



Thermal Resistance of Acid Adapted and Non-Adapted Stationary Phase *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in Pomegranate Juice

Zeynal Topalcengiz^{1,a,*}, Sefa Işık^{2,b}, Yusuf Alan^{3,c}

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Muş Alparslan University, 49250 Muş, Turkey

²Department of Food Processing, Vocational School of Technical Sciences, Muş Alparslan University, 49250 Muş, Turkey

³Department of Primary Education, Faculty of Education, Muş Alparslan University, 49250 Muş, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 14/02/2019 Accepted : 04/07/2019</p> <p>Keywords: Acid Adaptation Thermal resistance <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> <i>Listeria</i> Pomegranate Juice</p>	<p>The purpose of this study was to investigate the thermal resistance of acid adapted and non-adapted stationary phase <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> in pomegranate juice. In addition, the performance of generic <i>E. coli</i> was evaluated as an indicator. Non-adapted stationary phase cells were grown by incubating inoculated tryptic soy broth without glucose (TSB-NG) at 36±1°C for 18±2 hours. Tryptic soy broth with 1% glucose (10 g/l; TSBG) was used for acid adaptation. All media used for <i>L. monocytogenes</i> was supplemented with 0.6% yeast extract. After washing the cells with peptone, 5 ml of pasteurized pomegranate juice was added onto the pellet to obtain inoculated juice with a initial concentration of 10⁷-10¹⁰ log CFU/ml. Inoculated pomegranate juice was sealed into the microcapillary tubes. Microtubes were heat treated in waterbaths at 50, 52 and 54±1°C by immersing at pre-determined time intervals. Survived populations were counted on tryptic soy agar (TSA). <i>S. Typhimurium</i> had the lowest thermal resistance in pomegranate juice. At 50°C, <i>E. coli</i> O157:H7 was the most resistant, whereas <i>L. monocytogenes</i> was more thermally tolerant at 52 and 54°C. Acid adaptation decreased the thermal resistance of <i>E. coli</i> O157:H7, but increased the heat resistance of <i>L. monocytogenes</i> at all tested temperatures significantly. Thermal tolerance of <i>S. Typhimurium</i> increased only at 50°C. The most resistant microorganism was non-adapted generic <i>E. coli</i> at 50 and 52°C; acid-adapted <i>L. monocytogenes</i> had the most thermal tolerance at 54°C. Thermal inactivation of microorganisms in pomegranate juice could be tested at lower temperatures compare to other fruit juices. This may be due to the natural antimicrobial effect and more acidic content of pomegranate juice.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(7): 1000-1007, 2019

Aside Adapte ve Adapte Olmayan Durağan Faz *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Typhimurium ve *Listeria monocytogenes*'in Nar Suyundaki Termal Direnci

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 14/02/2019 Kabul : 04/07/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Asit Adaptasyonu Termal direnç <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> <i>Listeria</i> Nar suyu</p>	<p>Bu çalışmada, aside adapte olan ve adapte olmayan durağan faz <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium ve <i>Listeria monocytogenes</i>'in nar suyundaki termal dirençleri incelenmiştir. Ayrıca, jenerik <i>E. coli</i>'nin gösterge mikroorganizma olarak performansı değerlendirilmiştir. Aside adapte olmayan durağan faz hücreler şeker içermeyen tryptic soy broth'da (TSB-NG) 36±1°C'de 18±2 saat inkübe edilerek elde edilmiştir. Asit adaptasyonu için %1 glukoz içeren tryptic soy broth (10 g/l; TSBG) kullanılmıştır. <i>L. monocytogenes</i> için kullanılan besiyerleri %0,6 yeast ekstraktla desteklenmiştir. Hücreler peptonlu su ile yıkandıktan sonra, 5 ml pastörize nar suyu pellet üzerine eklenerek 10⁷-10⁹ log CFU/ml konsantrasyonunda inoküle nar suyu elde edilmiştir. İnoküle edilmiş nar suyu, mikrokapilar tüp içine mühürlenmiştir. Mikrotüpler 50, 52 ve 54±1°C'deki önceden belirlenmiş zaman aralıklarında su banyolarına batırılarak ısı işlem uygulanmıştır. Canlı kalan bakteri popülasyonları tryptic soy agar (TSA) üzerinde sayılmıştır. <i>S. Typhimurium</i> nar suyunda en düşük termal direnci göstermiştir. Düşük sıcaklıklarda <i>E. coli</i> O157:H7 ısı işlemine karşı daha dirençliken, yüksek sıcaklıklarda <i>L. monocytogenes</i> daha fazla termal tolerans göstermiştir. Asit adaptasyonu, <i>E. coli</i> O157:H7'nin direncini azaltırken, <i>S. Typhimurium</i>'un 50°C'de, <i>L. monocytogenes</i>'in ise bütün sıcaklıklarda termal inaktivasyon süresini artırmıştır. Aside adapte olmayan jenerik <i>E. coli</i> 50 ve 52°C'de, aside adapte <i>L. monocytogenes</i> 54°C'de uygulanan ısı işlemine en dayanıklı olan mikroorganizma olmuştur. Nar suyu için elde edilen termal inaktivasyon süreleri diğer meyve sularına göre daha düşük sıcaklıklarda test edilebilmiştir. Bunun sebebi olarak nar suyunun doğal antimikrobiyal etkisi ve diğer meyve sularına oranla daha asidik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.</p>

^az.topalcengiz@alparslan.edu.tr

^b<http://orcid.org/0000-0002-2113-7319>

^cs.isik@alparslan.edu.tr ^d<https://orcid.org/0000-0002-1480-7230>

^ey.alan@alparslan.edu.tr

^f<https://orcid.org/0000-0003-0007-0212>



Giriş

Nar (*Punica granatum* L.) taze olarak tüketilebildiği gibi meyve suyu, meyve suyu konsantresi, jöle ve reçel gibi çeşitli ürünlere işlenerek de tüketilebilmektedir (Cemeroğlu ve Artık, 1990; Saxena ve ark., 1987). Nar suyunun zengin fenolik içeriğe sahip olması ve dolayısıyla sağlık üzerindeki pozitif etkileri bilinçlenen tüketicinin bu ürüne olan ilgisini artırmaktadır. Özellikle, nar suyunda bulunan fenolik bileşikler ve antosiyaninlerin antioksidan özelliklerinden dolayı sağlık üzerindeki olumlu etkileri bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Aviram ve ark., 2000; Aviram ve Dornfeld, 2001; Aviram ve ark., 2004; Gil ve ark., 2000; Seeram ve ark., 2008; Zarfeshany ve ark., 2014). Son yıllarda, pastörize %100 nar suları Türkiye ve birçok ülkede çeşitli markalar ile raflardaki yerlerini almaktadır.

Gıda üretiminin tüm aşamalarında gıda kaynaklı patojenler, pH, sıcaklık ve ozmotik stres gibi çeşitli stres faktörleriyle karşılaşmaktadırlar. Patojenler bu stresli koşullara dayanmak ve hayatta kalmak için koruyucu mekanizmalar geliştirmektedirler (Mazzotta, 2001). Bazı gıda kaynaklı patojen türleri asit adaptasyonu sayesinde asidik koşullardan korunabilmektedir. *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* türleri ve *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojenlerin asit adaptasyon sistemleri geliştirip çapraz korumayla yüksek sıcaklık gibi çevresel etkenlere karşı daha dayanıklı hale gelebildikleri belirlenmiştir (Ryu ve Beuchat, 1998; Haberbeck ve ark., 2017; Ryu ve ark., 1999). Asit adaptasyonunun, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O111, *Salmonella* türleri ve *L. monocytogenes*'in termal dirençlerinin başka bir ifadeyle desimal azalma sürelerinin (*D*-değerlerinin), elma, portakal, beyaz üzüm, karışık meyve suları, kavun ve karpuz sularında artırdığı tespit edilmiştir (Mazzotta, 2001; Ryu ve Beuchat, 1998; Sharma ve ark., 2005; Topalcengiz ve Danyluk, 2017; Usaga ve ark., 2014). Sonuç olarak asit adaptasyonu gıda kaynaklı patojenlerin inaktivasyonunu zorlaştıran bir sebep olmaktadır.

Meyve sularının kanıtlanmış birçok toplu gıda zehirlenmelerine neden olduğu rapor edilmiştir (CDC, 2014; Danyluk ve ark., 2012; Vojdani ve ark., 2008). Zehirlenmelere başlıca *Salmonella* türleri, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O111, ve *Cryptosporidium*'un sebep olduğu bildirilmektedir. Meyve sularında, *L. monocytogenes* kaynaklı toplu zehirlenme olayı görülmemiştir (CDC, 2015; Vojdani ve ark., 2008). Ancak, *L. monocytogenes*'in doğal olarak yaygın bir şekilde doğada bulunması, meyve sularında risk faktörü olarak görülmesine neden olmaktadır. Patojenlerin inaktivasyonu genellikle ısı işlemi ile yapılmaktadır. Amerikan İlaç ve Gıda Bakanlığı meyve suyu işletmelerinde, bir mililitre meyve suyundaki ilgili patojen sayısının 5-Log (100,000 kat) azaltılması için gerekli ısı işlemi uygulanmasını şart koşan Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) uygulamasını 2001 yılında yayınlamıştır (FDA, 2001). İlgili patojen popülasyonunun 5-Log azalmayı sağlamak için gerekli minimum pastörizasyon parametresi 71,1°C'de 3 saniye olarak belirlenmiştir (Mazzotta, 2001). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB, 2011) tarafından yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde, pastörize meyve suyunun 25 ml'sinde ilgili patojenlerin bulunmaması şartı koşulmuştur.

Son on yıllık süreçte patojenlerin çeşitli meyve sularında ki termal direnci üzerine önemli çalışmalar yapılmıştır (Enache ve ark., 2011; Gabriel ve ark., 2015; Gabriel ve Nakano, 2011; Topalcengiz ve Danyluk, 2017; Topalcengiz, 2019; Usaga ve ark., 2014) Patojenlerin termal toleransı, ortamın formülasyonuna, toplam kuru madde oranına, asitliğine ve su aktivitesi de dahil olmak üzere gıdaların fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Doyle ve Mazotta, 2000). *E. coli* O157:H7'nin ısı direnci, elma suyunda çözünür katı maddenin 11,8 ile 16,5 °Brix arasında artırılmasından etkilenmemiştir. Ancak, 52°C'de malik, sorbik ve benzoik asit ilavesi sonucunda pH'nın 4,4'ten 3,6'ya düşmesi *E. coli*'nin ısı direncini etkilemiştir (Splitstoeser ve ark., 1996). Nar suyu ve diğer meyve parçalarından elde edilen madde ve ekstraktların antibiyotik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Jayaprakasha ve ark., 2006). Meyve suyunun içeriği termal inaktivasyon parametrelerini doğrudan etkilemektedir.

Meyve suları gibi asidik gıdaların zehirlenmelere yol açtığı ispatlanması ile bu gıdaların güvenliği sorgulanmaya başlanmıştır. Nar suyu birçok meyve suyu gibi asidik gıdalar kategorisindedir. Asit adaptasyonu patojenlerin termal toleranslarını artırmaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin asidik gıda kategorisinde olan nar suyundaki termal inaktivasyonu ile ilgili güncel çalışma bulunmamaktadır. Meyve suyu pastörizasyonunda, prosesin başarısı, yeterli ısı işlem zamanına ve pastörizasyon sıcaklığına bağlıdır. Bu çalışmanın amacı aside adapte ve adapte olmayan şiga toksin üreten *E. coli* O157:H7'nin, *Salmonella enterica* Typhimurium ve *L. monocytogenes*'in nar suyundaki termal inaktivasyon değerlerinin belirlenerek karşılaştırılmasıdır.

Materyal ve Yöntem

Nar Suyu

Aynı parti numarası ve markaya sahip yüzde yüz nar suları piyasadan pastörize şekilde alınıp aseptik olarak steril santrifüj tüplerine doldurularak -20°C'de saklanmıştır. Deney gününde santrifüj tüpündeki nar suyu dondurucudan alınarak analizlerde kullanılması için oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Nar suyunun pH ve suda çözünür kuru madde (°Brix) özellikleri pH metre (HACH, HQ30d Portable Multi Meter, CO, USA) ve otomatik bir refraktometre (Index Instrument, PTR 2a, USA) ile ölçülmüştür.

Bakteri Suşları ve İnokülümün Hazırlanması

Bu çalışmada birer adet jenerik *E. coli* (ATCC 35218), *E. coli* O157:H7 (ZT10; gıda izolatu), *Salmonella enterica* serotip Typhimurium (ATCC 14028; 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde portakal suyundan zehirlenmeye sebep olan izolatu) ve *Listeria monocytogenes* serotip 4b suşu (ATCC 19115; insan izolatu) kullanılmıştır. Bakteri suşları aside adapte ve aside adapte olmayan suşlar olmak üzere iki grup olarak incelenmiştir. Donmuş kültürler (-20°C), tryptic soy agar (TSA; Biolife; Milan, Italy) üzerine ekilmiş 36±2°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktive edilmiştir. Aktif kültürlerden birer koloni glukoz içermeyen ve %1 (10 g/l) glukoz içeren 10 ml tryptic soy broth'a (TSB-NG ve TSBG; Neogen; Lanchashire, UK) inoküle edilmiştir. Asit

adaptasyonu Buchanan ve Edelson (1996)'ın tarif ettiği şekilde %1 saf glukozun (10 g/l) TSB'ye eklenerek glukozun fermantasyonu sonucu asitliğin düşürülmesi prensibine dayalı olarak yapılmıştır (Ryu ve Beuchat, 1998). İnoküle edilen mikroorganizmalar $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, gelişen kültürlerin 100 µl'si 15 ml'lik santrifüj tüplerine (LABSOLUTE®, Germany) doldurulmuş 10 ml TSB-NG ve TSBG transfer edilerek tekrardan $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat inkübe edilmiştir. *L. monocytogenes* için kullanılan besiyerleri %0,6 yeast ekstraktla (Biolife; Milan, Italy) zenginleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 5.300 RPM'de 10 dakika santrifüj edilerek (Thermo Scientific, Labofuge 200 Benchtop Centrifuge, Germany) peptonlu su ile iki defa yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra, supernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 5 ml nar suyu eklenerek vortekslenmiştir. Sonuç olarak 10^7 - 10^{10} CFU/ml patojen yoğunluğuna sahip nar suları termal işlemden kullanılmak üzere elde edilmiştir.

İnoküle Edilmiş Nar Suyuna Termal İşlem Uygulanması

Patojenik *E. coli*, jenerik *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* ile inoküle edilmiş 50 µl nar suyu, steril mikrokapıları tüplere (1,5-1,8 (ID) 90 mm; Kimble-Kontes, Vineland, NJ, USA) aseptik olarak doldurulmuştur. Aseptik dolum işlemi steril 20 gauge 4 inç deflected-point needle (Popper and Sons, Inc., Hyde Park, NJ, USA) ve 1 mL'lik şırınga ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra mikrokapıları tüplerin açık uçları bunzen alevi ile mühürlenmiştir. Ardından 2 adet mikrokapıları tüp (100 µl inoküle edilmiş nar suyu), ön denemelerle belirlenen üç farklı sıcaklıkta (50 , 52 , $54\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve çeşitli sürelerde önceden ısıtılmış çalkalamalı su banyolarında (NÜVE, ST30, Ankara, Turkey) termal işleme tabi tutulmuştur. Termal uygulamadan sonra, mikrokapıları tüpler hızlıca buzla dolu kaba alınarak soğutulmuştur. Soğutulma işleminden sonra, mikrokapiler tüplerin dış yüzeyleri %70'lik alkole daldırılarak steril edilmiştir. Mikrokapıları tüp yüzeyindeki alkol steril deiyonize su ile yıkanarak, 10 ml peptonlu su içinde steril cam çubukla kırma yoluyla homojenize edilmiştir. İlk konsantrasyon 1:100'dür. *E. coli* O157:H7, jenerik *E. coli*, *S. Typhimurium* popülasyonları çeşitli dilüsyonlarda TSA üzerine ve *L. monocytogenes* ise %0,6 yeast ekstrakt ile desteklenmiş TSA üzerine ekilerek sayılmıştır. Hassasiyeti artırmak ve az sayıdaki mikroorganizmaların sayısını belirlemek için 1 ml'lik ilk dilüsyon (10^{-2}) 0,25 ml olarak dört petriye ekilmiştir. Her bir ısı ve mikroorganizma için toplam altı tekrar ($n=6$) çift petri üzerine ekim yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

D-değerleri, ısıl işlem sonrasında canlı kalan mikroorganizma konsantrasyonunun ve ısıl işlem süresinin grafiğe aktarılmasının ardından regresyon analizi ile

hesaplanmıştır. *D*-değerleri, Analysis of Covariance (ANCOVA) ile JMP software (Version 9.0.2 SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA 2010) yardımıyla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Meyve sularına ısıl işlem uygulanması, patojenleri ve enzimleri inaktive etmek ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalarının popülasyonunlarını azaltmak için etkili ve geniş çapta tercih edilen bir yöntemdir. Patojenlerin termal inaktivasyonu, meyve sularında yirmi yılı aşkın süredir incelenmektedir. Elma cideri, elma ve portakal suyu, pH değerleri 4,0'ın altında olan ve en çok çalışılan meyve sularıdır (Enache ve ark., 2011; Gabriel ve ark., 2015; Gabriel ve Nakano, 2011; Ingham ve Uljas, 1998; Mazzotta, 2001; Ryu ve Beuchat, 1998; Splittstoesser ve ark., 1995; Usaga ve ark., 2014; Topalcengiz ve Danyluk, 2017). Kullanılan nar suyunun pH'sı $3,23\pm 0,02$ ve Brix° değeri de $16,1\pm 0,1$ olarak belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda test sıcaklıkları elma, portakal, diğer meyve suları için genel olarak 55 ile 62°C arası seçilmektedir. Bu çalışmada nar suyu daha önceki çalışmalarda seçilen sıcaklıklara göre daha düşük sıcaklıklarda (50 , 52 , 54°C) test edilebilmiştir. Bunun sebebi nar suyunun ortalama meyve suyu pH'sı olan 3,5'in altında olması ve ihtiva ettiği antimikrobiyal maddeler olarak düşünülmektedir (Jayaprakasha ve ark., 2006; Karabiyikli ve ark., 2014). Mikroorganizmaların TSB-NG, TSBG, TSBY-NG ve TSBYG'ye inoküle edildikten 18 ± 2 saat inkübasyon sonrasındaki besiyerlerinin mevcut pH değerleri Çizelge 1'de gösterilmiştir. Aside adapte edilmiş mikroorganizmalar arasında en düşük ve en yüksek besiyeri pH değişim değeri $4,39\pm 0,02$ ile *L. monocytogenes*'e ve $4,96\pm 0,03$ ile *S. Typhimurium*'e aittir. Benzer şekilde, aside adapte olmayan mikroorganizmalar tarafından gelişim sırasında oluşan en yüksek pH ise $6,65\pm 0,02$ ve $7,19\pm 0,02$ ile aynı mikroorganizmalara aittir. Bu değerler, Buchanan ve Edelson (1996)'un belirttiği asit adaptasyon koşullarının sağlandığını göstermektedir. Yapılan hesaplama sonucunda *D*-değerlerinin hesaplanmasında kullanılan lineer regresyon doğrularından elde edilen R^2 değerleri yalnızca %12,5'inde 0,8'den düşük çıkmıştır (Çizelge 2). En düşük R^2 değeri aside adapte olmayan *L. monocytogenes*'te 0,743 olarak hesaplanmıştır. Bu da hesaplanan *D*-değerlerinin geçerliliğinin genel olarak yüksek olduğu anlamına gelmektedir. *z*-değerlerinin hesaplanmasında kullanılan lineer regresyon doğrularının R^2 değerleri 0,95'in üzerindedir (Şekil 3).

Çizelge 1 Suşların yıkanmadan önce geliştirildiği besiyerlerinin $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat inkübasyon sonrası pH değerleri ($n=6$).
Table 1 pH values of media after incubation at $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 18 ± 2 h where strains ($n=6$).

Suş	Medya	pH
<i>E. coli</i> O157:H7 (ZT10)	TSB-NG	$7,00\pm 0,02$
	TSBG	$4,83\pm 0,01$
Jenerik <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	TSB-NG	$7,15\pm 0,02$
	TSBG	$4,81\pm 0,01$
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	TSB-NG	$7,19\pm 0,02$
	TSBG	$4,92\pm 0,03$
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19115)	TSBY-NG	$6,65\pm 0,02$
	TSBYG	$4,39\pm 0,01$

TSB-NG: Şeker içermeyen tryptic soy broth, TSBG: %1 glukozla desteklenmiş tryptic soy broth, TSBY-NG: Şeker içermeyen %0,6 yeast ekstrakt eklenmiş tryptic soy broth, TSBYG: %1 glukoz ve %0,6 yeast ekstraktla desteklenmiş tryptic soy broth

Çizelge 2 50, 52, 54°C'de *D*-değeri hesaplamasında kullanılan *E. coli* O157:H7, jenerik *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* suşları için lineer regresyon eşitliklerinden elde edilen R^2 değerleri.

Table 2 R^2 of linear regression lines obtained from *E. coli* O157:H7, generic *E. coli*, *S. Typhimurium*, and *L. monocytogenes* strains used in *D*-value calculations at 50, 52, 54°C.

Suş	Lineer regresyon eşitliklerinden elde edilen R^2 değerleri			
	Adaptasyon	50°C	52°C	54°C
<i>E. coli</i> O157:H7 (ZT10)	Hayır	0,893	0,8833	0,9065
	Evet	0,9823	0,9397	0,9183
Jenerik <i>E. coli</i> (ATCC 35218)	Hayır	0,8599	0,7892	0,8983
	Evet	0,9827	0,9914	0,9862
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	Hayır	0,9895	0,9219	0,9735
	Evet	0,974	0,9728	0,949
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19115)	Hayır	0,805	0,7437	0,743
	Evet	0,9825	0,8807	0,9418

Çizelge 3 Aside adapte olan ve olmayan *E. coli* O157:H7, jenerik *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*'in lineer regresyon eşitlikleriyle hesaplanmış *D* ve *z*-değerleri

Table 3 *D* and *z*- values of non-adapted and acid adapted *E. coli* O157:H7, generic *E. coli*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* calculated from linear regression equations

Suş	$D_{50^\circ C} \pm SD$ (dk)*		$D_{52^\circ C} \pm SD$ (dk)*		$D_{54^\circ C} \pm SD$ (dk)*		<i>z</i> -değeri (°C)	
	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet
ZT10	4,22±0,19 ^{aA}	1,41±0,18 ^{aB}	2,03±0,30 ^{aA}	0,73±0,14 ^{aB}	1,18±0,07 ^{aA}	0,41±0,09 ^{aB}	7,2	7,5
ATCC 35218	7,08±0,43 ^{bA}	2,86±0,20 ^{abB}	4,77±0,17 ^{bA}	1,83±0,26 ^{bcB}	2,67±0,13 ^{bA}	1,14±0,11 ^{bB}	9,4	10
ATCC 14028	1,33±0,16 ^{cA}	2,44±0,21 ^{bcB}	0,85±0,11 ^{cA}	0,81±0,15 ^{cB}	0,50±0,07 ^{cA}	0,43±0,10 ^{cB}	9,4	5,3
ATCC 19115	4,09±0,28 ^{aA}	4,64±0,36 ^{cB}	2,56±0,13 ^{dA}	4,20±0,15 ^{dB}	1,56±0,11 ^{dA}	3,39±0,11 ^{dA}	9,6	29,3

*Satır üzerindeki farklı büyük harfler aside adapte olan ve adapte olmayan hücreler için *D*-değerleri arasındaki anlamlı farklılığı gösterir. Kolon üzerindeki farklı küçük harfler test edilen sıcaklıkta suşlar arasındaki anlamlı farklılığı gösterir ($P < 0,05$)

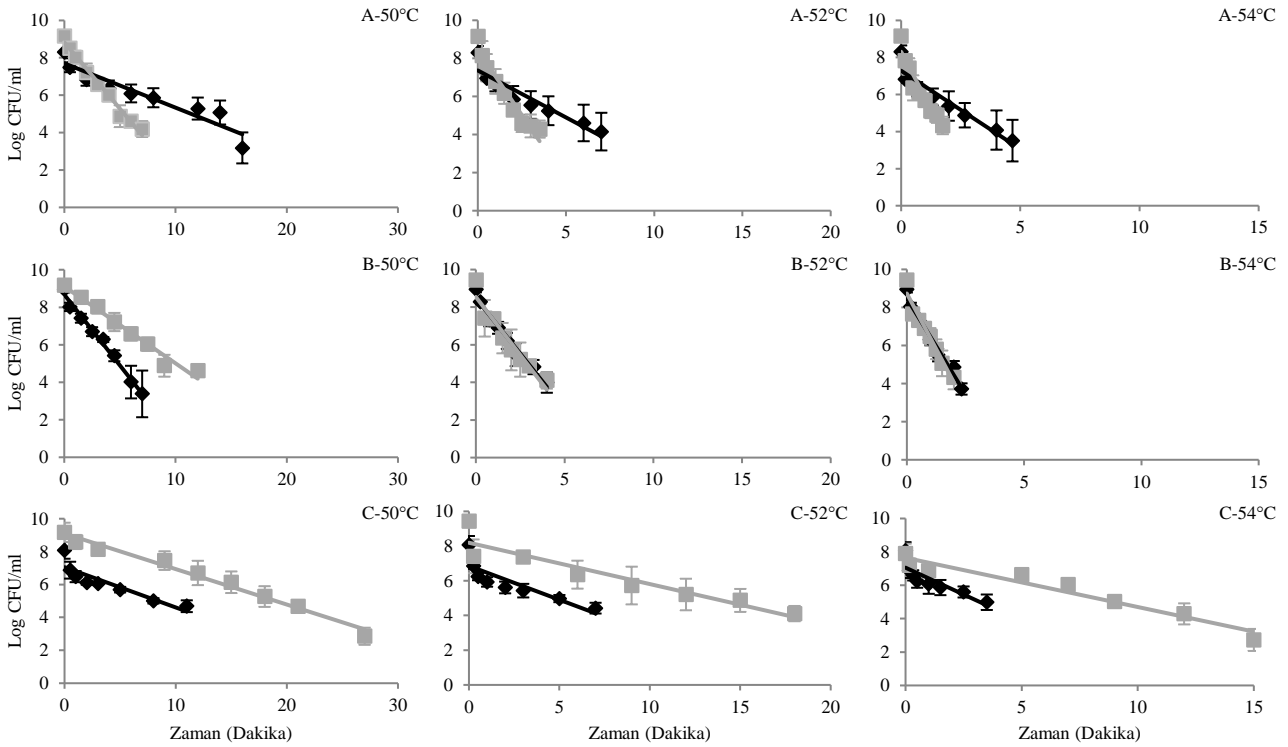
Escherichia coli O157:H7

Meyve sularında patojenlerin termal inaktivasyon çalışmaları şiga toksin üreten *E. coli* suşları üzerine elma cidri ve suyunda yoğunlaşmıştır (Enache ve ark., 2011; Gabriel ve Nakano, 2011; Ingham ve Uljas, 1998; Mazzotta, 2001; Splittstoesser ve ark., 1995; Usaga ve ark., 2014). Bunun sebebi ise meydana gelmiş ve ispatlanmış elma cidri ve elma suyu kaynaklı zehirlenme vakalarıdır (CDC, 2014; Danyluk ve ark., 2012; Vojdani ve ark., 2008). Asit adaptasyonu *E. coli* O157:H7'nin nar suyunda test edilen tüm sıcaklıklardaki termal dayanıklılığını azaltmıştır ($P < 0,05$). Asit adaptasyonunun, şiga toksin üreten *E. coli*'nin elma ve portakal suları dahil diğer meyve sularına termal toleransını artırdığı veya bu çalışmaya benzer şekilde azalttığı rapor edilmiştir (Mazzotta, 2001; Ryu ve Beuchat, 1998; Topalcengiz ve Danyluk, 2017). *E. coli* O157:H7 için hesaplanan *D*-değerleri Çizelge 3'te gösterilmiştir. Bu çalışmada, nar suyunda 50, 52 ve 54°C'de aside adapte olmayan *E. coli* O157:H7'nin nar suyu için *D*-değerleri sırası ile 4,22±0,19, 2,03±0,30 ve 1,18±0,07 dk olarak hesaplanmıştır. Aside adapte olan *E. coli* O157:H7'nin nar suyundaki hesaplanan *D*-değerleri ise 1,41±0,18; 0,73±0,14 ve 0,41±0,09 dk olarak belirlenmiştir. Nar suyunda hesaplanan bu *D*-değerleri, daha önceki elma ve portakal suyunda yapılan çalışmalardan en az üç kat daha düşüktür (Mazzotta, 2001; Ryu ve Beuchat, 1998; Splittstoesser ve ark., 1995; Topalcengiz ve Danyluk, 2017; Usaga ve ark., 2014). *E. coli* O157:H7'nin zamana karşı popülasyonunun azalması grafiksel olarak Şekil 1'de gösterilmiştir. *E. coli*'nin serogrup değişkenliği termal direncini etkileyebilir. Enache ve ark. (2011) ve Topalcengiz ve Danyluk (2017) tarafından yapılan farklı iki çalışmada, *E. coli* serogrup

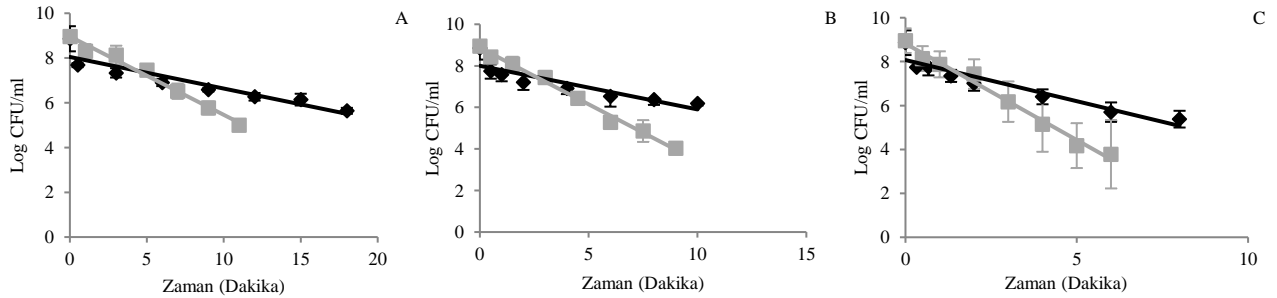
O26, O45, O103, O111, O121, O145 ve O157:H7'nin elma ve portakal sularında farklı termal tolerans değerleri gösterdikleri rapor edilmiştir.

Salmonella enterica Typhimurium

Meyve sularında *Salmonella*'nın termal inaktivasyonunu inceleyen çalışmaların sayısı sınırlıdır. *S. Typhimurium* için hesaplanan *D*-değerleri Çizelge 3'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, nar suyunda 50, 52 ve 54°C'de aside adapte olmayan *S. Typhimurium*'un nar suyu için *D*-değerleri sırası ile 1,33±0,16; 0,85±0,11 ve 0,50±0,07 dk olarak hesaplanmıştır. Aside adapte olan *S. Typhimurium*'un nar suyundaki *D*-değerleri ise 2,44±0,21; 0,81±0,15 ve 0,43±0,10 dk olarak belirlenmiştir. 54°C'de nar suyu için bulunan termal inaktivasyon değerlerinin, 55°C'de aynı metodoloji ile portakal suyunda hesaplanan *D*-değerinin yarısı kadar olduğu belirlenmiştir (Topalcengiz ve Danyluk, 2017). Nar suyundaki inaktivasyon hızının meyve suyu içeriğindeki antimikrobiyal maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. *S. Typhimurium*'un nar suyunda 50, 52 ve 54°C'deki termal inaktivasyon işlemi sonunda, aside adapte ve adapte olmayan mikroorganizmaların *D*-değerlerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu çalışmada, sadece 50°C'de *Salmonella*'nın asit adaptasyonu sonucu termal inaktivasyon süresinin arttığı belirlenmiştir. Asit adaptasyonunun, *Salmonella*'nın elma, portakal, beyaz üzüm, kavun ve karpuz suyundaki 55-60°C arası farklı sıcaklıklarda termal direncini artırdığı rapor edilmiştir (Mazzotta, 2001; Sharma ve ark., 2005; Topalcengiz ve Danyluk, 2017). *S. Typhimurium*'un zamana karşı popülasyonunun azalması grafiksel olarak Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1 A) *E. coli* O157: H7, B) *S. Typhimurium* C) *L. monocytogenes* suşlarının 50, 52 ve 54°C'de ki *D*-değerleri tahmin etmek için kullanılan lineer regresyon doğruları. (■) Aside adapte olan, (◆) Aside adapte olmayan (n = 6).
Figure 1. Linear regression lines of A) *E. coli* O157:H7, B) *S. Typhimurium* C) *L. monocytogenes* strains to estimate *D*-values at 50, 52 and 54°C. (■) Acid adapted, (◆) Non-adapted (n=6)



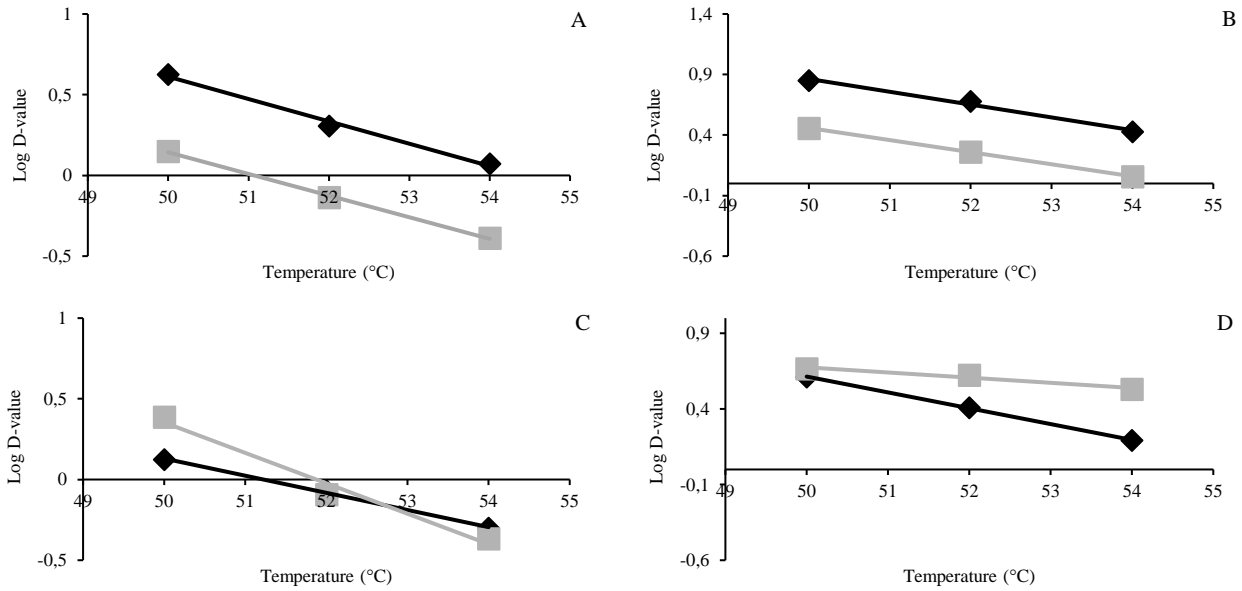
Şekil 2 Jenerik *E. coli* suşunun A) 50°C B) 52°C C) 54°C'de *D*-değerleri tahmin etmek için kullanılan lineer regresyon doğruları. (■) Aside adapte olan, (◆) Aside adapte olmayan (n = 6).

Figure 2 Linear regression lines of generic *E. coli* strain to estimate *D*-values at A) 50°C B) 52°C C) 54°C. (■) Acid adapted, (◆) Non-adapted (n=3)

Listeria monocytogenes

Meyve suları ile ilgili *L. monocytogenes*'in sebep olduğu doğrulanmış bir salgın olmamasına rağmen, doğal olarak her yerde bulunması nedeni ile pastörize meyve suyu transfer edildiğinde veya harmanlandığında meyve suyuna potansiyel kontaminasyonu riski nedeniyle hedef mikroorganizma olarak kabul edilir (FDA, 2004). *L. monocytogenes* için hesaplanan *D*-değerleri Çizelge 3'te gösterilmiştir. 50, 52 ve 54°C'de aside adapte olmayan *L. monocytogenes*'in nar suyu için hesaplanan *D*-değerleri sırasıyla 4,09±0,28; 2,56±0,13 ve 1,56±0,11 dk olarak belirlenmiştir. Aside adapte olan *L. monocytogenes*'in nar suyundaki *D*-değerleri ise 50, 52 ve 54±1°C'de sırasıyla 4,64±0,36; 4,20±0,15 ve 3,39±0,11 dk olarak belirlenmiştir. İki derecelik sıcaklık artışının, özellikle aside adapte hücreler üzerinde termal inaktivasyon süresi açısından çok belirgin bir fark yaratmadığı görülmüştür. Bu çalışmada nar suyu için hesaplanan *D*-değerlerinin

farklı ve aynı metodoloji ile çeşitli meyve sularında hesaplanan *D*-değerlerine paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Mazotta, 2001; Topalcengiz ve Danyluk, 2017). *L. monocytogenes*'in nar suyunda 50, 52 ve 54°C'deki termal inaktivasyon işlemi sonunda, aside adapte ve adapte olmayan mikroorganizmaların *D*-değerlerinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde, asit adaptasyonunun, *L. monocytogenes*'in elma, portakal ve beyaz üzüm suyundaki 56, 60 ve 62°C'deki termal direncini artırdığı rapor edilmiştir (Mazotta, 2001). Tam tersi bir şekilde, asit adaptasyonunun bazı *L. monocytogenes* suşlarının portakal, kavun ve karpuz suyunda ısıl direnci düşürdüğü de tespit edilmiştir (Sharma ve ark., 2005; Topalcengiz ve Danyluk, 2017). *L. monocytogenes*'in zamana karşı popülasyonun azalması grafiksel olarak Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 3 A) *E. coli* O157:H7, B) jenerik *E. coli*, C) *S. Typhimurium* ve D) *L. monocytogenes* suşlarının z-değerleri tahmin etmek için kullanılan lineer regresyon doğruları. (■) Aside adapte olan, (◆) Aside adapte olmayan (n = 6).

Figure 3 Linear regression lines of A) *E. coli* O157:H7, B) generic *E. coli*, C) *S. Typhimurium*, and D) *L. monocytogenes* strains to estimate z-value. (■) Acid adapted, (◆) Non-adapted.

Jenerik *Escherichia coli* ve Bütün Mikroorganizmaların Karşılaştırılması

50, 52, 54°C'de aside adapte olmayan jenerik *E. coli*'nin D-değerleri sırası ile 7,08±0,43; 4,77±0,17 ve 2,67±0,13 dk olarak hesaplanmıştır. Aside adapte olan jenerik *E. coli*'nin 50, 52, 54°C'de nar suyu için hesaplanan D-değerleri ise sırası ile 2,86±0,20; 1,83±0,26 ve 1,14±0,11 dk olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Aynı şekilde jenerik *E. coli*'nin nar suyunda 50, 52 ve 54°C'deki termal inaktivasyon işlemi sonunda, aside adapte ve adapte olmayan mikroorganizmaların D-değerlerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). 50°C'de uygulanan ısı işlemde aside adapte olmayan *E. coli* O157:H7 ve jenerik *E. coli* D-değerlerinde meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Aside adapte *E. coli* O157:H7 ve jenerik *E. coli*'nin D-değerlerinde meydana gelen değişim ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (P>0,05). 52 ve 54°C'de uygulanan ısı işlemde hem aside adapte hem de aside adapte olmayan *E. coli* O157:H7 ve jenerik *E. coli*'nin D-değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Jenerik *E. coli*'nin zamana karşı popülasyonunun azalması grafiksel olarak Şekil 2'de gösterilmiştir.

En yüksek z-değeri 29,3 ile aside adapte *L. monocytogenes*'te, en düşük z- değeri ise *S. Typhimurium*'da 5,3 olarak ölçülmüştür. Hesaplanan z-değerleri Çizelge 3'te gösterilmektedir. *L. monocytogenes* test edilen diğer mikroorganizmalara göre nar suyu içinde termal uygulamaya daha fazla dayanıklılık göstermiştir. Bu sonuçlar daha önce tespit edilen verilerle uyumludur (Enache ve ark., 2006; Mazzotta, 2001; Topalcengiz ve Danyluk, 2017). 50°C'de uygulanan ısı işlem sonucunda aside adapte olmayan *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in jenerik *E. coli* ve *S. Typhimurium*'un D-değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). 50°C'de, aside adapte olan *E. coli*

O157:H7'in D-değeri, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*'ten istatistiksel olarak farklıdır (P<0,05). 52°C'de uygulanan termal işlem sonucunda aside adapte olan ve olmayan *E. coli* O157:H7, jenerik *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* arasındaki D-değerleri farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). 54°C'de uygulanan termal işlem sonucunda ise aside adapte ve aside adapte olmayan *E. coli* O157:H7, jenerik *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*'in D-değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Mak ve ark. (2001) tarafından da belirtildiği gibi, jenerik *E. coli* (ATCC 35218) proses çalışmalarında *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* için indikatör mikroorganizma olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Sonuç

Glukoz eklenmiş besiyerlerinin pH'sı başarılı bir şekilde bütün test edilen mikroorganizmalar için asit adaptasyonunun gerçekleşebileceği orta derece asitlik derecesine ulaşmıştır. Önceki çalışmaların aksine, tüm asit adapte edilmiş *E. coli* O157:H7, jenerik *E. coli*, *Salmonella* suşlarının, nar suyundaki aside adapte olmayan hücrelerle karşılaştırıldığında daha düşük ısı direncine sahip olduğu belirlenmiştir. Yalnızca *L. monocytogenes* asit adaptasyonu sonucu bütün sıcaklıklarda nar suyu içindeki ısıya karşı olan direncini artırmıştır. Ancak, daha fazla suşla teyit edilmesi gerekmektedir. Genel olarak nar suyu daha etkili antimikrobiyal özelliklere sahip olduğundan dolayı düşük sıcaklıklarda ölümcül etki göstermiştir. Bu antimikrobiyal etkinin daha ziyade gram negatif türler olan *E. coli* ve *Salmonella enterica* üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir. Diğer meyve sularına kıyasla daha düşük sıcaklıklarda yakalanan termal inaktivasyon değerleri, nar suyunun pastörizasyonu sırasında kullanılan ısı ve enerji kullanımının azaltılabileceğine işaret etmektedir. Bu sayede endüstriyel

olarak nar suyu üretiminde daha düşük sıcaklıklarda pastörizasyon yapılırken besin değerleri daha çok korunarak gıda güvenliği güvenceye alınabilir, enerji giderleri azaltılabilir ve kârlılık artırılabilir. Fakat bu sonucun daha fazla suşun termal dirençliliğinin nar ve diğer meyve sularında belirlenerek kuvvetlendirilmesi gerekmektedir.

Teşekkür

Bu proje Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu tarafından MŞÜ-MMF-G02 proje numarası ile desteklenmiştir. Yazarlar ayrıca Kadir Halkman, İlknur Dağ, Gökhan Durmaz ve Michelle D. Danyluk'a katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür etmektedir

Kaynaklar

- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkona N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(5): 1062–1076. DOI: 10.1093/ajcn/71.5.1062
- Aviram M, Dornfeld L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 158(1): 195–198. DOI: 10.1016/S0021-9150(01)00412-9
- Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkona N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin. Nutr.* 23(3): 423–433. DOI: 10.1016/j.clnu.2003.10.002
- Buchanan RL, Edelson SG. 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11): 4009–4013. PMID: 8899990
- Cemeroğlu B, Artık N. 1990. Isıl işlem ve depolama koşullarının nar antosiyaninleri üzerine etkisi. *Gıda* 15(1): 13–19.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2014. Foodborne Outbreak Online Database (FOOD). Available from: <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. [Accessed 28 October 2014].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce: Chapter IV. Outbreaks tables. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091270.htm>. [Accessed 25 March 2016].
- Doyle ME, Mazotta AS, Wang T, Wiseman DW, Scott VN. 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 64(3): 410–429. DOI: 10.4315/0362-028X-64.3.410
- Enache E, Mathusa EC, Elliot PH, Black DG, Chen Y, Scott VN, Schaffner DW. 2011. Thermal resistance parameters for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in apple juice. *J. Food Prot.* 74(8): 1231–1237. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-488
- Danyluk MD, Goodrich-Schneider RM, Schneider KR, Harris LJ, Worobo RW. 2012. Outbreaks of foodborne disease associated with fruit and vegetables juice, 1922–2010. EDIS Document FSHN 12-04. Available from: <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/223883.pdf>. [Accessed 28 July 2018].
- Food and Drug Administration (FDA). 2001. Federal Register Final Rule – 66 FR 6137, January 19, 2001: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice. Available from: <https://www.federalregister.gov/documents/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-and-critical-control-point-haccp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and>. [Accessed 28 July 2018].
- Food and Drug Administration (FDA). 2004. Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance. Available from: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>. [Accessed 28 July 2018].
- Gabriel AA, Albura MP, Faustino KC. 2015. Thermal death times of acid habituated *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in selected fruit beverages. *Food Control*, 55, 236–241. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.03.002.
- Gabriel AA, Nakano H. 2011. Effects of culture conditions on the subsequent heat inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple juice. *Food Control* 22(8): 1456–1460. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.03.011
- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB). 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde. Available from: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>. [Accessed 28 July 2018].
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48(10): 4581–4589. DOI: 10.1021/jf000404a
- Haberbeck LU, Wang X, Michiels C, Devlieghere F, Uyttendaele M, Geeraerd AH. 2017. Cross-protection between controlled acid-adaptation and thermal inactivation for 48 *Escherichia coli* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 206–214. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.006.
- Ingham SC, Uljas HE. 1998. Prior storage conditions influence the destruction of *Escherichia coli* O157:H7 during heating of apple cider and juice. *J. Food Prot.* 61(4): 390–394. DOI: 10.4315/0362-028X-61.4.390
- Jayaprakasha GK, Negi PS, Jena BS. 2006. Antimicrobial activities of pomegranate. In: *Pomegranates, Ancient roots to Modern Medicine*. Seeram P, Schulman RN, Heber D. (Eds.). Taylor & Francis Group LLC, CRC press, Boca Raton FL, pp. 167–177. ISBN 9780849398124
- Karabiyikli Ş, Değirmenci H, Karapınar M. 2014. Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Sci. Technol.* 55 (2): 421–425. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.10.037.
- Mak PP, Ingham BH, Ingham SC. 2001. Validation of apple cider pasteurization treatments against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 64(11): 1679–1689. DOI: 10.4315/0362-028X-64.11.1679
- Mazzotta AS. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J. Food Prot.* 64(3): 315–320. DOI: 10.4315/0362-028X-64.3.315
- Ryu JH, Beucha LR. 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 45(3): 185–193. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00165-2
- Ryu JH, Deng Y, Beuchat LR. 1999. Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. *J. Food Prot.* 62(5): 451–455. DOI: 10.4315/0362-028X-62.5.451

- Saxena AK, Manan JK, Berry SK. 1987. Pomegranates: Post-harvest technology, chemistry & processing. Indian Food Packer 4: 43–60.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D. 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. J. Agric. Food Chem. 56(4): 1415–1422. DOI: 10.1021/jf073035s
- Sharma M, Adler BB, Harrison MD, Beuchat LR. 2005. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. Lett. Appl. Microbiol. 41(6): 448–453. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01797.x
- Splittstoesser DF, McLellan MR, Churey JJ. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. J. Food Prot. 59(3), 226–229. DOI: 10.4315/0362-028X-59.3.226
- Topalcengiz Z, Danyluk MD. 2017. Thermal inactivation responses of acid adapted and non-adapted stationary phase Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in orange juice. Food Control 72: 73–82. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.07.014
- Topalcengiz Z. 2019. Assessment of Recommended Thermal Inactivation Parameters for Fruit Juices. LWT-Food Sci. Technol. (In Press).
- Vojdani JD, Beuchat LR, Tauxe RV. 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. J. Food Prot. 71(2): 356–364. DOI: 10.4315/0362-028X-71.2.356
- Usaga J, Worobo RW, Padilla-Zakour OI. 2014. Effect of acid adaptation and acid shock on thermal tolerance and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and O111 in apple juice. J. Food Prot. 77(10): 1656–1663. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-126
- Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. 2014. Potent health effects of pomegranate. Adv. Biomed. Res. 3:100. DOI: 10.4103/2277-9175.129371.