yüksek grup için ise, 120°C'nin de uygulanan ısıl işlemde bile canlı koloniler tespit edilebilmiştir. Seçilen suşlar içerisinde ısıl direnci en yüksek suş 162A olarak tespit edilmiştir. Bu suşun ileride yapılacak çalışmalardan tespit edilecek daha yüksek ısıl dirence sahip bir başka suş bulunana kadar kakao tozunun ticari olarak sterilizasyonun da hedef mikroorganizma olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

Weibull ve first order modelinden anlaşılacağı gibi elde edilen inaktivasyon sonuçları oldukça yakındır. Ancak first order modelinden elde edilen sonuçların bazıları kabul edilebilir değerlerden oldukça farklılık göstermektedir. Sonuç olarak Weibull modelin first order modeline kıyas ile daha uygun olduğunu söyleyebiliriz ve istatistiksel verilerin karşılaştırılması ile de bu sonuç görülmüştür.

D ve δ değerleri ile Z değerlerinin yorumlanmasında; Weibull ve First Order modeli kıyaslandığında, Suş 64, suş 81 ve suş 125 için (düşük dirençli grup) First order modeline ve Suş 49 suş 101 ve suş162A için ise Weibull modeline daha uygun olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan çalışmada, *Bacillus* suşlarının gelişiminin inkübasyon koşullarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Besiyerinin mineral içeriğinin bakteri sporlarının ısıl direncini önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir.

Çalışılan bakteri sporlarından bazıları, germinasyon için uyku fazının kırılmasına ihtiyaç duymuştur. Suş 81 ve 162A'ya ait sporları 80 ve 95˚C'lerde 0,5 ve 1 dakika süre ile ısıl işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem ile uyku fazının kırıldığı ve sporların vejatatif forma geçişlerinde %25 lik artış gözlenmiştir.

Çalışılan mezofilik suşlarının tamamının 37˚C'de optimum aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

Suş 1'in uygulanan tüm sıcaklık koşullarına rağmen spor oluşturmadığı saptanmıştır. Oluşan stres koşulları bakterilerin spor oluşturma özelliklerini olumsuz etkileyebileceği gözlemlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen inaktivasyon sonuçları, uygun bir matematiksel modelleme planı ile yorumlanmıştır. Bu amaç için çalışmada 2 matematiksel modelleme planı kullanılmıştır. Modellerden ilki (First Order modeli) inaktivasyon işleminden alınan veriler ile çizilen doğrusal grafiklerin yorumlanmasında kullanılmıştır. Diğer modelleme planı ise, (Weibull Modeli) elde veriler ile çizilen parabolik grafiklerin yorumlanmasında kullanılmıştır. İnaktivasyon sonuçlarından elde edilen veriler ile çizilen grafiklere dayanarak kullanılan modellerden hangisinin verileri daha uygun birleştirdiği tespit edilmiştir. Seçilen modelden alınan sonuçlar o mikroorganizmaya ait D ve Z değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır

Elde edilen sonuçlara göre; 130°C'de 1 dakika süre ile yapılan sterilizasyon işlemi kakao tozundaki bakterileri inaktive etmeye yeterli olacaktır. Ancak çalışmamın tamamen laboratuar ortamında ve gerçekleştirilmesi ve kullanılan besiyeri ortamının kakao içeren ürünlerden farklı olması analiz sonuçlarının kısıtlı koşullar altında gerçekleşmesini sağlamıştır.

İleride yapılabilecek çalışmalarda besiyeri ortamı olarak kakaolu ürünlerin kullanılması ve daha çok mikroorganizma ile çalışılması kakao ve kakaolu ürünlerin kalitesini geliştirmek adına daha olumlu sonuçlar verecektir.

Bu çalışma kısıtlı laboratuar koşulları ve sürede gerçekleştirilmiştir. Çalışma termofilik ve psikrofilik özellikteki bakteriler de kullanılarak tekrarlanırsa kakao tozunun mikrobiyolojisi ve gıda güvenilirliği açısından daha detaylı bilgiye ulaşılmasına yardımcı olabilecektir.

KAYNAKLAR

ANONYMOUS, 2009a. Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği (TOBB) Sanayi Veritabanı. http://sanayi.tobb.org.tr/sektor_harita3.php?kod=31190201

ANONYMOUS , 2005a : Todar online textbook of bacteriology. (SCIENCE Magazine- June 4, 2004 - Vol 304: p. 1421).

ANONYMOUS, 2005 a: Todar's Online Textbook of Bacteriology 2005

ANONYMOUS, 2005b : Merck besiyeri hazırlama kılavuzu

AYHAN, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43- 44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.

BECKETT S.T., Industrial chocolate manufacture and use. Second edition. Blackie Academic & Professional, 1994

BESTEN, H.M.W., MATARAGAS, M., MOEZELAAR, R., ABEE, T., ve ZWIETERING, M.H. , 2006. Quantification of the effects of salt stress and physioKOBical state on thermotolerance of *Bacillus* cereus ATCC 10987 and ATCC 14579. Applied and Environmental Microbiology 72, 5884-5894.

BIOMERIEUX, 2003. Identifikasyonda referans API . BioMerieux Diagnostik A.Ş. İstanbul.

BOEKEL, M.A.J.S. van, 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food MicrobioKOBy 74, 139-159.

CAMPANELLA, O.H. and Peleg, M., Theoretical comparison of a new and the traditional method to calculate *Clostridium botulinum* survival during thermal inactivation, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 1069, 2001.

CAZEMIER A.E., S.F.M. WAGENAARS , P.F. TER STEEG, 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage *Bacilli* Microbiology & Preservation, Unilever Research Vlaardingen, Vlaardingen, The Netherlands

CONDON , S., M. Bayante and F. J. Sala. 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of Bacillus subtilis. J. Appl. Bacteriol. 73:251–256.

DROUDEN, M., Fabry, I. and Gopel, G., 1996. Technology for Sweet: Chocolate (Vol I, pp 27–29)

ERRINGTON Jeff *Nature Reviews Microbiology* **1**, 117-126 (November 2003)

FULLER, J. E., W. S. Mueller, and R. W. Swanson. 1942. Bacteriological study of chocolate milk. J. Dairy Sci. 25:883-894.

FOSCHINO, R., GALLI, A., OTTOGALLI, G., 1990. Research on the Microflora of UHT milk. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 40, 47Ð59.

GABIS, D .A., SILLIKERJ,. H., 1974. ICMSF methods studies 11. Comparison of analytical schemes for detection of *Salmonella* in high moisture foods. *Canadian Journal of Microbiology* 20, 663-668.

GABIS, D. A, LANGLOIS, B. E., RUDNICK , A. W., 1970 Microbiological Examination of Cocoa Powder.Applied Microbiology, OCt, p. 644-645

GRANUM, P. E. 2001. *Bacillus cereus*, p. 373–381. *In* M. P. Doyle (ed.),Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, D.C.

HERSOM, A.C. and Hulland, E.D., Principles of thermal processing, in *Canned Foods. Thermal Processing and Microbiology*, Hersom, A.C. and Hulland, E.D., Eds., Churchill Livingstone, New York, 1980, pp. 177–207.

HUEMER A.I., KLIJN, N., VOGELSANG, H.W.J., LANGEVELD, P.M., 1998. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk *International Dairy Journal* 8, 851-855.

HAYNAK, S. T., S. Polansky, and R. Stone. 1941. Microbiological studies of cocoa fermentation.Food Res. 6:471-479.

JENSEN,I., 1998 I. Jenson In: J.B. Wood, Editor, *Bread and baker's yeast. Microbiology of fermented foods*, Blackie Academic & Professional, London, England , s. 172–198.

KALAYLI, E. ve Beyatlı, Y. 2003. Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 01(12), 24-35.

KOOIMAN, W.J., 1973. The screw cap tube technique: A New and Accurate technique for the determination of the wet heat resistance of bacterial spores. In Spore Research ed. Barker, A.N., Gould, G.W. and Wolf, J. pp. 87±92. London: Academic Press.

KRAMER, J. M.; GILBERT. R. J., 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, p. 22–70. *In* M. P. Doyle (ed.), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York.

LOPES, A.S. and Dimick, P.S. 1995. Cocoa fermentation. In Biotechnology: A comprehensive treatise, vol. 9, pp. 563–577. Reed, G. and Nagodawithana, T.W., Eds. (2nd ed.), Enzymes, Food and Feed. Weinheim: VCH.

MAFART, P., COUVERT, O., GAILLARD, S. AND LEGUERINEL, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. International Journal of Food MicrobioKOBy 72, 107-113

ÖZDEMİR, H. 2003. Pastörize Sütlerde Bacillus cereus 'un Varlığı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları : 611-615. Ankara

PALOP, A., MANA AS, P. , CONDO AN, S., 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. Journal of Food Safety 19, 57±72.

PERIAGO, P.M., FERNANDEZ, P.S., OCIO, M.J., ve MARTINEZ, A., 1998. Apparent thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered under anaerobic conditions. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 206, 63-67.

PETTERSSON, B., LEMBKE, F., HAMMER, P., STACKENBRANDT, E., PRIEST, F.G., 1996.*Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(3), 759-764.

PEDERSEN, P. B., BJØRNVAD, M. E., RASMUSSEN, M. D., PETERSEN, J. N., 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. Regul. Toxicol. Pharmacol. 36:155–161.

PICHHARD, K. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. 176-178. Literatür Yayınları. Manisa

SANG-WOOK, L., SIM, S.J., 2006. Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat shocked during sporulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(4), 633-636.

SCHWAN, R.F .,WHEALS, A.E., 2004. The microbioKOBy of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical reviews in food science and nutrition 44, 205-221.

SCHELDEMAN, P., PIL, A., HERMAN, L., VOS DE, P., HEYNDRICKX, M., 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3), 1480-1494

SETLOW, P. 1999. Bacterial spore resistance, p. 217–230. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. American Society for Microbiology,Washington, D.C.

SVENSSO, B., Eneroth, A., Brendehaug, J., Molix, G. and Christiansson, A. 2000. Involvement of a Pasteurizer in the Contamination of Milk by Bacillus cereus in a Commercial Dairy Plant. Journal of Dairy Research. 455

SIMMONDS, P., B. L. MOSSEL, T. INTARAPHAN, H. C. DEETH., 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. J Food Prot 66:2070-2075.

STRINGER, S.C., George, S.M., and Peck, M.W., Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 79S, 2000

Te GIFFEL, M.C., Wagendorp, A., Herrewegh, A., & Driehuis, F., 2002. Bacterial Spores in Silage and Raw Milk. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 625-630.

TUNAİL, N. 2000. Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, 102. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara

TURNBULL PCB (1996). Bacillus. In: Barron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.

TÜRK GIDA KODEKSİ (TGK), 2000. Kakao ve Kakao Ürünleri Tebliği.R.Gazete : 27.03.2000-24002 ,Tebliğ No : 2000/10 .

ÜNLÜTÜRK, A.; KARAPINAR, M.,;TURANTAŞ, F.,1998. Gıdalarda Önemli Mikroorganizmalar. Kitap: ÜNLÜTÜRK, A.; TURANTAŞ, F., Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, Çınarlı-İzmir, s.11-45.

WAYNE L. Nicholson, Nobuo Munakata, Gerda Horneck, Henry J. Melosh, ve Peter Setlow Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS Sept. 2000, p. 548–572.

ÖZGEÇMİŞ

1983 Yılında Trabzon'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin/ Tarsus'da tamamladım. 2002 Yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandım ve 2006 yılında bu bölümden mezun oldum. 2006 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.2007-2008 Öğrenim döneminde Socrates Erasmus değişim öğrencisi olarak Hollanda Wageningen Üniversitesinde 7 ay tez konum ile ilgili çalışmada bulundum. Halen Romanya'da yaş meyve-sebze işleyen bir gıda firmasında gıda mühendisi olarak 4 aydır çalışmaktayım.

Çizelge 5.1 Suş 49'a ait inaktivasyon sonuçları

Suş 49 Tüm analiz sonuçları										
Sıcaklık	**110˚C**		**115˚C**		**117,5˚C**		**120˚C**		**122,5˚C**	
Zaman(dak.)	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**
0	1,96E+05	5,29	1,96E+05	5,29	1,96E+05	5,29	1,96E+05	5,29		
0			2,33E+05	5,37	2,33E+05	5,37	2,33E+05	5,37	2,33E+05	5,37
0					7,75E+04	4,89	7,75E+04	4,89	7,75E+04	4,89
0,25					6,55E+04	4,82	2,68E+04	4,43	1,92E+04	4,28
0,5					4,18E+04	4,62	3,01E+04	4,48	3,15E+03	3,50
0,75									4,80E+01	1,68
1	4,50E+04	4,65	5,50E+04	4,74	2,45E+04	4,39	8,08E+03	3,91		
1			6,93E+04	4,84	4,90E+04	4,69	5,60E+03	3,75	4,38E+01	1,64
1									1,50E+01	1,18
1,5					6,80E+03	3,83	1,35E+02	2,13		
1,5							1,49E+03	3,17		
1,5							2,25E+02	2,35		
2			5,78E+04	4,76	9,35E+03	3,97				
2,5										
3	4,00E+04	4,60	2,01E+04	4,30	1,01E+03	3,00	0,00E+00	0,00		
4										
5	6,05E+04	4,78			0,00E+00	0,00				
6			1,64E+03	3,21						
7	5,00E+04	4,70	3,74E+02	2,57						
8			2,08E+02	2,32						
10	3,37E+04	4,53	2,25E+01	1,35						

Çizelge 5.2 Suş 64'e ait inaktivasyon sonuçları

Suş 64 Tüm analiz sonuçları										
Sıcaklık	100˚C		105˚C		107,5˚C		110°C		115°C	
Zaman(dak.)	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**
0	**3,07E+07**	7,49	**3,07E+07**	7,49	**3,07E+07**	7,49	**3,07E+07**	7,49	**3,07E+07**	7,49
0,25					**5,20E+02**	2,72				
0,5					**9,98E+01**	2,00				
1			**7,15E+02**	2,85	**4,40E+01**	1,64	**9,00E+00**	0,95	**6,50E+00**	0,81
1,5			**1,25E+02**	2,10	**5,00E+00**	0,70				
2	**4,75E+03**	3,68	**3,00E+01**	1,48	**4,00E+00**	0,60	**0**		**0**	
3			**0,00E+00**	0,00					**0**	
4							**0**			
5							**0**			
6	**6,50E+01**	1,81								
10	**1,00E+00**	0,00								

Çizelge 5. 3. Suş 81'e ait inaktivasyon sonuçları

Suş 81 Tüm analiz sonuçları										
Sıcaklık	100˚C		105˚C		107,5˚C		110°C		115°C	
Süre (dakika)	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**
0'	**2,05E+05**	5,31	**2,05E+05**	5,31	**2,05E+05**	5,31	**2,05E+05**	5,31	**2,05E+05**	5,31
0,25'					**5,60E+03**	3,75				
0,5'			**2,23E+03**	3,35	**4,65E+03**	3,67				
1'			**9,15E+02**	2,96	**9,00E+00**	0,95	**0**	0,00	**0**	0,00
1,5'			**1,00E+01**	1,00	**2,00E+00**	0,30				
2'			**5,00E+00**	0,70	**1,00E+00**	0,00				
3'			**5,00E+00**	0,70						
4'	**5,99E+05**	5,78								
8'	**3,00E+02**	2,48								
12'	**5,50E+01**	1,74								

Çizelge 5. 4. Suş 101'e ait inaktivasyon sonuçları

Suş 101 Tüm analiz sonuçları								
Sıcaklık	110˚C		115˚C		117.5˚C		120˚C	
Süre (dakika)	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**
0	**6,35**	**2,26E+06**	**6,35**	**2,26E+06**	**6,06**	**1,15E+06**	**6,06**	**1,15E+06**
0,25					**5,15**	**1,41E+05**	**3,85**	**7,00E+03**
0,5			**6,05**	**1,12E+06**	**4,23**	**1,71E+04**	**2,48**	**3,00E+02**
0,75								
1			**4,39**	**2,44E+04**	**2,06**	**1,15E+02**	**0,3**	**2,00E+00**
1,5			**3,96**	**9,15E+03**	**0,78**	**6,00E+00**	**0**	**0**
2,5			**1,92**	**8,38E+01**				
3	**5,05**	**1,12E+05**						
5	**4,03**	**1,08E+04**						
7,5	**3,28**	**1,89E+03**						

Çizelge 5. 5. Suş 125'e ait inaktivasyon sonuçları

Suş 125 Tüm analiz sonuçları										
Sıcaklık	**95°C**		**100°C**		**105°C**		**110°C**		**115°C**	
Süre (dakika)	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**
0	1,26E+06	**6,09**	1,26E+06	**6,09**	1,26E+06	**6,09**	1,26E+06	**6,09**	1,26E+06	**6,09**
0,5					6,95E+04	**4,84**				
1	1,56E+06	**6,19**	4,16E+05	**5,62**	1,77E+04	**4,25**	0	**0,00**	0	**0,00**
2			2,47E+05	**5,39**	5,50E+00	**0,74**				
3	8,60E+05	**5,93**	9,70E+04	**4,99**	2,50E+00	**0,40**				
4			1,25E+04	**4,10**						
5	5,80E+05	**5,76**								
6			1,46E+02	**2,17**						
7	4,75E+05	**5,68**								

Çizelge 5. 6. Suş 162'a ait inaktivasyon sonuçları

Suş 162A tüm analiz sonuçları										
Sıcaklık	**117,5˚C**		**120˚C**		**122,5˚C**		**125˚C**		**130˚C**	
Süre (dakika)	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**	**Ortalama**	**Log KOB/ml**
0	4,94		4,94		4,94		4,94		4,94	
0,25							5,76	5,75E+05	1,85	**7,10E+01**
0,5	6,57	**3,75E+06**					4,82	**6,60E+04**	1,16	1,40E+01
0,75							2,17	1,48E+02	0,40	2,50E+00
1	5,91	**8,12E+05**	6,25	**1,77E+06**	6,49	**3,09E+06**	2,25	1,78E+02	0,00	0,00E+00
1	5,88	**7,58E+05**	5,55	3,54E+05	5,04	**1,09E+05**				
1,5							0,18	1,76E-01		
2	5,81	**6,45E+05**			1,78	**6,00E+01**	0,00	**0,00E+00**		
2	5,81	**6,45E+05**								
3	5,28	**1,90E+05**	5,48	**3,02E+05**	0,00	**0,00E+00**				
3	5,77	**5,88E+05**								
5	5,78	**6,02E+05**	5,30	**2,29E+05**						
7	5,70	**5,01E+05**	5,20	**1,58E+05**						
10	5,63	**4,26E+05**	4,31	**2,04E+04**						

EKLER

Ek 1 -Donmuş Kültür Hazırlama Kılavuzu

300 µl % 80 lik gliserol çözeltisi alınarak 1 ml lik Nunc marka plastik tüpler içerisine ilave edilerek 121ºC de 15 dakika süre de sterilize edilmiştir.
700 µl kültür aseptik ortamda tüp çerisine ilave edilmiştir. Bu işlem her bakteri suşu için 10 ar adet hazırlanmış ve -80 ºC de muhafaza edilmiştir.

Ek 2-Nutrient Broth Hazırlama Kılavuzu

8 gram Nutrient borth (NB, CM1 Oxoid) alınarak 1 litre saf su içerisinde çözündürülmüştür.

Elde edilen çözelti ısıtılarak tüm içeriğin homojen olarak karışması sağlamıştır. Çözelti daha sonra kullanılmak üzere kapaklı şişelere ilave edilmiş ve 121ºC de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Ek 3-Fosfat Tampon Çözeltisi Kılavuzu

Çalışmada tampon çözelti olarak 0,01 molar fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

1 molar K_2HPO_4 çözeltisi ile 1 molar KH_2PO_4 çözeltisi 7 pH da bir çözelti elde edebilmek için aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir.

Çalışılan türler içerisinde Suş 49 Ekzospor içerdiği için tampon çözelti %0,1 lik tween çözeltisi ile birlikte kullanılmıştır. Tween çözeltisi ekzosporların dışında bulunan membran tabakasının yapışkan özelliğini ortadan kaldırarak sporların tek tek koloni oluşturmasını sağlamıştır.

Çizelge 5.7 0,1 M Potasyum fosfat çözeltisi birleşim oranları

pH	1 M K_2HPO_4 (mL)	1 M KH_2PO_4 (mL)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

(Anon, 2005a)

1M K_2HPO_4'den 61,5 ml 1M KH_2PO_4'den 38,5 ml

↓

100 ml 1 molar çözelti eldesi

↓

900 ml saf su ilavesi

↓

1L 0,1 M fosfat çözeltisi eldesi

↓

250 ml çözelti ilavesi (0,1 M)

↓

2250 ml saf su ilavesi

↓

Toplam hacim 2500 ml ve 0,01 M çözelti eldesi

Elde edilen 1 molarlık fosfat tampon çözeltisi saf su ile 0,1 M'a seyreltilmiştir.0,1 molarlık çözelti 10 ml lik deney tüpleri içerisine 9 ml hacminde ilave edilerek tüp ağızları tıkaçlar ile kapatılıp şekilde 121ºC de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Ek 4 -Mineral Çözeltisi Hazırlama Kılavuzu

Bu çözelti besiyeri içeriğinin mineral konsantrasyonunu mümkün olduğunca kakao tozuna yakın mineral değerlerine getirmek için yapılmaktadır (Cazemier et al. 2001).

Hazırlanan stok çözelti nutrient agar besiyerine aşağıdaki oranlarda ilave edilmiştir. Magnezyum ve KCl çözeltileri ısıya duyarlı olmadıkları için sıvı haldeki nutrient agar besiyeri ile karıştırılmış, 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Diğer mineral çözeltileri ısıl dayanımları düşük olduğu için sterilize edilmiş ve sıvı nutrient agar besiyerine mikro filtreden geçirilerek yukarıda belirtilen çözeltiye ilave edilmiştir.

Çizelge 5.8 Mineral çözeltisi bileşim oranları

Son konsantrasyon			100* Stok	50*	20*	10*
	mg/L	mM	g/L	g/L	g/L	g/L
$MgSO_4.7H_2O$	510	2.06913	51	25.5	10.2	5.1
KCl	970	13.00966	97	48.5	19.4	9.7
$CaCL_2.2H_2O$	200	1.36036	20	10	4	2
$MnSO_4.H_2O$	3	0.01775	0.3	0.15	0.06	0.03
$FeSO_4.7H_2O$	0.55	0.00198	0.055	0.0275	0.011	0.0055

Ek5. Spor Oluşum Besiyeri Hazırlama

Mg ve K tartılır ve balon jojeye aktarılmıştır. Nutrient broth ve bakteriyel agar gerekli oranlarda tartılarak balon jojeye ilave edilerek, balon jojenin hacmi 990 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Son olarak pipet ile 7 ml saf su daha eklenmiş ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilerek, 55°C'deki su banyosunda sıvı olarak muhafaza edilmiştir.

Çizelge 5.9 Spor oluşum besiyeri hazırlama kılavuzu

	1 L	**0.5 L**
Nutrient Broth	13 g	6.5 g
Agar	15 g	7.5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.510 g	0.255 g
KCl	0.970 g	0.485 g

Isıya karşı hassas diğer bileşenler ise mikro-filtreden geçirilerek sterilize edilerek ve çizelge 5.11 deki oranlarda su banyosunda bekletilen diğer besiyerine ilave edilmiştir.

Çizelge 5.10 Isı dayanımı düşük mineral çözeltisi

	1 L:	**0.5 L:**
1M $CaCL_2.2H_2O$	1.360 ml	680 µL
10 mM $MnCL_2.4H_20$	1.78 ml	890 µL
1 mM $FeSO_4.7H_2O$	1.98 ml	990 µL

- 1M $CaCL_2.2H_2O$: 14.702 g bileşik tartılmış ve 100 ml saf su ilave edilerek karıştırıcıda karıştırılarak, homojen hale getirilmiş ve ultra-filitrasyon ile sterilize edilmiştir.
- 10 mM $MnCL_2.4H_20$ 169.02 mg bileşik alınmış ve 100 ml saf su ilave edilerek karıştırıcıda karıştırılıp homojen hale getirilerek, ultra-filitrasyon ile sterilize edilmiştir.
- 1 mM $FeSO_4.7H_2O$ 27.802 mg bileşik alınır ve 100 mL saf su ilave edilerek karıştırıcıda karıştırılıp homojen hale getirilerek, ultra-filitrasyon ile sterilize edilmiştir (Setlow, 1990).

Ek-6 Seyreltme Çözeltisi

Pepton(ne)	1g/L
NaCl (soch)	8.5g/L

Gerekli oranlarda alınan NaCl ve pepton karıştırılarak üzereleri saf su ile 1 litreye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.