



MEYVE SUYU SEKTÖRÜNDEKİ ÖNEMLİ BİR SORUN OLAN ; *Alicyclobacillus acidoterrestris* ve VARLIĞININ TESPİTİ

Gönül AKYILDIZ¹

ÖZET

Meyve suları ve konsantreleri yüksek asitlikleri nedeniyle sadece pastörizasyon işlemi ile dayanıklı hale getirilmektedir. Ancak son yıllarda, ticari pastörizasyon uygulamalarına rağmen bozulan meyve sularında ve konsantrelerinde; termoasidofilik, patojen olmayan ve sporlu bir bakteri olan *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in varlığı saptanmıştır. *Alicyclobacillus acidoterrestris* sporları yapılan pastörizasyon işleminden zarar görmemekte ve daha sonra gelişerek meyve sularında bozulmaya neden olmaktadır. Bu bozulma, üründe kötü koku ve bulanıklık şeklinde tanımlanmakta olup; ürünün kalitesini bozmakta ve ürünün tüketiminde sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in analizinde IFU Method No:12 (Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices) standardı kullanılmaktadır. Metodun prensibi; Sporlu, termofilik ve asidofilik olan bu bakterinin, asitli ortam sağlayan selektif besiyerinde ve yüksek sıcaklıkta inkübasyonu, inkübasyon sonucu üreme gözlenen muhtemel kolonilerin doğrulanması esasına dayanır.

Anahtar Kelimeler: Meyve suyu, bulanıklık, *Alicyclobacillus acidoterrestris*

AN IMPORTANT PROBLEM OF THE FRUIT JUICE INDUSTRY, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and ITS DETECTION

ABSTRACT

Fruit juice and concentrate, which have high acidity, are made stabilized by the only pasteurization process. Recent years; however application of commercial pasteurization process, it is determined thermoasidofil, non-pathogen and spore forming bacteria in the fruit juice and concentrate. The spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* are not damaged in pasteurization process and cause deformation in juice. This deformation, which is identified as bad odor and turbidity, is damaged the quality of the product and appear in front of us with the problem of consumption of the product. IFU Method Number :12 standard is used for *Alicyclobacillus acidoterrestris* analysis (On the Detection Method of producing *Alicyclobacillus* taint of Fruit Juices). The principle of the method is based on verification of the observed colonies which their growth in the acidic environment and selective medium during high temperature incubation.

Keywords: Fruit Juice, turbidity, *Alicyclobacillus acidoterrestris*

1.GİRİŞ

Meyve sularındaki mikrobiyolojik bozulmalar genellikle mayalar, küfler, laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinden kaynaklanmaktadır. Yüksek asitliğe (pH 3.0-4.0) sahip bu ürünler pastörize edilerek mikrobiyolojik bozulmalara karşı korunurlar. Pastörizasyon işlemi ile özellikle ısıya duyarlı vejetatif mikroorganizmalar inaktif olmakta, bakteri sporları canlı kalabilmektedir. Bununla birlikte, bozulmalara yol açabilen pekçok bakteri sporu meyve suyunun pH değerinde gelişmemektedir. Ancak *Bacillus coagulans* ve *Clostridium pasteurianum* gibi bazı sporlu bakteriler pH 3.8'e kadar gelişebilmekte ve meyve sularında bozulmalara neden olabilmektedirler(Acar ve Temiz, 2000).Ancak son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, meyve sularında *bacillus* ve *clostridium* türleri dışında, termoasidofilik karakterde bazı sporlu bakterilerin de bozulmalara sebep olduğunu göstermiştir(Doğan,2000;Komitopoulou ve ark.,1999;Yamazaki ve ark.,1996).

İlk kez 1984 yılında Almanya'da aseptik olarak ambalajlanmış elma sularında meydana gelen bozulmanın pastörizasyon sıcaklıklarında da canlı kalabilen,asidik ortamlarda gelişebilen sporlu bir bakteri türünden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bozulma antiseptik kokusuna benzer, hoş gitmeyen bir koku ve bulanıklıkla ile kendini göstermiştir. Bu etkinin ana sebebi guaiacol ve 2.6-dibromophenol olup ürün kalitesini olumsuz etkilemiştir (Chang and Kang, 2004, Durak et al., 2010, Goto et al., 2002 and Matsubara et al., 2002). 1984 yılında *A. acidoterrestis*'in elma suyunu bozduğu ilk olaydan bu yana bu bakteri elma suyu, greyluft suyu portakal, mango, armut, kivi, çarkifelek meyvesi gibi çok farklı meyve sularından izole edilmiştir. (Durak ve ark.2010, Oteiza ve ark.2011, Wang ve ark.2014 and Zhang ve ark. 2013). Bu tarihten 1994'e kadar geçen sürede sonradan *Alicyclobacillus acidoterrestis* olarak adlandırılacak olan bu mikroorganizmadan kaynaklanan bir bozulma rapor edilmemiştir.

Dünyanın *Alicyclobacillus* ile ciddi anlamda tanışması ise Avrupa'da çok sıcak geçen 1994-1995 yaz aylarında meyve sularında meydana gelen çok sayıda bozulma ve ciddi ekonomik kayıplar ile olmuştur. Örneğin; Ulusal Gıda Üretimi Derneği(National Food Processors Association) tarafından 1998 yılında 57 şirket üzerinde yapılan ankette cevap veren 34 şirketten 12 tanesinde (%35). *A. acidoterrestis* kaynaklı bozulmalarla karşılaşıldığı bildirilmiştir (Walls and Chuyate, 2000). Bu tarihten sonra ise termoasidofilik sporlu ve patojen olmayan bu bakteri ile ilgili araştırmalar artmış ve *Alicyclobacillus* ile bağlantılı bulaşma; meyve suları ,meyve suları karışımları meyve suyu konsantrasyonları ve karbonantlı meyve suları gibi birçok içeceklerde rapor edilmiştir(Smit ve ark.,2011).

2. *Alicyclobacillus* spp. TARİHÇESİ

Termoasidofilik ve spor oluşturan bu bakteriler ilk defa 1967 yılında Japonya'da sıcak su kaynaklarından izole edilmişlerdir.Ortam pH'sı 2.3-5.0 ve ortam sıcaklığı 45-70 °C aralığında gelişebilen bu bakteriler başlangıçta *Bacillus coagulans* olarak adlandırılmışlardır.1971 yılında benzer özelliklere sahip bir bakteri ABD'de termal ortamlardan izole edilmiş ve aynı yıl içerisinde bu bakterilerin hücre duvarları içerisinde sikloheksan yağ asitlerinin bulunduğu tesbit edilmiştir.Gelişmesi için gerekli pH aralığı 2.0-6.0 ve sıcaklık aralığı 45-70 °C olarak rapor edilen bu bakterinin DNA dizilimi incelendiğinde *Bacillus coagulans* olarak sınıflandırılmayacağı belirtilmiş ,*bacillus* cinsi içerisinde yeni bir tür olarak kabul edilerek *Bacillus acidocalderius* şeklinde adlandırılmıştır(Palop ve ark.2000).1981 yılında yani aradan 10 yıl geçtikten sonra *Bacillus acidocalderius*'a benzeyen bu bakteri bu kez topraktan ve bozulmuş pastörize elma suyundan izole edilmiştir.Bu bakterinin optimum gelişme sıcaklıklarının *B.caldarius*'a göre daha düşük olduğu ve DNA dizilimindeki farklılıklar saptanarak *Bacillus acidoterrestis* olarak isimlendirilmiştir.Sonraki yıllarda 16S rRNA dizi analizlerine göre yapılan araştırmalarda bu üç bakteri türünün *Bacillus* cinsinden farklı bir cinse ait oldukları gösterilmiş ve *Alicyclobacillus* cinsi oluşmuştur(Doğan,2000;Komitopoulou ve ark.1999).Bu üç türden *Alicyclobacillus acidocalderius* 60 °C'de, *A.acidoterrestis* 50 °C'de ve *A.cycloheptanicus* 40°C'de gelişebilmektedir. Bu mikroorganizmalardan *A. acidoterrestis* başta elma ve portakal sularında olmak üzere tat ve koku bozukluğuna sebep olan vanilik asit ve vannilinden guaiacol üretildiği bilinmektedir. (Chang ve ark, 2015, Chang and Kang, 2004, Smit ve ark., 2011 and Yue ve ark., 2014). Meyve suyu endüstrisinde büyük miktarda ekonomik kayba sebep olmaktadır.(Howard, 2006, Torlak, 2014 and Walls and Chuyate, 1998).Bu bakterinin elma, portakal ve greyluft suyunda 30 °C'de 4 gün sonunda organizma sayısının 10²/mL'den 10⁵/mL'e yükselmesi sonucu bu kötü kokunun oluştuğunu belirlenmiştir (Komitopoulou ve ark.,1999).

3. *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in MORFOLOJİK ve FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Alicyclobacillus acidoterrestris gram pozitif, aerob, çubuk şekilli, patojenik olmayan, termoasidofilik ve spor oluşturan bir bakteri olup, ticari olarak üretilmiş pastörize meyve suları ve içeceklerin bozulmasına neden olur (Chang and Kang, 2004, Hunniger ve ark., 2015, Jiao ve ark., 2015). Hücre boyutları 2.9-4.3 µm uzunluğunda ve 0.6-0.8 µm genişliğindedir. Sporlar terminal ve superterminal olabilir (Jensen, 1999). Hücre membranı bileşiminde omega-sikloheksan yağ asitleri bulunmakta olup, bu yağ asitlerinin membran kararlılığını koruduğu, bakteriye düşük pH değerlerine ve yüksek sıcaklıklara dirençlilik özelliği kazandırdığı kabul edilmektedir. Bu halkalı yağ asitleri, membranda birbirine yakın şekilde bir araya gelmiştir. Bu özellik yapıya kararlılık sağlamaktadır (Pontius ve ark., 1998). Çizelge 1'de *A. acidoterrestris*'in bazı karakteristik özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1: *A. acidoterrestris*'in Bazı Karakteristik Özellikleri

	<i>A. acidocalderius</i>	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>
pH	2.0-6.0	2.2-5.8	3.0-5.5
pH optimum	-	3.5-4.0	-
Sıcaklık(°C)	45-70	20-60	40-53
Sıcaklık optimum(°C)	60-65	42-53	48
Omegasiklo heksan yağ asiti	+	+	-
Omegasiklo heptan yağ asiti	-	-	+
Eritritolden asit oluşumu	-	+	-
Gram Boyama		Pozitif veya değişken	
katalaz	+/-	+/-	+/-
Eritritolden asit oluşumu	+	+	+
Sitrat kullanımı	+	+	+

4. *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in MEYVE SUYU SEKTÖRÜNDEKİ ÖNEMİ

Alicyclobacillus toprak orijinli bir bakteridir ve büyük bir olasılıkla hasat sırasında topraktan yüzeyine organizma bulaşmış meyvelerin meyve suyu üretiminde kullanılması sonucu veya meyve suyu içerisine ilave edilen sudan bulaşmaktadır (Palop ve ark., 2000). Pekçok meyve suyu örneğinden izole edilmiştir. Ana izolasyon kaynakları toprak ve asidik kaplıca suyu olmasına rağmen farklı meyvelerde, meyve sularında, asitli içeceklerde meyve suyu konsantrelerinde, kurutulmuş ebeğümeci çiçeğinde, farklı tipteki bitkisel çaylarda, buzlu çayların içeriğinde ve elma ve armut aromalarında bulunabilir (Smit ve ark., 2011 and Walker and Phillips, 2008, Oteiza, Soto, Ortiz Alvarenga, Sant'Ana, & Giannuzzi, 2014). Dünya meyve suyu ticaretinde önemli yer tutan elma ve portakal suları bakterinin en fazla izole edildiği meyve sularıdır. Yukarıda da belirtildiği gibi *Alicyclobacillus* sporları ısıya oldukça dirençli olup çoğu meyve sularına uygulanan pastörizasyon işleminden sonra canlılıklarını sürdürebilmektedir (Steyn, Cameron, & Witthuhn, 2011). Hatta pastörizasyon sporları ısı şok olarak etkilemekte olup, sporların çimlenmesine ve sonraki gelişmelerine neden olabilir (Wang ve ark., 2013). Isıl işlemden sonraki inkübasyon koşulları uygun olduğu takdirde ise çimlenme ve ileri aşamalarda istenmeyen aroma gelişimi söz konusu olabilir. *A. acidoterrestris* sporlarının bu gelişimleri 5 gün kadar sürmekte bu süre meyve sularında aroma bozukluğunun ortaya çıkmasında yeterli olmaktadır. Organizmanın gelişimi sırasında gaz üretmemesi ve buna bağlı olarak ambalajlarda bombaj oluşmaması nedenleriyle meyve sularında görünür bozulmanın tespit edilmesi zordur (Walls, 1997). *A. acidoterrestris* ürünlerde bozulmaya neden olan en önemli tür olmasından dolayı meyve suyu endüstrisinin ilgisini çekmiştir. (Steyn ve ark., 2011 and Wang ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada 11 satış noktasından alınan toplam 75 konsantre meyve suyu örneğinde termofilik, aside toleranslı *Alicyclobacillus* bulunmuştur. Örneklerdeki *Alicyclobacillus* sayıları <6.80 MPN/100g düzeyinde saptanmıştır. Ayrıca; ticari sterilizasyon uygulanmış çeşitli meyve sularında canlı asidürik bakteri varlığını saptamak amacıyla marketlerden toplanan

8'i elma, 7'si üzüm, 3'ü vişne ve 12'si karışık olmak üzere; toplam 30 meyve suyu örneğinin %10'unda canlı *Alicyclobacillus* sporlarına rastlanmıştır (Splittstoesser ve ark.,1994). National Food Processors Association tarafından 57 şirket üzerinde yapılan ankette cevap veren 34 şirketten 12 tanesinde (%35). *A.acidoterrestis* kaynaklı bozulmalarla karşılaşıldığı bildirilmiştir (Walls and Chuyate, 2000). Brezilya'da portakal sularından izole edilen 13 suştan sadece 2 tanesinin bozulmalara yol açtığı bildirilmiştir (Eguchi ve ark., 2001). Bozulmuş meyve sularında ciddi anlamda gaz veya asit oluşumu meydana gelmemekte bazen elma suyu gibi berrak meyve sularında çok hafif bulanıklık oluşabilmektedir. Dezenfektan benzeri istenmeyen aroma gelişiminin ise bu bakteriler tarafından sentezlenen 2,6-dibromfenol ve 2,6-diklorfenol gibi halofenoller ile guaiacolden kaynaklandığı bildirilmektedir (Yamazaki ve ark., 1996, Borlinghaus ve Engel, 1997, Jensen, 2000). *Alicyclobacillus acidoterrestis*'e karşı aktivite gösteren doğal antimikrobiyaller arasında cinammaldehide, eugenol, limon özütü ve lizozim sayılabilir (Bevilacqua ve ark., 2013, Bevilacqua ve ark., 2014, Bevilacqua ve ark., 2008a, Bevilacqua ve ark., 2008b and Bevilacqua ve ark., 2010). Bu gibi doğal antimikrobiyallerin birlikte verilmesi her birini tek olarak verilmesinden daha etkilidir. Fakat bu doğal antimikrobiyaller ürünün aromatik özelliklerini olumsuz etkileyebilmektedir. Bu konuda çok çalışma olmaması bu olumsuz etkinin göz ardı edilmesini gerektirmez (Tajkarimi ve ark., 2010).

5. *Alicyclobacillus acidoterrestis* VARLIĞININ TESPİTİ

5.1. Test Metodunun Tanımı

Bu analizde; IFU Method No:12 (Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices) standardı kullanılmaktadır.

Metodun prensibi; Sporlu, termofilik ve asidofilik olan bu bakterinin, asitli ortam sağlayan selektif besiyerinde ve yüksek sıcaklıkta inkübasyonu, inkübasyon sonucu üreme gözlenen muhtemel kolonilerin doğrulanması esasına dayanır. Özellikle YSG agar ve BAT agar *Alicyclobacillus* türleri için gelişimi destekleyici ortam oluştururlar. K agar ise *A.acidoterrestis* 'in baskın olarak üremesi ve diğer türlerin sınırlandırılması için uygun bir besiyeridir. Şüpheli *Alicyclobacillus*'un doğrulanması için pH <3,8 olan ortamda üreyen kolonilerde spor oluşumunun gözlenmesi ve nötral pH değerlerinde de üremenin olmadığına teyit edilmesi gereklidir.

A.acidoterrestis analizinde 2 temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar spor formundaki ve vejetatif formdaki bakterilerin analizidir.

1-Bakterinin vejetatif formda olması beklenen son üründe analizi yapılacaksa; hiçbir şekilde pastörizasyon uygulanmamalıdır.

2- Hammadde ve konsantreler gibi bakterinin spor formda olduğu beklenen materyalde sporlu bakteri analizi uygulanır. Ancak vejetatif formda bakteri bulunma ihtimali değerlendirilerek vejetatif bakteri analizi yapılması önerilir.

Örnek yapısına göre metod 3 farklı şekilde tanımlanmaktadır.

1.Metot : Meyve konsantresi, şurupları gibi hammaddede *Alicyclobacillus ssp.* ve *Alicyclobacillus acidoterrestis* aranması

2.Metot : Son üründe *Alicyclobacillus acidoterrestis* aranması

3.Metot : Ambalajlı üründe *Alicyclobacillus acidoterrestis* aranması

Not: *Alicyclobacillus*'un alkole dayanıklı olması sebebiyle kullanılan ekipmanın alkole batırılıp yakılarak kullanımı uygun olmadığından bunun yerine tamamen otoklavda sterilize edilmiş malzemenin kullanılması önerilmektedir.

5.1.1. Kullanılan Besi Yerleri ve Hazırlanışı

K agar

Yeast extract 2,5 g, Peptone 5,0 g, Glucose 1,0 g, Tween 80 1,0 g, Agar 15,0 g kullanılır. Hazırlanışı ise; tüm içerikler 1000 mL su ile karıştırılır. 15 dakika 121 °C'de sterilize edilir. 50 °C'ye soğuyunca %25'lik malik asit ile pH 3.7'ye ayarlanır.

YSG agar

Yeast extract 2,0 g, Glucose 1,0 g, Soluble starch 2,0 g, Agar 15,0 g kullanılır. Hazırlanışı ise; tüm içerikler 1000mL su ile karıştırılır. 15 dakika 121°C'de sterilize edilir. 50 °C'ye soğuyunca 1N HCl ile pH 3.7'ye ayarlanır.

BAT agar

KISIM-A: CaCl₂ . 2 H₂O 0.25 g, MgSO₄ . 7 H₂O 0.50 g, (NH₄)₂ SO₄ 0.20 g, KH₂ PO₄ 3.0 g, Yeast Extract 2.0 g, Glucose 5.0 g, Trace Minerals Solution * 1.0 mL, Demineralized water 500 mL kullanılır. Hazırlanan agar 1N H₂ SO₄ ya da 1N NaOH kullanılarak pH 4.0'e ayarlanır. 15 dk. 121 °C 'de otoklavlanır ve 50 °C 'ye soğutulur.

*Trace Minerals Solution: CaCl₂ . 2 H₂ 0.66 g, ZnSO₄ . 7 H₂O 0.18 g, CuSO₄ . 5 H₂O 0.16 g, MnSO₄ . H₂O 0.15 g, CoCl₂ . 6 H₂O 0.18 g, H₃BO₃ 0.10 g, Na₂MoO₄ . 2 H₂O 0.30 g, Demineralize su 1000 mL kullanılır. Tüm karışım sterilize edilir .

KISIM-B: Agar 15 - 20 g, Distille su 500 mL kullanılır. 121 °C 'de 15 dak. Sterilize edilir ve 50 °C 'ye soğutulur.

5.1.2. Meyve Konsantresi ve Hammadde Analiz Prensi

10g örnek 1:10 olacak şekilde steril distile su, YSG broth ya da BAT broth ile seyreltilir. 80±1°C deki su banyosunda 10 dakika süre ile ısıtılır. (Su banyosundaki su seviyesinin miktarının örnek seviyesine kadar yeterli miktarda olmalıdır.)

Isıtma işleminden sonra hızlı bir şekilde 40-45 °C 'e soğutulmalıdır. Konsantre ürünlerin steril distile suyla çalışılması önerilir.

5.1.2.1. Direkt Yayma Ekim:

Seyreltilmiş ve ısı şoklanmış örnekten 0,1mL alınarak K agar ve YSG agar yada BAT agara yayma ekim yapılarak 45°C'de 2-5 gün inkübasyona bırakılır. Tespit limiti 100kob/mL'dir. İnkübasyon süresince petri ler günlük kontrol edilir.

Not: İnkübasyon sırasında petri lerin kurumasının önlenmesi için plastik bir koruyucu ile korunabilir.

5.1.2.2. Filtrasyon (isteğe bağlı)

Filtrasyon için 0,45 µm gözenek çaplı filtreler kullanılır. Bu işlem tespit limiti; 1kob/10mL orijinal örnek, 1kob/100mL seyreltilmiş örnek olacak şekilde kolonilerin tespitine imkan sağlar. Seyreltilmiş ve ısı şoklanmış örneğin 100 mL'si filtreden geçirilerek, K agar ve YSG ya da BAT agara transfer edilir. İnkübasyon işlemi direkt yayma ekimdeki gibidir (Filtrasyon sırasında hava kabarcığının oluşmasına izin verilmemelidir.)

5.1.2.3. Değerlendirme ve Doğrulama:

YSG agarda üreyen kolonilere peroksidaz testi yapılır.

5.1.2.4. Peroksidaz Testi:

Bu doğrulama testi, *Alicyclobacillus* türlerinin vanillic asitten guaiacol oluşturması esasına dayanır.

1-Üreme gözlenmiş kolonilerden 5-10 tanesi seçilerek 100 ppm vanillic asit içeren 1mL YSG broth'a alınır.

2-İki ayrı tüpe *A.acidoterrestri*'in pozitif ve negatif suşları hazırlanır (100 ppm vanillic asit içeren 1mL YSG broth'a).

3-İki ayrı tüp ise kör ve guaiacol kontrol için kullanılır.

4-Tüpler 45+ 3 saat inkübe edilir.

5-Tüplere sırasıyla 100µl guaiacol solüsyonu, 1mL phosphate buffer, 20 µL H₂O₂, 20 µl peroksidaz solüsyonu eklenir ve karıştırılır. Oda koşullarında 5 dakika beklenir.

6-Renk değişimine göre değerlendirme yapılır.

Pozitif suş kontrolü; kahverengi, Negatif suş kontrol; soluk bej- kahverengi, Kör; soluk bej- kahverengi, Guaiacol kontrol; koyu kahverengi-turuncu renk kriter olarak değerlendirmeye alınır.

Analiz sonucu kesin renk farklılıkları vermiyorsa; daha fazla ekim alınır ya da işlem süresi uzatılır.

5.1.3 Proses Sonrası Alınan Son Ürün Analiz Prensi

Ambalajlı ürün 45 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılır. Aseptik olarak açılan ambalajdan 0.1 mL K agara ve YSG ya da BAT agara ekim yapılır. 45 °C 2-5 gün inkübasyona bırakılır. Üreme gözlenen kolonilerden nötr bir besiyerine (PCA, tryptic soy agar, brain heart infusion agar) ve 2 adet YSG agar içeren petriye çizim yapılır. (İlave olarak K agar ve BAT agara da çizim yapılabilir.) Nötr pH besiyeri olan petri ve YSG agarın biri 45 °C 'de 3-5 gün inkübasyona bırakılır. Diğer YSG agar olan petri ise 65 °C 'de 2-3 gün inkübe edilir.

Nötr pH besiyerinde üreme olmamalıdır, olması durumunda koloniler *Alicyclobacillus* negatif olarak değerlendirilir.

K agardaki üreme spor oluşumu açısından mikroskopta incelenmelidir. 65°C'de üreme oluşması durumunda saptanan koloniler bozulma yapan *Alicyclobacillus acidoterrestris* açısından negatif olarak değerlendirilir. PCA'da ve 65°C inkübasyon sonrası YSG agarda ürememiş, 45°C inkübasyonda oluşan koloniler muhtemel *Alicyclobacillus acidoterrestris* olarak düşünülür ve peroksidaz testi ile doğrulamaya gidilir.

5.1.4. Marketten Alınan Son Ürün Analiz Prensibi

Ambalajlı ürün 45°C'de 7 gün inkübasyona bırakılır. Aseptik olarak açılan ambalajdan 0.1 mL K agara ve YSG ya da BAT agara ekim yapılır. 45°C'de 2-5 gün inkübasyona bırakılır.

Not: Meyve suyunda *Alicyclobacillus* kaynaklı bir bozulmadan şüpheleniliyorsa ve direkt yayma ekiminde üreme gözlenmemişse üründen 100 mL alınıp, ısıl şoklama yapılarak ardından 45°C'ye soğutulur ve bunun sonrası tekrar K agara ve YSG ya da BAT agara ekim yapılır. Şüpheli kolonilerden peroksidaz testi ile doğrulamaya gidilir. *Alicyclobacillus ssp.* ve *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in aranması kalitatif bir analizdir. Eş zamanlı olarak K agara ve YSG ya da BAT agara yapılan inokülasyon ve inkübasyon sonucu peroksidaz testleri yapılarak doğrulanan *Alicyclobacillus acidoterrestris* analiz sonucu; TESPİT EDİLDİ veya TESPİT EDİLEMEDİ şeklinde rapor edilir.

6.SONUÇ

Ülkemiz ekonomisi ve gelişimi açısından tarım ve tarıma dayalı sanayi çok büyük önem taşımaktadır. Tarım sektörünün en önemli alanlarından biri olan "meyve üretimi ve işleme sanayisinin" ülkemizde büyük bir potansiyeli olduğu bilinmektedir. Ayrıca ülkemizin, meyve suyu sanayisinin işlediği başlıca meyvelerin dünya sıralamasına bakıldığında, en üst sıralarda yer aldığı görülmektedir. Bu yüzden ülkemiz meyve ve meyve işleme sanayisinin önünde hem dış pazardaki hem de iç pazardaki gelişmelerden dolayı çifte fırsat bulunmaktadır. Bu gelişmelerle birlikte meyve suyu sektöründe üretim kayıplarına yönelik ekonomik kayıplar sebebiyle sorun yaratabilecek olan *Alicyclobacillus acidoterrestris* sorununun çözümüne katkı amaçlanmış, tanımlama ve analiz yöntemi ile birlikte bu soruna genel bir bakış atılmıştır. Yapılan çalışmalarla birlikte sorunun çözümüne ümitlenmektedir.

7. KAYNAKLAR

- BAHÇECİ, Ş. ACAR, J. (2003). Meyve Suyu Sanayinde Yeni Bir Problem: *Alicyclobacillus*. Gıda Müh. Derg. 26-31
- BANWART, G.J. (1981). Conditions that influence microbial growth. In Basic Food Microbiology. Abridge Textbook Edition (page:73-120)
- .Bevilacqua ve ark., (2013), Bevilacqua ve ark., (2014), Bevilacqua ve ark., (2008b) and Bevilacqua ve ark., (2010)
- BEVİLACQUA, A., SİNİGALÍA, M., CORBO, M.R. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. International Journal of food Micr. 125:103-110
- CEMEROĞLU, B., ACAR, J. (1986). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi: 206-207
- CERNY, G., HENNLICH, W., PORALLA, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage organism. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 179:224-227.
- CEVİZ G, TULEK Y Con AH (2009) Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media.
- Chang ve ark., (2015), Chang and Kang, (2004), Smit ve ark., 2011 ve Yue ve ark., (2014)
- DARLAND, G., AND BROCK, T.D. (1971). *Bacillus acidocaldarius* sp.nov., An Acidophilic Thermophilic Spore-forming Bacterium. Journal of General microbiology, 67:9-1
- DEINHARD, G., BLANZ, P., PAROLLA, K., ALTAN, E., (1987). *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. Systematic and Applied Microbiology 10, 47-53.
- Doğan, (2000); Komitopoulou ve ark., (1999); Yamazaki ve ark., (1996)
- Durak ve ark. (2010). Oteiza ve ark. (2011). Wang ve ark. (2014) ve Zhang ve ark., (2013)

- EİRONA, M.N.U., CHRİSTİNA, V., JUNQUEİRA, A., SCHMİDT, F.L. (1999). *Alicyclobacillus* in Orange Juice: Occurrence and Heat Resistance of spores. *Journal of Food Protection*, 62(8):883-886.
- F Suyu Federasyonu *A. acidoterrestis* için Resmi analiz yöntemi (2004)
- JENSEN, N. (1999). *Alicyclobacillus*-a new challenge for the food industry. *Food Australia*, 51, 33-36. Howard, (2006). Torlak, (2014) ve Walls ve Chuyate, (1998).
- KARAGÖZLÜN. (2004). Meyve Sularında Bozulma Etmeni *A. acidoterrestis* HR. Ü.Z.F.Dergisi, 8(1):15-21
- KOMİTOPOULO, E., BOZİARİS, I.S., DAVİES-BROUGHTON, J., ADAMS, M.R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestis* in Fruit Juices and its Control by Nisin. *International Journal of Food Science Tech.*, 34:81-85
- LEE, S.Y., DOUGHERTY, R.C., KANG, D-H. (2002). Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *A. acidoterrestis* Spores in Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8):4158-4161
- LOPEZ, RAZNAR, M., CACHO, J., FERREİRA, V.; 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 966, 167-177.
- MARİA-DOLORES LOPEZ, PRESENTACİON GARCİA, MARİNA MUNOZ-CUEVAS, PABLO S. FERRANDEZ ALFREDO PALOP. (2012) Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores under conditions simulating industrial heating processes of tangerine vesicles and its use in time temperature integrators 232(5):821-827. DOI:10.1007/s00217-011-1449-1
- MURAKAMİ, M., TEDZUKA, H., YAMAZAKİ, K. (1998). Thermal Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* Spores in different Buffers and pH. *Food Mikrobiyoloji*, 15:577-582
- PALOP, A., ALVAREZ, I., RASO, J., CONDO'N, S. (2000). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice.
- PETTİPHER, G.L., OSMUNDSON, M.E., MURPHY, J.M., (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestis* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice containing drinks. *Letters of Applied Microbiology*, 24, 185-189.
- PONTİUS, A. J., J. E. RUSHİNG, P. M. FOEGEDİNG. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores as affected by various pH values and organic acids. *J. Food Prot.* 61:41-46.
- SİLVA, F.M., GİBBS, P., Vieira, M.C., and SİLVA, C.L.M. (1999) Thermal Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestis* Spores Under Different Temperature, Soluble Solids and pH Conditions for The Design of Fruit Processes. *International Journal of Food Microbiology*. 51:95-103
- SİLVA, F.V.M., and GİBBS, P. (2001) *Alicyclobacillus acidoterrestis* Spores in Fruit Product and Design of Pasteurization Processes. *Trends in Food Science and Technology*. 12:68-74
- SPLİTTSTOESSER, D.F., CHUREY, J., LEE, C.Y. (1994). Growth Characteristics of Aciduric Spore Forming Bacilli Isolated from Fruit Juice. *Journal of Food Protection*, 57(12):1080-1083
- ŞAHBAZ, F., CEMEROĞLU, B., ACAR J. (1996). Gıda Mühendisliğinde Sterilizasyon, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları Ders Notları No:37, Ankara, 134s.
- Meyve suyu sektörü raporu, (2010). Meyed: Meyve suyu endüstrisi derneği
- UCHİNO, F., and S. DOİ. (1967). Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agric. Biol Chem.* 31:817-822.
- OMOE K, IMANİSHİ K., HU D.L., KATO H. (2004). Biological properties of *Staphylococcal* enterotoxin-like toxin type R. *Infection and Immunity*; 72(6): 3664-3667
- RALL VLM, VİEİRA FP, RALL R, VİETİS R.L., FERNANDES A., CANDEİAS J.M., SOEJİMA T, NAGAO E, KUBOTA T, YAMAGATA H, KAGİ H., (2004). Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples. *Int J Food Microbiol*; 93: 185-194
- Smit ve ark., (2011).
- Smit ve ark., (2011) ve Walker ve Phillips, (2008). Oteiza, Soto, Ortiz Alvarenga, Sant'Ana, & Giannuzzi, (2014).

Steyn, Cameron, & Witthuhn, (2011).

Steyn ve ark., (2011) ve Wang ve ark., (2014).

Tajkarimi ve ark., (2010).

WALLS, I. 1999. Characterization and control of *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

WALLS, I., and R. CHUYATE. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Aust.* 52:286-288.

WISOTZKEY, J. D., P. JURSTHUK JR., G. E., FOX, G. DEINHARD, and K. PORALIA, (1992). Comparative sequence analysis on the 16 s rRNA-(rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J. Syst Bacteriol.* 42:263–269.

YAMAZAKI, K., TEDUKA, H., SHINANO, H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:543–545.