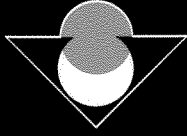


2004-294



TÜBİTAK

**TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**  
**THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY**

**TARP**

**TÜRKİYE TARIMSAL ARAŞTIRMA PROJESİ**

**Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu**  
**Agriculture Forestry and Food Technologies Research**  
**Grant Committee**



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**

**THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY**

PROJE NO: TARİP-2537

**YÜKSEK HİDROSTATİK BASINÇ UYGULAMASI  
İLE MEYVE SULARINDA  
MİKROORGANİZMALARIN VE ENZİMLERİN  
İNAKTİVASYONU**

2004-294

Prof. Dr. AYRUS DAVINDIRLI

Prof. Dr. MİRZALİHAN HIZAL

**Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri  
Araştırma Grubu**

**Agriculture, Forestry and Food Technologies Research Grant  
Committee**

**YÜKSEK HİDROSTATİK BASINÇ UYGULAMASI İLE  
MEYVE SULARINDA MİKROORGANİZMALARIN VE  
ENZİMLERİN İNAKTİVASYONU**

**PROJE NO:TARP-2537**

Prof..Dr. ALEV BAYINDIRLI

Prof.Dr. MİRZAHAN HIZAL

Yrd.Doç.Dr. HAMİ ALPAS

S-1-44  
R-59  
O-T-i

**Mart 2004**

**Ankara**

## ÖNSÖZ

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu tarafından desteklenen bu projede, yüksek hidrostatik basınç sisteminin tasarımı yapılmış, kurulmuş ve bu sistemde örnek meyve sularında seçilmiş patojenlerin ve enzimlerin inaktivasyonu çalışılmıştır.

## **TEŞEKKÜR**

Proje grubu olarak TÜBİTAK, Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubuna ve Yürütme Komitesi Sekreterliğine, projemizi desteklemelerinden dolayı teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

### PROJE GRUBU

ÖNSÖZ

TEŞEKKÜR

### Proje Yürütücüsü:

İÇİNDEKİLER

**Prof. Dr. Alev Bayındırlı**, Gıda Mühendisliği Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi,

SEKTÖRLER

Ankara

ABNVR VİZE

İçerik

1.1 Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Programı

**Araştırmacılar:** 1.2 Hidrolik sistemlerin araştırılması ve geliştirilmesi (Ankara, Orta

1.3 Yüksek hidrostatik basınçlı enzimler teknolojisi (Ankara)

**Prof. Dr. Mirzahan Hızal**, Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü, Orta Doğu Teknik

Üniversitesi, Ankara

2.1 Hidrolik birim

2.2 Yüksek basınç sistemi

2.3 Kontrol birimi

**Yrd. Doç. Dr. Hami Alpas**, Gıda Mühendisliği Bölümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi,

1. Mevsim ve Yarımlar

Ankara

1.1 İklim ve toprak

1.2 Mevsim ve toprak basınç ortamı

1.3 İklim ve toprak

1.4 İklim ve toprak basınç ortamı

1.5 İklim ve toprak basınç ortamı

1.6 İklim ve toprak basınç ortamı

1.7 İklim ve toprak basınç ortamı

1.8 İklim ve toprak basınç ortamı

1.9 İklim ve toprak

1.10 İklim ve toprak basınç ortamı

1.11 İklim ve toprak

1.12 İklim ve toprak basınç ortamı

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖNSÖZ.....	1
TEŞEKKÜR .....	2
PROJE GRUBU .....	3
İÇİNDEKİLER.....	4
TABLolar.....	5
ŞEKİLLER.....	6
ÖZ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. Giriş .....	9
1.1. Yüksek hidrostatik basınç uygulaması .....	10
1.2. Yüksek hidrostatik basıncın mikroorganizmalar üzerindeki etkisi .....	11
1.3. Yüksek hidrostatik basıncın enzimler üzerindeki etkisi .....	13
1.4. Araştırmanın amacı .....	15
2. Tasarlanan ve Kurulan Yüksek Sıvı Basınç Sistemi .....	15
2.1 Hidrolik birim.....	16
2.2.Yüksek basınç sistemi .....	16
2.3.Kontrol birimi .....	17
3. Materyal ve Yöntemler .....	23
3.1 Meyve suları .....	23
3.2 Bakteri suşları .....	23
3.3. Meyve sularının basınçlanması .....	24
3.4. Koloni sayımı .....	24
3.5. Polifenol oksidaz aktivitesi ölçümü .....	25
3.6. Pektin esterase aktivitesinin ölçümü .....	25
3.7. Elma suyunda kararma değişiminin belirlenmesi .....	26
3.8. Portakal suyunda bulanıklık kaybının belirlenmesi .....	26
4. Bulgular ve Değerlendirme .....	27
5. Sonuç.....	35
6. Proje kapsamında yapılan yayın ve tebliğ.....	37
Referanslar .....	38
Bibliyografik bilgi formu .....	45

## TABLolar

	Sayfa no
Tablo 1. YHB (250 MPa) ve ısıl işlem (30°C) kombinasyonunun seçilmiş meyve sularındaki patojenler üzerine etkisi .....	28
Tablo 2. Farklı sıcaklıklarda 5 dakikaluk YHB (350 MPa) işleminin seçilmiş meyve sularındaki patojenler üzerine etkisi .....	28
Tablo 3. Polifenol oksidaz enziminin elma suyunda inaktivasyon kinetiği sabitleri.....	32
Tablo 4. 25°C de 2 saat tutulmuş elma suyunda kararmanın derecesi.....	33
Tablo 5. Portakal suyunda (pH =3.76) PE aktivitesine basınç-sıcaklık kombinasyonunun etkisi.....	34
Tablo 6. Farklı saklama koşullarında tutulan işlem görmüş portakal suyundaki bulanıklık kaybı .....	35



## ŞEKİLLER

	Sayfa no
Şekil 1. Yüksek hidrostatik basınç sistem şeması .....	19
Şekil 2. Yüksek basınçlı test hücresi şeması .....	20
Şekil 3. Yüksek basınç sistemi kontrol şeması .....	21
Şekil 4. Yüksek hidrostatik basınç sisteminin resmi .....	22
Şekil 5. İşlem görmemiş Amasya elma suyunda polifenol oksidaz aktivitesinin 25°C deki değişimi .....	30
Şekil 6. 450 MPa'da işlenmiş elma suyunda kalan PPO aktivitesi .....	31
Şekil 7. 40°C 'de işlenmiş elma suyunda kalan PPO aktivitesi .....	32

## ÖZET

Bu çalışmada gıdaların işlenmesinde kullanılabilir yüksek sıvı basınç sistemi tasarlanmış ve kurulmuştur. Bu sistemde ısı ile beraber yüksek sıvı basıncının elma, portakal, kayısı ve vişne suyunda seçilmiş patojenlerden *Staphylococcus aureus* 485, *Listeria monocytogenes* CA, *Escherichia coli* O157:H7 933 ve *Salmonella enteritidis* FDA'nın inaktivasyon koşulları belirlenmiştir. Ayrıca elma suyunda polifenol oksidaz ve portakal suyunda pektin esteraz enzimlerinin yüksek sıvı basınç sistemi ile etkisiz hale getirilmesi de araştırılmıştır. Mikroorganizmalar 350 MPa ve 40°C kombinasyonu ile 5 dakika içinde tamamen etkisiz hale getirilmiştir. Elma suyunda kalan polifenol oksidaz enzim aktivitesi 450 MPa ve 50°C de 60 dakika sonunda %  $9 \pm 2.25$  olarak belirlenmiştir. Portakal suyunda aynı basınç ve sıcaklık kombinasyonu 30 dakikada pektin esteraz aktivitesini %  $7 \pm 1.56$  ya indirmiştir. Kalan enzim aktivitelerinin nedeni yüksek basınca dayanıklı olan izoenzimlerdir. Enzimlerin inaktivasyonu geri dönüşümsüzdür ve saklama sırasında herhangi bir aktivite kazanımı tespit edilmemiştir. 400 MPa'dan daha yüksek basınçlar 50 °C yi geçmeyecek ısı ile kombine edildiğinde enzim inaktivasyonu daha da hızlı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Yüksek hidrostatik basınç, gıda patojenleri, enzim, meyve suyu

## ABSTRACT

This study is related to design and construct a high hydrostatic pressure system for food processing and to find the conditions for the inactivation of *Staphylococcus aureus* 485, *Listeria monocytogenes* CA, *Escherichia coli* O157:H7 933 ve *Salmonella enteritidis* FDA in apple, orange, apricot and sour cherry juices by high hydrostatic pressure with a mild heat treatment. The effectiveness of the treatment on polyphenol oxidase activity in apple juice and pectin esterase activity in orange juice were also determined. Microorganisms were completely inactivated at 350 MPa and 40°C in 5 min. The residual polyphenol oxidase activity in apple juice after treatment at 450 MPa and 50°C for 60 min was obtained as  $9 \pm 2.25\%$ . The residual pectin esterase activity in orange juice after treatment at 450 MPa and 50°C for 30 min was determined as approximately  $7 \pm 1.56\%$ . Pressure resistant isoenzymes were thought to be responsible for the final residual activity. The inactivation is irreversible and the enzyme is not reactivated upon storage. Pressures higher than 400 MPa can be combined with mild heat (<50 °C) to accelerate enzyme inactivation.

**Key words:** high hydrostatic pressure, food pathogens, enzyme, fruit juice

## 1. GİRİŞ

Günümüzde kişiler sağlıklarına daha fazla önem vermekte ve sert üretim işlemlerinden geçmiş ya da gıda-dışı kimyasallar katılarak üretilmiş ürünlerin tüketiminde daha bilinçli davranmaktadırlar. Sert teknikler veya kimyasallar kullanılarak üretilmiş gıdalar yerine besin değeri yüksek ve doğal olan gıdaların tüketimi artmaktadır. Günümüzde gıdaların korunumunda kullanılan metotlar, birçok dezavantajlar taşımaktadır. Konserve gıdaların üretiminde kullanılan yüksek ısı ve katkı maddeleri, ısıya hassas vitaminleri bozmakta ve gıdaların doğal rengini, yapısını ve kokusunu olumsuz olarak etkilemektedir. Düşük ısı işlem uygulanmış pastörize gıdalar ise hem buzdolabı sıcaklığında saklanmayı gerektirir, hem de sınırlı raf ömrüne sahiptirler. Kurutma ve dondurma ise ürünün besin ve kabul kalitesini azaltmaktadır. Kullanılan kimyasal koruyucuların büyük bir kısmı ise gıda-dışı kökene sahiptir ve kullanılabilirlikleri sınırlıdır. Son yıllarda, gıda maddelerinin uzun süre dayanıklı ve mikrobiyolojik açıdan güvenli olarak üretiminde kullanılmakta olan yöntemlerin geliştirilmesi ve yeni işleme yöntemlerinin araştırılması son derece önemli hale gelmiştir. Isıl işlemlerin yerini alabilecek elektrik ve manyetik alan, mikrodalga enerji, ışık sinyalleri, süperkritik karbondioksit uygulamaları gibi tekniklerin yanında gündemde olan bir diğer teknikte yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulamalarıdır. Bu yeni işlem ve teknikler arasında YHB uygulamaları büyük bir ilgi görmüş ve kısa zamanda uluslararası araştırma ve geliştirme çalışmalarının sonucu olarak da gelişmiş ülkelerde tüketicilere bu teknikle üretilmiş yeni ürünler sunulmaya başlanmıştır. Gıdalar üzerine yapılan uygulamalarda, bu tekniğin raf ömrünün uzatılmasında ısıl işlemler kadar etkili olduğunu ve ayrıca besin değeri yüksek, duyu kalitesi ve tekstürü açısından daha iyi, raf ömrü uzun, güvenli gıdalar üretebilmenin mümkün olduğunu göstermiştir.

### 1.1. Yüksek Hidrostatik Basınç Uygulaması

YHB uygulamaları insan sağlığına ve gıdanın bozulmasına etki eden mikroorganizmaların ve de ayrıca kaliteyi etkileyebilecek enzimlerin inaktivasyonu için kullanılabilir bir tekniktir. Bu nedenlerle bu konu ile ilgili araştırmalar tüm dünyada hızla devam etmektedir. Bu teknik hem katı hem de sıvı gıdalara uygulanabilir. YHB uygulamalarında gıda maddesi sabit bir basınca (100-900 MPa) tabi tutulmakta ve işlem sonrasında biçimini, ölçütünü, renk, koku, tad ve besleyici içeriğini muhafaza etmektedir.

Bu metot, et ve balık ürünleri, sıvı yumurta, reçel ve meyve suyu gibi çeşitli gıdalarda başarıyla uygulanmıştır. Yüksek basıncın gıda endüstrisi için bugün kullanılmakta olan uygulamalarına şu örnekler verilebilir: reçel, meyve püresi, meyve jölesi, yoğurt (işlem şartları : 400MPa, 10-30 dak., 20°C; Firma: Meidi-ya), meyve suyu (işlem şartları : 120-400 MPa, 2-20 dak.,20°C; Firma: Pokka Corp.), dondurulmuş tropik meyveler (işlem şartları : 50-200 MPa, 10-30 dak., Firma: Nishin Oil Mills), dana eti (işlem şartları : 100-150MPa, 20°C, 30-40 dak.; Firma:Fuji Cku Mutterham). Yüksek basıncın sanayi uygulamalarındaki bu gelişmelerin paralelinde özellikle bu işlemin gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalar ve enzimler üzerine etkileri ile farklı gıda ürünlerinin üretiminde bu tekniğin kullanılması konularında araştırmalar devam etmektedir. Araştırmalar enzim ve/veya mikroorganizmaların model sistemler ya da direk gıda içerisindeki inaktivasyonu ile ilgilidir (Farr, 1990; Hayashi, R. 1992; Cheftel, 1992 ve 1995; Garcia-Graells ve ark., 1998; Hoover ve ark.,1989; Metrick ve ark 1989; Suziki ve ark 1992; Lechowic, 1993; Mertens ve Deplace, 1993; Kalchayanand ve ark.,1998; Gomes ve Ledward,1996; Seyderhelm ve ark.,1996; Basak ve Ramaswamy,1996; Cano ve ark.,1997; Ogawa ve ark.,1990; Ogawa ve ark.,1992; Cano ve 1997; Goodner ve ark., 1998; Alpas ve ark.,1999; Alpas ve ark.,2000; Alpas ve Bozoğlu, 2000). Çalışmalarda yüksek basıncın enzim veya mikroorganizma üzerine

etkisini görmek için uygulanan basınç (0-900 MPa), süre (0-60 dak), pH ve düşük sıcaklık (20-50 °C) değişken olarak alınmaktadır.

Genelde suyun kullanıldığı basınç ileten bir ortamda yapılan bu işlem, daha önce kullanılan ve ısıya dayalı işlemlerdeki enerji gereksinimini çok aza indirmektedir. YHB çevre dostu, minimum sanitasyona ihtiyacı olan ve antimikrobiyal etkisi ani olan bir işlemdir (Knorr, 1993). Diğer bir avantajı da gıda maddelerinin her yanına homojen olarak etkisi olması ve bu anlamda gıda maddesinin her kısmının eşit işlem görmesidir.

YHB ile yapılabilecek işlemlere, mikroorganizmaların inaktivasyonu yanında biopolimer modifikasyonu, protein denaturasyonu (Heremans, 1982), enzim inaktivasyonu ve aktivasyonu (Morild, 1981), jel formasyonu (Cheftel, 1992), parçalanma (Okamoto, 1991), ekstraksiyon (Kurubayashi ve Hayashi, 1991) ve ürün fonksiyonlarının geliştirilmesi (Farr, 1990; Deuchi ve Hayashi, 1991) örnek olarak verilebilir.

Sistemin avantajları yanında kendine has dezavantajları da bulunmaktadır. Bakteri, küf ve mayaların oda sıcaklığında düşük basınçlarda inaktive edilmelerine karşın bakteri sporlarının ve enzimlerin inaktivasyonu için daha yüksek basınçlar gerekmektedir. Çok yüksek basınçlara çıkılan sistemler ise hem pahalı hem de metal yorulmasına bağlı olarak daha sık bozulabilmektedir ki bu da endüstriyel açıdan bir problemdir.

## **1.2. Yüksek hidrostatik basıncın mikroorganizmalar üzerindeki etkisi**

Patojen ve bozunuma yolaçan bakterilerle ve mayalarla yapılmış çalışmalar bu metodun mikrobik hücreleri etkisiz hale getirmede gayet başarılı olduğunu ortaya koymuştur (Hoover ve ark., 1989; Cheftel 1995; Knorr 1993; Smelt 1998). Uygulanan basınç ve süre etkisinin yanında, mikroorganizmanın türü ve suşu, spor veya vejetatif formda olması, ortamın birleşimi, pH ve sıcaklık faktörleri önemlidir (Isaacs & Chilton 1995; Patterson ve ark. 1995;

Hauben ve ark. 1997, Alpas ve ark. 1999, Benito ve ark. 1999). YHB mikroorganizmanın ribozomlarını, metabolik aktivitesini, biyokimyasal aktivitesini ve hücre duvar yapısını etkilemektedir. Bu etki mikroorganizmanın fizyolojik durumuna göre değişiklik göstermektedir. Buna göre ön logaritmik büyüme fazında olan hücreler, durgun fazdaki hücrelere göre daha çok etkilenmekte, yine G (-)'ler G (+)'lere göre basınçtan daha çok etkilenmekte fakat spor yapıları dayanıklılık göstermektedir (Cheftel, 1995; Hauben ve ark. 1996, Kalchayanve ve ark., 1998; Alpas ve ark., 1999). Basınçlanan gıda maddesinin kompozisyonu içinde bulundurduğu mikroorganizmanın basınca karşı dayanıklılığını azaltmakta veya çoğaltmaktadır. Düşük pH'lar basıncın etkisini artırırken, yağ ve proteinlerin mikroorganizmaları basınca karşı koruyucu faktör olarak ortaya çıktıkları gözlenmiştir (Mackey ve ark., 1995; Stewart ve ark., 1997). DNA bulundurduğu çok sayıdaki hidrojen bağı ve heliks yapısı ile basınca dayanıklılık gösterirken ribozomların basınçtan daha fazla etkilendikleri bulunmuştur. Ribozomların denatürasyonu protein sentezini önlediği için bazı mikroorganizmalar yaşama ve çoğalma olanaklarını bulamamaktadır (Alpas ve ark., 2003). Hücre zarı, sitoplazma ile hücre duvarı arasında geçirgenlik özelliği taşıyan önemli bir işleve sahiptir. Bu zarın zarar görmesi hücre için ölümcül bir önem taşımaktadır. Hücre zarı fosfolipid ve protein yapısında olduğu ve hidrojen bağları ile hidrofobik ve hidrofilik bağlara sahip olma nedeni ile basınçtan kolayca etkilenmektedir (Chong ve Kossins, 1988). Bu yapının 300 MPa'a kadar fazla etkilenmediğini fakat daha yüksek basınçlarda ise fiziksel bir bozulmanın olduğu gözlenmiştir.

Mikroorganizmalar yapılan işlemler sırasında tekrar aktive olabilecek şekilde yaralanabilirler. Yapılan işlem sonucun yaralanan mikroorganizmalar seçici ortamlarda büyüyemedikleri için ölü olarak kabul edilirler. Özellikle düşük asitli veya diğer koruyucu elemanların bulunmadığı

gıdalarda bu tür yaralı mikroorganizmaların yaralarını düzelterek aktif hale gelmeleri ve risk yaratmaları mümkündür. HHP çalışmaları bu tür yaralanmaların olduğunu göstermektedir (Alpas ve ark., 2000, Alpas ve Bozoglu, 2002). Yapılan çalışmalarda özellikle süt gibi düşük asitli ürünlerde bu tür yaralanmış patojenlerin yol açacakları risklere değinilmektedir. Bu tür yaralanmalar mikrobiyel yapıda yapısal ve metabolik yaralanmalar olarak ortaya çıkmaktadır. Genellikle hayvansal ürünlerin tüketimine bağlı olan gıda zehirlenmesi vakaları olsada, asitli gıdaların tüketimine bağlı gıda zehirlenmeleri de rapor edilmiştir (Arnold ve Kaspar 1995; Erickson ve ark. 1995; McCarthy 1996; Cody ve ark. 1999). Örneğin *Escherichia coli* O157:H7 asitli gıdalarda uzun süre yaşayabilmektedir. (Garlant Miller ve ark, 1994; Miller ve Kaspar 1994; Weagant ve ark. 1994; Conner ve ark.,1997). Gene yapılan çalışmalar göstermektedir ki bakterilerin basınca karşı gösterdikleri içinde buldukları ortama bağlıdır. Tampon çözeltisi veya sıvı ortamda büyütülen bakterilerden elde edilecek sonuçlar gerçek gıda ortamında basınca karşı gösterilecek direnç ile aynı değildir. Ayrıca yapılan çalışmalarda genellikle en dayanıklı suşun seçilmesi gıda güvenirliliği açısından önemlidir (Ray ve ark. 2001). Literatürde, farklı meyve sularında *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella*'nın inaktive edilmesi için sıcaklık ve basıncın beraber kullanımının uygunluğu rapor edilmiştir (Linton ve ark. 1999; Jordan ve ark. 2001; Teo ve ark. 2001).

### **1.3. Yüksek hidrostatik basıncın enzimler üzerindeki etkisi**

Gıdalara uygulanan ısı işlemlerin çoğu mikroorganizmaların ortadan kaldırmayı hedeflemekle birlikte, bu işlemlerin gıdalarda bozunmaya neden olacak ve kaliteyi etkileyecek enzimlerin inaktivasyonunu sağlamasında çok önemlidir. Isıl işlemlere alternatif olacak yeni teknolojilerin geliştirilmesinde bu konuya çok dikkat edilmektedir.

YHB ile enzimin geridönüşümsüz inaktivasyonu, enzimin tipine ve yapısına, pH, basınç,



sıcaklık ve ortamda bulunan diğer bileşenlerin cinsine ve derişimine bağıdır. Enzim inaktivasyonunun nedeni hidrojen ve hidrofobik bağların bozulmasıdır. Genel olarak, sıcaklığa bağı olarak 300 MPa dan daha yüksek basınçlar geridönüşümsüz enzim inaktivasyonuna neden olur. Yüksek basınç uygulamalarının enzim yapısını dönüşümsüz olarak bozmak suretiyle inaktivasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir. Model sistemlerde (0,1 - 900 MPa, 20-60°C, pH 3-7, süre 2-60 dak) çalışılan enzimler dayanıklılıklarına göre en azdan en fazlaya doğru; lipoksigenaz, pektin esteraz, lipaz, posfotaz, katalaz, polifenol oksidaz ve peroksidaz olarak sıralanmaktadır (Seyderhelm ve ark., 1996).

Polifenol oksidaz (PPO) meyve sularında enzimik esmerleşmeye neden olan enzimdir. Enzimatik esmerleşme fenollerin oksitlenerek kinonlara dönüşmesiyle başlar. Elmadan yarı saflaştırılmış PPO oda sıcaklığında ve pH'ının 6-7 olduğu durumda 600 MPa üzerindeki basınçlarda inaktive olur (Weemaes ve ark., 1998). Gomes ve Ledward'ın (1996) çalışmasına göre, benzer koşullarda işleme tabi tutulmuş elma dilimlerinin uzun saklama süresince hafif bir esmerleşme gösterdikleri belirlenmiştir. YHB düşük ısı ile birleştirilirse meyve dilimlerinde, pürelerinde ve sularında bu enzim aktivitesi tamamen durdurulabilir (Cano ve ark. 1997; Castellari ve ark. 1997; Lopez-Malo 1998).

Pektin esteraz (PE) narenciye sularında bulanıklık kaybına neden olur. Bulanıklık kaybı pektinin metal ester gruplarının hidrolize olması ve kalsiyum ile jelimsi bir yapı oluşturması sonucunda gerçekleşir. PE'nin inaktivasyonu narenciye sularının pastörize edilmesinde indikatör olarak kullanılır. Çünkü bu enzim ısıya bulunması muhtemel mikroorganizmalardan daha dayanıklıdır. Pastörize amaçlı, narenciye suları yaklaşık 90°C de 30-60 saniye tutulur. Yapılan çalışmalar YHB'nın narenciye sularında bu ısı ile işlem yerine kullanılabilceğini göstermiştir (Basak ve Ramaswamy, 1996; Goodner ve ark. 1998; Goodner ve ark. 1999; Nienaber ve Shellhammer 2001a; Nienaber ve Shellhammer 2001b; Ogawa ve ark. 1990;

Ogawa ve ark. 1992; Van den Broeck ve ark., 2000). Yeterli bir inaktivasyon için oda sıcaklığında 600 MPa üzerine çıkılması gerekmektedir. Literatür incelendiğinde sıvı gıda sistemlerinden üzerinde en çok durulan ve bilgi birikimi olan meyve suları portakal ve greylfurt suyudur.

#### **1.4. Araştırmanın amacı**

Bu projede yüksek hidrostatik basınç sistemi proje ekibi tarafından tasarlanmış ve kurulmuştur. Kurulan sistem sıvı gıdalar için kullanılabileceği gibi araştırma amaçlı olarak paketlenmiş katı gıda maddelerinin işlenmesi içinde uygundur. Bu sistemde, düşük ısı işlem ve basınç kombinasyonunun, elma, kayısı, şeftali, vişne, ve portakal sularında *Staphylococcus aureus* 485, *Listeria monocytogenes* CA *Escherichia coli* O157:H7 933 ve *Salmonella enteritidis* FDA üzerine etkisi çalışılmıştır. Ayrıca elma suyunda PPO, portakal suyundada PE enzimlerinin inaktivasyonu incelenmiştir.

## **2. TASARLANAN VE KURULAN YÜKSEK SIVI BASINÇ SİSTEMİ**

Sistem, hidrolik birim, yüksek basınç sistemi ve kontrol birimi olmak üzere başlıca üç ana birimden oluşmaktadır (Şekil 1). Elektrik motorlu bir hidrolik pompa aracılığı ile elde edilen basınçlı yağ valfler kullanılarak bir itici silindire gönderilmektedir. Böylece, silindirde oluşan itme kuvveti bir yüksek basınç hücresindeki suyu ve bunun içerisine yerleştirilen numuneleri çok yüksek basınçlarda sıkıştırmaktadır. Bu sistemde, elde edilen yüksek basınç, sistemin sızdırmazlığına, hücre içerisinde herhangi bir gaz ortamının bulunmamasına ve mekanik yapının esnemez olmasına bağlıdır. Sistemin kumandası, basınç ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelerin ölçümü ve test sürecinin zamanlaması amacıyla bir kontrol birimi yapılmıştır.

## 2.1 Hidrolik birim

Bu sistem 2.2 kW gücünde 200 Barlık, 2lt/ dk debiye sahip bir elektro-hidrolik pompa, 8 Ltlik yağ deposu hidrolik valfler, kilitleme valfi ve hidrolik hortum bağlantılarından oluşmaktadır. Sistem, itici silindirin üst ve alt çıkışlarına bağlanmakta, böylece pistonun yukarı ve aşağı hareketi, dolayısıyla test hücresindeki basıncın kontrolü sağlanmaktadır. Hidrolik sistem, kontrol ve ölçme kablolarıyla kontrol birimine bağlanmaktadır. Hidrolik valfler aracılığı ile basınçlı yağ itici silindirin yukarı çıkmasını ve test hücresinde istenilen basıncın elde edilmesini sağladıktan sonra kilitleme valfi kapatılmak suretiyle basıncın düşmesi önlenmektedir.

## 2.2.Yüksek basınç sistemi

Yüksek Basınç sistemi, 200 bar, 40 Ton, 10 cm strok özelliklere sahip bir itici silindir ve buna bağlanmış olan yüksek basınçlı test hücresinden oluşmaktadır. İki kısmın bağlantısı altı adet 30 mm çelik ayak ve M16 civatalarla yapılmakta, böylece öngörülen basınçlar ve oluşan kuvvetlerde sistemin esnememesi sağlanmaktadır. İtici silindirde elde edilen max. 40 ton büyüklüğündeki kuvvet bir basınç değiştirici piston aracılığı ile test hücresinde 2 cm çapında bir yüzeye uygulanmaktadır. Bu kuvvet altında herhangi bir eğilme ve ezilme göstermemesi için basınç değiştirici piston, Special K ( yağ çeliği ) den imal edilmiş olup 55 Rockwell sertlikte ısıtılmış ve menevişlenmiştir. Böylece malzemenin hem sert hem de yeterli esneklikte olması sağlanmıştır. Bu pistonun yüzeylerinin sürtünme ve paslanmaya karşı korunması için taşlanmış, sert krom ile kaplanmış ve polisaj yapılmıştır. Gerek basınç değiştirici piston gerekse test hücresinin üst tapasında tam kapalı ve dikdörtgen kesitli özel teflon (PTEF) O- ringler kullanılmaktadır. Esnek olmaması

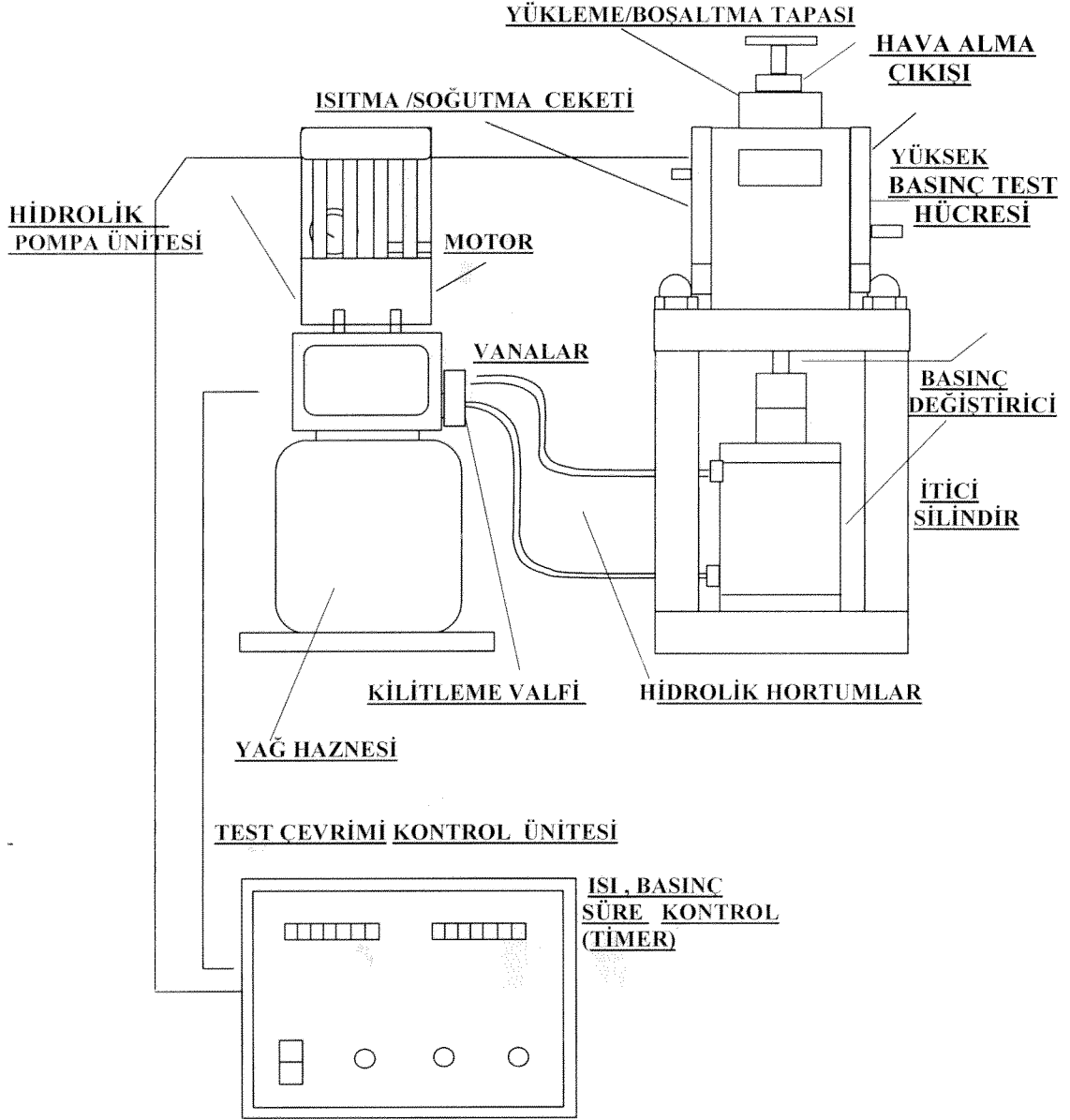
ve en ufak bir çizilme ile sızdırma eğilimi göstermesi nedeniyle bakır conta kullanımı öngörülmemiştir. Yüksek basınçlı test hücresi yaklaşık 6 cm çap ve kalınlığında ve iç deliği (Test Haznesi) 32 mm olan çelik bir silindirden oluşmaktadır. Paslanma ve çizilmeye karşı silindir iç ve dıştan krom kaplanmıştır. 40 mm lik bir flanş vasıtasıyla alttaki itici silindire bağlı bulunan test hücresi ısıtma amacıyla ikinci bir çelik silindir su ceketiyle çevrelenmiş bulunmaktadır. Bu cekete sıcak su doldurmak suretiyle test hücresinin kısa sürede etkin bir şekilde ısıtılması ve sıcaklığının kontrol edilmesi öngörülmektedir. Test Öncesi, hücre içinde istenilen basınç seviyesine çıkılması için test örneklerinin içine konulduğu ortamda (su) hava kabarcıkları ve benzeri gaz bulunmaması gereklidir. Bu nedenle test hücresinin üst tapasında özel bir hava alma musluğu bulunmaktadır. İtici silindirin ilk yukarı hareketinde bu musluk açık olacak ve sistemdeki hava bir genleşme kabı üzerinden dışarı atılacaktır. Piston aşağıya doğru hareket ederken ise hava alma musluğuna bağlı bir plastik hortumdan su emilecek ve gerekirse bu işlem tekrarlanacaktır. Hava alma işlemi tamamlandıktan sonra musluk kapatılacak ve sistem teste hazır hale gelecektir. Yüksek basınçlı test hücresinin örnek yükleme amacıyla açılıp kapatılan üst tapası paslanmaz çelik malzemeden yapılmış olup, bunun yeterli basınçta sıkılabilmesi için özel bir sıkma kolu tasarlanmıştır.

### **2.3.Kontrol birimi**

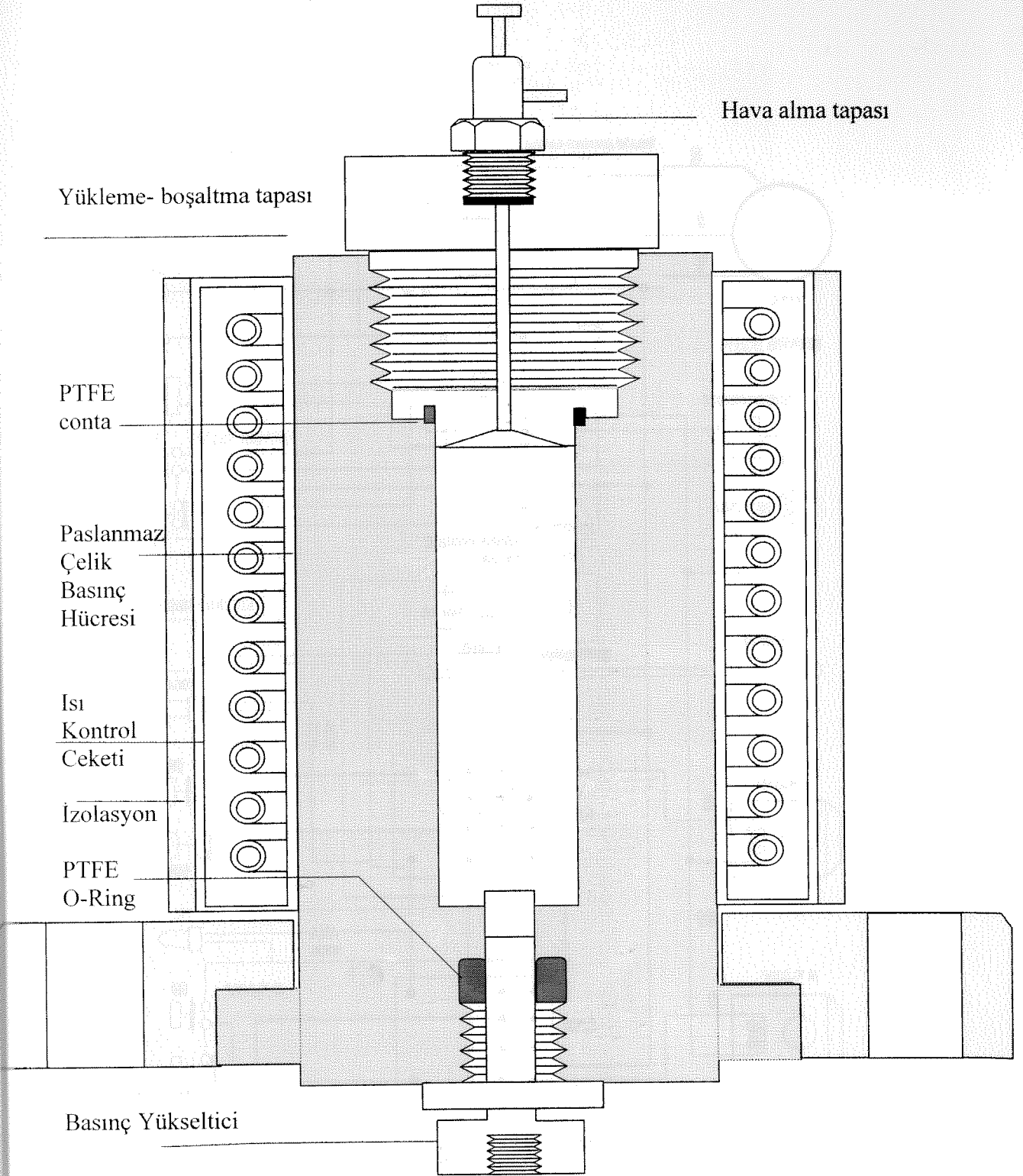
Tüm sistemin kontrol edilebilmesi, gerekli test programlarının uygulanması ve ısı, basınç gibi parametrelerin ölçülmesi amacıyla gerekli elektrik ve elektronik kontrolleri içeren bir kontrol birimi tasarlanmıştır.

Sistem ile ilgili resimler ve çizimler Şekil 1-4 de sunulmuştur. Sistemin montajı

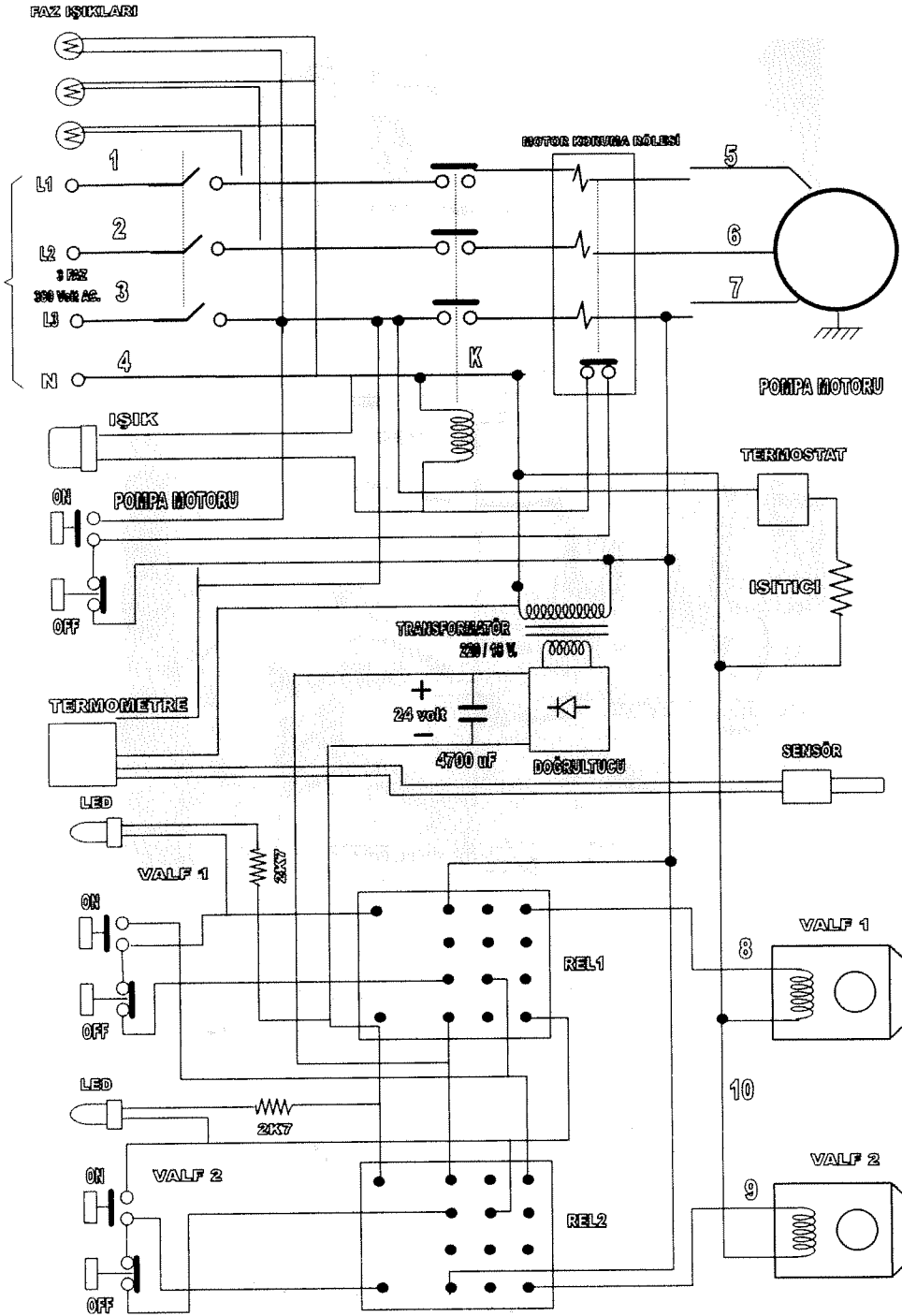
gerçekleştirildikten sonra deneme ve ayar aşamasında bazı değişiklikler yapılmıştır. Yüksek Basıncılı Test Hücresinin her iki ucunda sızdırmazlık amacıyla teflon contalar kullanılmıştır. Yüksek basınçlarda yapılan ilk denemelerde, bu contaların yerleştirildiği conta yuvalarının, silindirde yapılan ve paslanmayı önleme amacına yönelik olan kaplamanın yüzey pürüzlülüğünü arttırdığı ve bu nedenle contaların bu yüzeylere tam olarak temasını önlediği görülmüştür. Bunun sonucunda, conta dış kenarlarından bir miktar sızma olduğu gözlenmiştir. Bu durumun düzeltilmesi için test hücresinin conta yuvaları yeniden işlenmiştir. Test Hücresinin üst kısmında bulunan doldurma –boşaltma tapasının contası yeterli sertlikte olmadığı için yüksek basınçlarda esneme ve sızdırma eğilimi gösterdiğinden, daha sert bir malzemedan (poliamid) yapılan yeni bir contayla değiştirilmiştir. Doldurma–boşaltma Tapasının üzerinde bulunan hava alma vanası, paslanmaz çelik ve pirinç malzemedan oluşan bir açma–kapama sistemi ile çalıştırılmıştır. Bu sistemde, belirli sayıdaki ( $> 30$ ) açma-kapama sonucunda pirinç kısmın esnekliğini yitirmesi sonucu çatlama ve bunun sonucu olarak ta sızdırma yapması nedeniyle bu kısımda daha esnek ve çatlama yapmayan bakır bir conta kullanılması gerekmiştir. Test Silindirini çevreleyen hızlı ısıtma–soğutma ceketini genel olarak görevini yapmış olmakla birlikte, bir test çevrimi süresinde kullanılan örneklerin sıcaklığını daha etkin ve hassas bir şekilde kontrol edebilmek amacıyla, sıcak sulu ısıtma sistemine ek olarak, ceket üzerine monte edilen altı adet elektrikli ısıtıcı ve termostattan oluşan yardımcı bir ısı kontrol sistemi tasarlanmış ve gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Yüksek hidrostatik basınç sistem şeması

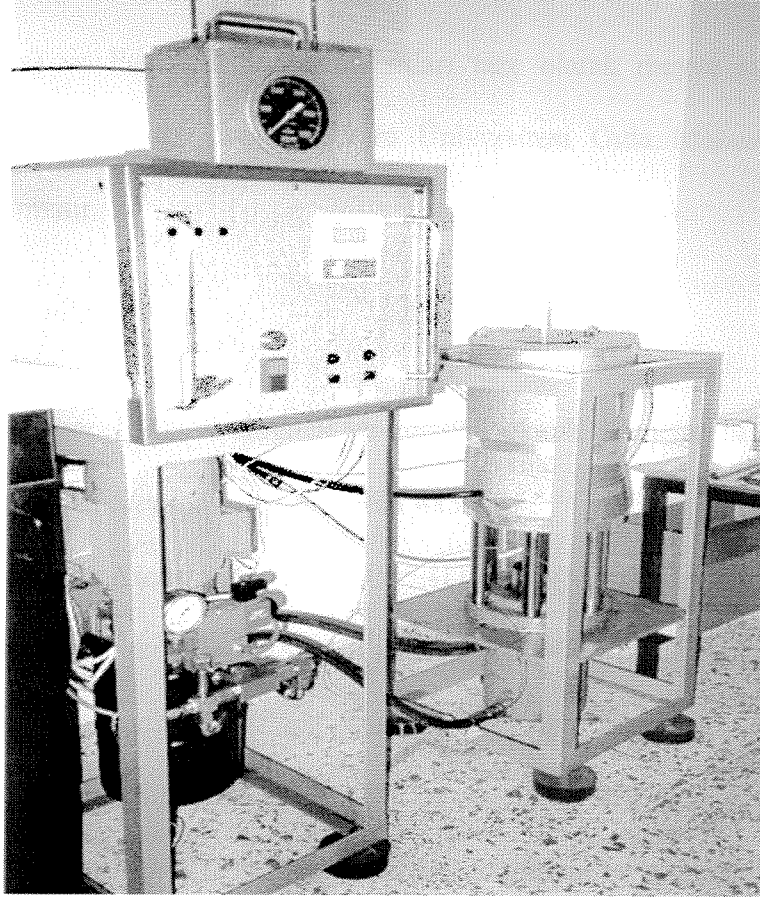


Şekil 2. Yüksek basınçlı test hücresi şeması



Şekil 3. Yüksek basınç sistemi kontrol şeması





Şekil 4. Yüksek hidrostatik basınç sisteminin resmi

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Meyve suları

Elma (Amasya) ve Portakal (Valencia) suları taze olarak meyve suyu sıkacağı ile elde edilmiştir. Kayısı ve vişne suyu Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümü pilot tesisinden alınmıştır.

#### 3.2 Bakteri suşları

YHB işlemine göreceli olarak dirençli ve göreceli olarak dirençsiz bakteri suşları (Alpas et al., 1999) arasından, *Staphylococcus aureus* 485 (from FDA Food Microbiology Laboratory, Washington, D.C.), *Escherichia coli* O157:H7 933 (M. Doyle, University of Georgia, Griffin), *Salmonella enteritidis* FDA ( US Army Food Research Laboratories, Natick, MA) ve *Listeria monocytogenes* CA (Food Microbiology lab, University of Wyoming, USA) seçilmiştir. Suşlar %0.6 maya ekstaktı ile desteklenmiş Triptikaz Soya sıvı besi yerinde (TSBM, Difco, Detroit, MI) 37°C'de 16 - 18 saat süreyle büyütülmüş ve güneşli taze sıvı besi ortamına aktarılmıştır.

Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda (Alpas et al., 1999) suşların erken durağan büyüme evrelerinde YHB işlemine daha dirençli oldukları belirtilmiştir. Bu amaçla eldeki bakteri suşlarının da erken durağan büyüme evrelerinin belirlenmesi için patojenler TSBM'de 37°C'de 12 saat boyunca büyütülmüş ve TSBM içeren 3 test tüpüne %5 düzeyinde inocule edilmişler ve 37°C'de inkübatöre konulmuşlardır. Her 2 saatte bir tüpler inkübatörden alınmış ve 600 nm dalga boyunda optik yoğunlukları ( $A_{600}$ ) spektrofotometre (UV-VIS, Shimadzu UV-1202) ile ölçülmüştür. Bu işlem her suş için 2 kere tekrarlanmış ve ortalama  $A_{600}$  değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen verilerle her suş için bir büyüme eğrisi çizilmiş ve

incelenen suşun erken durağan büyüme evresine ulaşma zamanı belirlenmiştir. Bu veri projenin ilerleyen evrelerinde patojen inoküle edilmiş meyve sularının basınçlanma işlemi için kullanılmıştır.

### **3.3. Meyve sularının basınçlanması**

Suş ekleme öncesi, meyve suları 121°C de 5 dakika tutulmuşlardır. Her suşun erken durağan büyüme evresinde olduğu belirlendikten sonra, hücreler %0.1'lik peptone (Beckon Dickinson and Co., USA) solüsyonunda seyreltilmiştir. Numuneler basınca dayanıklı ve sızdırmayan silikon ağızlı özel plastik tüplere (Simport Plastic, Canada) içlerinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde konulmuştur.

İstenilen basınca çıkarma ve basıncı atmosferik basınca indirme süresi 5-10 saniye olan sistemde, örnekler 250-450 MPa basınç ve 25-50°C sıcaklık aralığında 0-60 dakika tutulmuşlardır. Örnekler basınçlama öncesinde basınç hücresi içinde istenilen sıcaklığa çıkabilmek için 1-2 dakika tutulmuş ondan sonra sabit sıcaklıkta basınç uygulanmıştır. İşlem sonrası örnekler analizler için buz banyosunda tutulmuştur. Deneyler ve ölçümler iki kez tekrar edilmiştir.

Enzim inaktivasyonunu deneyleri için yukarıdaki işlemler ön ısıtma işlemi uygulanmadan ve patojen ilave edilmeden yapılmıştır.

### **3.4. Koloni sayımı**

Örneklerin toplam koloni miktarını belirlemek için, basınçlama işleminden önce ve sonra, steril 0.1% peptone solüsyonu kullanılarak gerekli seyreltmeler yapılmış ve maya ekstraktı (0.6 %) ile desteklenmiş Tryptic Soy katı besi yeri (TSAY, Difco, USA) kullanılarak, yüzeye yayma metodu uygulanmıştır. Petriler 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmişlerdir.

### 3.5. Polifenol oksidaz aktivitesi ölçümü

2 ml McIlvane tampon çözeltisine (pH =6.5-6.8) farklı derişimlerde olan 1 ml katekol (Sigma) çözeltisi eklenmiştir. 0.5 ml elma suyu ilavesinden sonra, ilk reaksiyon hızına göre uygun substrat çözeltisi belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre enzim aktivitesinin belirlenmesinde en uygun derişimin 0.5 M katekol olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi tayini için, 2 ml McIlvane tampon çözeltisine (pH =6.5-6.8), 1 ml 0.5 M katekol çözeltisi ve 0.5 ml elma suyu ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla karıştırıldıktan hemen sonra absorbans değerleri her 10 saniyede bir 420 nm dalga boyunda spektrofotometre (UV-VIS, Shimadzu UV-1202) ile belirlenmiştir. Aktivite ölçüm sıcaklığı 25+2°C dir. Reaksiyon hızı zamana karşı çizilen A<sub>420</sub> grafiğinin ilk doğrusal kısmının eğiminin belirlenmesiyle, birim zamanda absorbanstaki 0.001 lik değişim olarak ifade edilmiştir ( 0,001 ΔA<sub>420</sub>/ saniye).

### 3.6. Pektin esteraz aktivitesinin ölçümü

Pektinin substrat olarak kullanılmasıyla pH değişiminin süresinin belirlenmesi ile tespit edilmiştir. 10 ml meyve suyu ile %1 lik pektin çözeltisi ( 10 g pektin+15.3 g NaCl / Litre) karıştırılır. Karışım 30°C sabit sıcaklığa getirilir ve bu sıcaklığın sabit kalması sağlanır. Daha sonra 2 N lik NaOH çözeltisi ile pH değeri 7.0 ye ayarlanır. İkinci aşamada 0.05 N lik NaOH çözeltisi yardımıyla pH değeri 7.6 – 7.8 arasında bir değere getirilir ve kesin değer kaydedilir. Hemen 0.1 ml 0.05 N lik NaOH çözeltisi eklenir ve süre başlangıcı 0 olarak alınır. pH ın kaydedilmiş olan değere inmesi için gerekli olan süre tespit (t) edilir. Enzim ünitesi (PEU) aşağıdaki formülden tanımlanır (Kimball , 1991).

$$PEU = (0.05 \text{ N NaOH})(0.1 \text{ ml NaOH})/(10 \text{ ml numune})(t \text{ dakika}).$$

1 PEU'in tanımı analiz kuşullarında dakikada bir µmole karboksil grubunun açığa çıkmasına neden olan enzim miktarıdır.

### 3.7. Elma suyunda kararma değişiminin belirlenmesi

Absorbans ( $A_{420}$ ) ölçümleri elma suyunun 5000 rpm ve 10 dakika santrifüjlenmesinden (Nüve NF 615) sonra spektrofotometrede (UV-VIS, Shimadzu UV-1202) ile belirlenmiştir. HHP işlem sonrası elma suyundaki kararmanın nedeni kalan PPO aktivitesinden dolayıdır.

### 3.8. Portakal suyunda bulanıklık kaybının belirlenmesi

Örnekler 360 g de 10 dak santrifüjlenmiş ve geçirgenlik değerleri 650 nm'de ( $L=1$  cm) belirlenmiştir (UV-VIS, Shimadzu UV-1202). Değerler literatüre uygun olarak řu şekilde değerlendirilmiştir: 0-24%: bulanıklık kaybı yok, 25-35%: bulanıklık kaybı başlıyor, 36-60%: bulanıklık kaybı , 61-100%: bulanıklık kaybı çok yüksek. Literatürde kalite kontrol amaçlı olarak 650 nm ( $L=1$  cm) de % 36 geçirgenlik sınır olarak kabul edilmektedir.

#### 4. BULGULAR VE DEĞERLENDİRME

Çok yüksek basınçlarda, örneğin 800 MPa da, mikroorganizmaların inaktivasyonu oda sıcaklığında çok kısa sürede mümkündür. Ancak bu kadar yüksek basınca çıkabilecek ekipmanın kurulması henüz endüstriyel açıdan ekonomik değildir. Bu nedenle düşük ısıl işlemin basınç işlemi ile birleştirilmesi bir alternatif olarak alınabilir. Gıdalarda patojenlerin inaktivasyonu için uygun ve ekonomik YHP işlem koşullarının basınç-sıcaklık süre ilişkisi olarak belirlenmesi gerekmektedir. YHB işleminin meyve suları içindeki seçilmiş patojenler üzerine etkisi Tablo 1 ve 2 de verilmiştir. 350 MPa ve 40°C de 5 dakikalık bir işlem meyve sularında mikroorganizma sayısında yaklaşık 8-log'luk bir indirgeme sağlamıştır. Aynı işlem koşulu ile *L. monocytogenes* CA içinde meyve sularında 8-log'luk bir indirgeme elde edilmiştir. *E. coli* O157:H7, *Shigella* and *Salmonella* her ne kadar düşük pH değerinde büyümeselerde, bazı suşlarının asidik ortamlarda haftalarca yaşayabildiği belirtilmiştir (Leyer ve ark, 1995). ABD'de elma sırasında *E. coli* O157 için 5-log'luk indirgeme şartı vardır. 350 MPa ve 40°C de 5 dakikalık işlem görmüş örnek meyve suyu örnekleri 4°C de 1 hafta süreyle saklanmış ve tekrar koloni sayımı yapıldığında, canlı mikroorganizma belirlenmemiştir. Jordan ve arkadaşları (2001), 500 MPa ve 20°C da 5 dakikalık bir işlem sonucunda elma ve portakal suyunda *E. coli* O157 için canlı hücre sayısında 5 log'luk bir indirgeme belirlemişlerdir. Bizim sonuçlarımız ısıl işlem ile kombinasyondan dolayı daha düşük basınçta (350 MPa) daha yüksek bir indirgeme sağlamıştır. Her iki araştırmada da düşük pH'nın da etkisi önemlidir. Basınçlama işlemi hücre yapısında değişikliğe neden olduğundan, özellikle yaralanmış hücrelerin asittende etkilenmesi mümkündür.

Tablo 1. YHB (250 MPa) ve ısıtma işlemi (30°C) kombinasyonunun seçilmiş meyve sularındaki patojenler üzerine etkisi <sup>a</sup>

Meyve suyu	Süre (dak)	Canlılık kaybı (log <sub>10</sub> cfu/ml)		
		<i>S. aureus</i> 485 logX <sub>0</sub> = 8.20 <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> O157:H7 logX <sub>0</sub> = 8.28 <sup>b</sup>	<i>S. enteritidis</i> FDA logX <sub>0</sub> = 8.53 <sup>b</sup>
Kayısı suyu (pH = 3.80)	5	4.05	4.85	4.78
	10	4.30	5.05	5.21
	20	5.00	5.90	6.03
Portakal suyu (pH = 3.76)	5	4.25	5.10	5.30
	10	4.52	5.24	5.53
	20	5.37	6.34	6.75
Vişne suyu (pH = 3.30)	5	4.34	5.28	5.47
	10	4.70	5.75	6.66
	20	5.70	6.85	7.26

<sup>a</sup> ortalama değerler verilmiştir (n=8)

<sup>b</sup> X<sub>0</sub> : başlangıç hücre derişimi (cfu/ml)

Tablo 2. Farklı sıcaklıklarda 5 dakikaluk YHB (350 MPa) işleminin seçilmiş meyve sularındaki patojenler üzerine etkisi <sup>a</sup>

Meyve suyu	T (°C)	Canlılık kaybı (log <sub>10</sub> cfu/ml)		
		<i>S. aureus</i> 485 logX <sub>0</sub> = 8.20 <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> O157:H7 logX <sub>0</sub> = 8.28 <sup>b</sup>	<i>S. enteritidis</i> FDA logX <sub>0</sub> = 8.53 <sup>b</sup>
Kayısı suyu (pH = 3.80)	30	6.94	7.28	8.00
	40	8.20	8.28	8.53
Portakal suyu (pH = 3.76)	30	7.26	7.42	8.53
	40	8.20	8.28	8.53
Vişne suyu (pH = 3.30)	30	7.44	7.67	8.53
	40	8.20	8.28	8.53
Elma suyu (pH = 3.50)	30	6.80	7.10	7.80
	40	8.20	8.28	8.53

<sup>a</sup> ortalama değerler verilmiştir (n=8)

<sup>b</sup> X<sub>0</sub> : başlangıç hücre derişimi (cfu/ml)



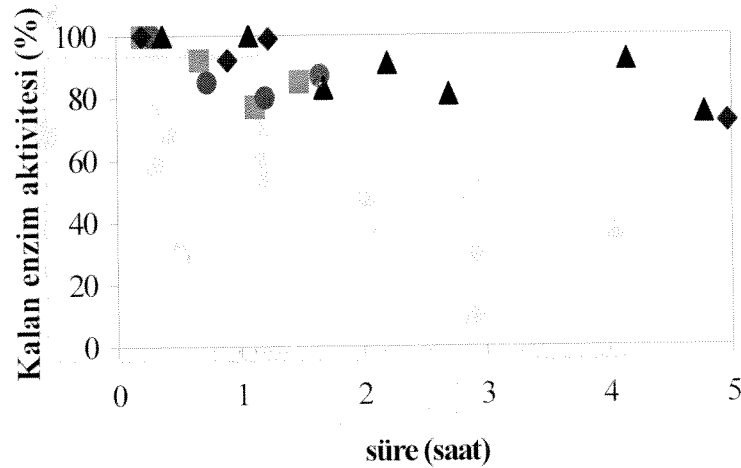
Literatürde YHB'nin hücrelerde yol açtığı geri dönüşümsüz değişiklikler ve bunların sonucu oluşan hücre ölümleriyle ilgili çok az çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada (Alpas ve ark., 2003) diferansiyel taramalı kalorimetre (DTK) ile bakterilerdeki değişimler belirlenmeye çalışılmış, hücre yaralanması ya da ölümü ile hücresel komponentlerin stabilitesi arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve ısısal ve basınca bağlı ribosom denatürasyonunun birbirlerinden tamamen farklı mekanizmalara sahip oldukları, bakterilerin ve aynı bakterinin farklı suşlarının ısı ve basınç dirençlerinin tamamen farklı olabileceği vurgulanmıştır. *Leuconostoc mesenteroides* hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada (Kaletunç ve ark.,2004) oluşan morfolojik değişimler taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve trans elektron mikroskopu (TEM) ile analiz edilmiş ve hücresel komponentlerin stabiliteleri DTK ile ölçülmüştür. SEM fotoğrafları 250 ve 500 MPa basınç işleminin hücrenin yüzeyinde ve iç yapısında morfolojik değişimler yarattığını göstermektedir. 3 ve daha fazla hücreden oluşan hücre zincirlerinin basınç arttıkça azaldıkları ve tipik hücre aranjmanlarının ortaya çıktığı görülmektedir. Basınç uygulanmamış hücrelerin daha düzgün yüzeysel yapıya sahip oldukları ancak 500 MPa basınç işlemi sonucu yüzeyde pürüzler ve çatlaklar oluştuğu hatta su toplamış kabarcıklı yapıya benzer kalıcı yapıların oluştuğu görülmüştür. Bu kabarcıklı yapıların özellikle lentikular hücrelerin bölünme yerlerine paralel sıralandıkları saptanmıştır. TEM fotomikrograflarında rastlanan en önemli değişikliğinse hücre membranı disintegrasyonu ve sitoplazmadaki elektron yoğun alanın genişlemesi olduğu görülmüştür. 35°C de 5 dakika süreyle uygulanan 250 MPa'lık basıncın nükleoid bölgede genişleme ve iç bölgede sıkılaşmaya yol açtığı ama genel olarak çoğu hücrenin membran bütünlüğünü koruduğu gözlenmiştir. 500 MPa'lık basınç ise hücre membranının tamamen parçalanmasına ve sitoplazmik maddelerin ve nükleoid bölgenin bütünüyle kaybına yol açmıştır.



YHB bakterilere ölümcül bir zarar verse de belirli koşullarda yaralanan hücrelerin özellikle gıda maddelerinin raf ömrü sürecinde iyileşerek büyümeleri ve tehlike yaratmaları olasıdır. Bu tip bir iyileşme özellikle düşük asitli gıdalarda daha da önem kazanmakta ve gıda bazlı patojenler bu tip gıdaların güvenliğini tehdit etmektedir. YHB işlemi uygulanacak gıda maddesinin yüksek asitli gıdalar olması, örneğin meyve suyu gibi, ekstra bir avantajdır. Bu tip gıdaların daha düşük basınca tabi tutulması ve oluşabilecek yaralı hücrelerin büyümesinin gıdada bulunan yüksek asitli ortam tarafından engellenmesi olasıdır.

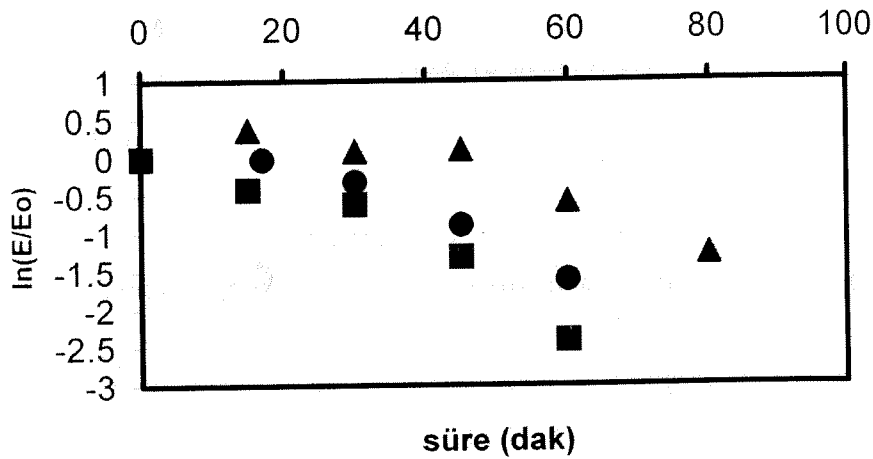
Uygulama açısından mikrobiyel ve enzim inaktivasyonunun aynı olması endüstriyel YHB uygulamaları açısından önemlidir. Oda sıcaklığında enzimlerin inaktivasyonu için basıncın 600 MPa dan daha yüksek olması gerekmektedir. Basınç ve ısıl işlem birleşimi daha düşük basınçlarda enzim inaktivasyonunu sağlayabilir.

Hiç işlem görmemiş elma suyundaki zamana göre PPO enzim aktivitesi değişimi Şekil 5 de örnek olarak verilmiştir. Aktivitede 5 saat sonun da çevresel faktörlerden dolayı sadece yaklaşık % 20 lik bir kayıp olmaktadır. Buda PPO enziminin dayanıklı bir enzim olduğunu göstermektedir.

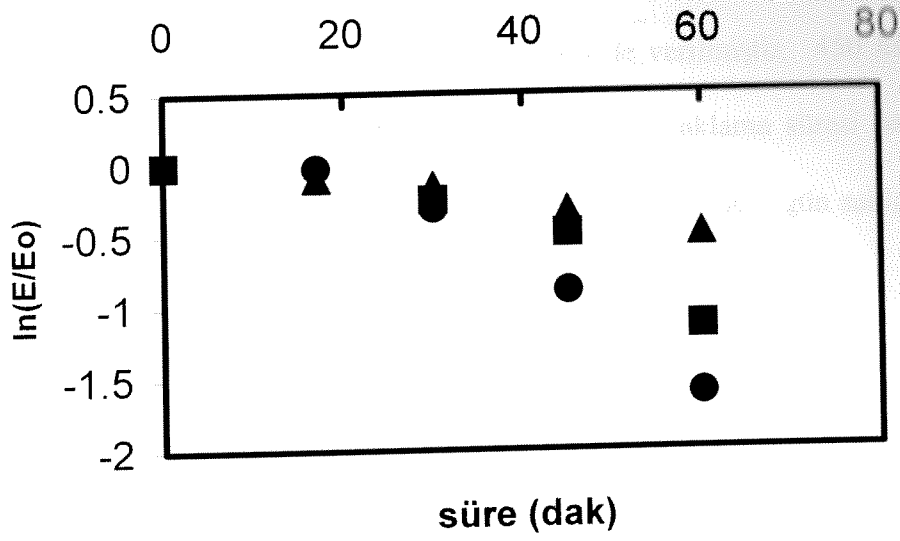


Şekil 5. İşlem görmemiş Amasya elma suyunda polifenol oksidaz aktivitesinin 25°C deki değişimi (3 farklı deney sonucu)

Sadece ısı işlem uygulandığında, elma suyunda PPO enziminin belirgin bir inaktivasyonu için 60°C derecenin üstüne çıkmak gerekmektedir ve inaktivasyon izoenzimlerden dolayı ikili bir davranış göstermektedir. Önce hızlı olan inaktivasyon daha sonra yavaş bir inaktivasyon biçimindedir. Basınç ve ısı işlem kombinasyonu ile elde edilen veriler Şekil 6 ve 7 de verilmiştir. Basınç ve ısı işlem kombinasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi gene ikili fakat farklı bir davranış göstermiştir. 30 dakikaya kadar aktivite kaybı yavaşken, bu süreden sonra inaktivasyon hızlanmıştır. İlk 30 dakika içindeki inaktivasyonun geri dönüşümlü inaktivasyon olabilir. Ayrıca literatürde 30-40 °C aralarında yalnızca ısı işlem uygulanmış elma suyunda enzimde inaktivasyon yerine aktivasyon görüldüğü rapor edilmiştir. Benzer şekilde 450 MPa ve 25°C deki uygulamada elma suyundaki polifenol oksidaz aktivitesinde inaktivasyon yerine başlangıçta aktivasyon görülmüştür. Bunun nedeni diğer birleşenlerle etkileşimde değişim, membrana bağlı enzimlerin veya gizli (latent) aktivitenin açığa çıkması olabilir. 450 MPa ve 50°C de 60 dakika işlem görmüş elma suyunda kalan polifenol oksidaz aktivitesi  $9 \pm 2.25\%$  dir.



Şekil 6. 450 MPa'da işlenmiş elma suyunda kalan PPO aktivitesi ( $E/E_0$ , E: herhangi bir zamandaki enzim aktivitesi ;  $E_0$ : başlangıç enzim aktivitesi) : ▲ 25°C ● 40°C ■ 50°C.



Şekil 7. 40°C 'de işlenmiş elma suyunda kalan PPO aktivitesi (E/E<sub>0</sub>, E: herhangi bir zamandaki enzim aktivitesi ; E<sub>0</sub>: başlangıç enzim aktivitesi: ▲ 0.1 MPa; ■ 340MPa; ● 450 MPa)

Elma suyunda polifenol oksidazın inaktivasyonu daha hızlı olan ikinci faz için birinci dereceden reaksiyon kinetiği ile ifade edilmiştir (Tablo 3). Reaksiyon hız sabitlerinden veya D-değerlerinden anlaşılacağı gibi, basınç ve sıcaklık kombinasyonunun enzim inaktivasyonunda etkisi önemlidir.

Tablo 3. Polifenol oksidaz enziminin elma suyunda inaktivasyon kinetiği sabitleri

P (MPa)	T (°C)	k* (1/dak)	D-değeri (dak)
0.1	25	2.23 x 10 <sup>-3</sup> (r <sup>2</sup> =0.97)	1033
	40	1.14 x 10 <sup>-2</sup> (r <sup>2</sup> =0.99)	202
	50	1.69 x 10 <sup>-2</sup> (r <sup>2</sup> =0.99)	136
450	25	1.62 x 10 <sup>-2</sup> (r <sup>2</sup> =0.98)	142
	40	4.32 x 10 <sup>-2</sup> (r <sup>2</sup> =0.99)	53
	50	5.97 x 10 <sup>-2</sup> (r <sup>2</sup> =0.98)	39

\*ln(E/E<sub>0</sub>) = -kt

E : herhangi bir zamandaki enzim aktivitesi E<sub>0</sub> : başlangıç enzim aktivitesi  
k : birinci derece reaksiyon hız sabiti t : süre

Elma suyundaki kararmanın nedeni PPO aktivitesinden dolayıdır. Çeşitli elma türleri ile kıyaslandığında, Amasya elma suyundaki enzimatik kararın oldukça hızlıdır. YHB uygulaması sonucunda elde edilen veriler Tablo 4 de verilmiştir. 450 MPa ve düşük ısı kombinasyonunun uygulandığı örnekler 25°C de 2 saat saklama süresi sonunda taze elma suyu renginde ( $\Delta A_{420}$ ) bir değişim olmamıştır. Örnekler 4°C de 1 gün saklandıklarında, taze elma suyuna göre renkte önemli bir değişim göstermemişlerdir.

Tablo 4. 25°C de 2 saat tutulmuş elma suyunda kararmanın derecesi

işlem	kararın derecesi*
Taze (hiç işlem görmemiş)	3
0.1 MPa + 40°C +60 dak	4
340 MPa + 40°C+60 dak	2
450 MPa + 40°C+60 dak	1
450 MPa + 25°C+60 dak	2
450 MPa + 50°C+60 dak	1

\*1: kararın yok, 2: az kararın, 3: kararın, 4: çok kararın, 5: maximum kararın (hiç bir işlem görmemiş ve 25°C de 1 gün tutulmuş elma suyundaki  $\Delta A_{420}$  değişimi 5 olarak kabul edilmiştir)

Portakal suyunda PE aktivitesi başlangıçta  $4.2 \pm 1.1 \times 10^{-4}$  olarak belirlenmiştir. Bu enzim aktivitesinin bulanıklık kaybının engellenmesi açısından  $1 \times 10^{-6}$  dan daha küçük olması gerekmektedir. 40 ile 50° C sıcaklık aralığında PE enzimi, YHB işlemi uygulanmaksızın, 1 saat içinde yavaş bir aktivite kaybı göstermiştir. 90°C de 1 dakika süreyle tutulmuş portakal suyunda aktivite kaybı yaklaşık % 98' dir. Tablo 5 farklı basınç-sıcaklık ve süre

kombinasyonunda PE enziminin portakal suyunda inaktivasyonunu göstermektedir. Portakal suyunda 450 MPa - 50°C - 30 dakikalık bir kombinasyon enzim aktivitesini yaklaşık olarak %  $7 \pm 1.56$  ya indirgemıştır. Bu değer 450 MPa - 40°C - 60 dakikalık bir kombinasyon için %  $12 \pm 0.17$  dir. Elma suyunda olduğu gibi bunun nedeni PE enziminin portakal suyu içinde sıcaklık/ basınca dayanıklı olan izoenzimlerden dolayıdır. İşlem görmüş örneklerin 4 ve 25°C de bir hafta saklanması sonucunda enzim aktivitesinde geri bir kazanım görülmemiştir.

Tablo 5. Portakal suyunda (pH =3.76) PE aktivitesine basınç-sıcaklık kombinasyonunun etkisi

Basınç (MPa)	Sıcaklık (°C)	Süre (min)	Kalan enzim aktivitesi (%)
350	40	30	24±1.6
350	40	60	14±2.3
350	50	30	13±1.1
350	50	60	11±0.11
450	40	30	20±0.21
450	40	60	12±0.17
450	50	30	7±1.56
450	50	60	7±0.18

İşlem sırasında portakal suyundaki bulanıklık kaybının engellenmesi çok önemlidir. Taze portakal suyu 4°C de tutulduğu zaman içindeki PE aktivitesinden dolayı bulanıklık kaybı gösterir. Bulanıklık kaybının nedeni metal grubu giderilmiş pektinin kalsiyum iyonlarıyla etkileşiminden dolayıdır. YHB işlemi pektinin yapısını etkileyerek bulanık kaybına neden olan PE enzim aktivitesinin kontrolünde etkilidir (Tablo 6). Literatürde kalite kontrol amaçlı olarak 650 nm (L = 1 cm ) de % 36 geçirgenlik değeri sınır olarak kabul edilmektedir.

Tablo 6. Farklı saklama koşullarında tutulan işlem görmüş portakal suyundaki bulanıklık kaybı

Uygulanan işlem	Bulanıklık kararlılığı (650 nm deki % T)			
	1 hafta saklama		2 hafta saklama	
	4°C	25°C	4°C	25°C
Taze (işlem görmemiş)	48±4.2	83±2.0	59±3.1	86±4.1
340MPa+25°C+30 dak	33±4.3	73±1.2	39±3.7	81±2.8
450MPa+25°C+30 dak	17±3.3	39±1.9	21±0.6	49±3.9
340MPa+40°C+30 dak	23±1.3	29±4.2	27±2.9	31±3.5
450MPa+40°C+30 dak	11±4.1	17±0.7	9±4.1	15±0.2

## 5. SONUÇ

Isıl işlem sonucu ürün kalitesindeki zararlı değişimin en az düzeyde tutulabilmesi için ve de gıda maddelerinin uzun süreli muhafazası amacıyla ısıl işlem ile birlikte veya ısıl işlemin yerini alabilecek yeni teknolojilerin geliştirilmesi üzerine yapılan araştırmalar dünyada gittikçe önem kazanmaktadır. Yeni teknolojik uygulamaların mikroorganizmalar, enzimler ve gıda bileşenlerine etkileri konusunda elde edilen her türlü veri, bu teknolojinin uygulanabilirliği açısından literatürde önemli bir bilgi birikimi sağlayacaktır.

Bu çalışma meyve sularında basınç ve sıcaklık kombinasyonunun seçilmiş örnek dirençli mikroorganizmalardan *L. monocytogenes* CA, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis*'in inaktivasyonu için kullanılabilceğini göstermektedir. 350 MPa ve 40°C de patojenlerin tamamının inaktivasyonu mümkündür. Meyve sularında enzim aktivitelerini daha yüksek basınç değerlerinde (> 400 MPa) ve ısıl işlem (<50 °C) kombinasyonu ile daha kısa sürede durdurmak mümkündürki bu koşullarda patojenler zaten inaktif durumda olucaklardır.

Son yıllarda dünya pazarında soğuk içeceklerin tüketiminde sürekli bir artış mevcuttur. İhracatımızda önemli bir yeri olan Avrupa'da daha çok elma ve portakal suyu tüketilirken, Türkiye'de vişne suyu, şeftali ve kayısı nektarı tüketilmektedir. Dünyada yapılan araştırmalardan, meyve suları bu YHB teknoloji ile en iyi sonuçların alınabildiği gıda gruplarından biri olarak gözükmektedir.

Bu teknoloji ile gıdaların üretilmesi ve korunması özellikle Japonya'da ve Avrupa ülkelerinde çalışılmaktadır. 1989 yılında Japonya'da, Tarım Bakanlığı denetiminde, 21 büyük endüstriyel kuruluş yüksek hidrostatik basınç teknolojisinin meyve, sebze, süt, et ve balık ürünleri gibi gıdalardaki uygulanabilirliğini araştırmak için bir konsorsiyum oluşturmuşlardır. 1991 yılından bu yana da bu firmalar, meyve suyu, şekerleme, yoğurt, soslar, salata sosları ve reçel gibi ürünleri tüketici pazarına sunmuş ve bu ürünler tüketicilerden geniş ilgi görmüştür. Avrupa'da da; Almanya, Fransa, Belçika ve İngiltere'deki 8'i akademik ve 4'ü özel olmak üzere toplam 12 kuruluş benzer bir konsorsiyum kurmuşlar ve yüksek hidrostatik basınç teknolojisi ile üretilmiş gıdaların ticari olarak tüketime sunulabilmesi için çalışmaktadırlar. Ayrıca Avrupa Ekonomik Topluluğu'da bu konuda çok uluslu bir projeye büyük maddi destek vermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise, özellikle Amerikan ordusu, askerleri için çok yüksek kalitede (hem besin hem de kabul kalitesi), raf ömrü uzun ve yemeğe hazır bu teknikle hazırlanmış karışımlar talep etmektedir. YHB teknolojisi gıda üretiminde geliştikçe, yeni ürünleri ve uygulamaları da beraberinde getirecek ve bunları araştırmaya açacaktır. Türkiye'yeinde gıdaların işlenmesi ve korunmasında kullanılacak yeni teknolojik araştırmalara önem vermesi gerekir. Bu projede kurulan sistemle, yalnızca projede yer alan araştırmacılara değil, bir çok ilgili araştırmacıya da yeni bir araştırma alanı sağlamıştır. Ayrıca bu tür bir altyapı üniversite-sanayi işbirliği açısından da önemlidir.

## 6. PROJE KAPSAMINDA YAPILAN YAYIN VE TEBLİĞ

- 1) A. Bayındırlı, H.Alpas & F. Bozoğlu ,Processing of Orange and Apple Juice by a Combination of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat Treatment: Inactivation of Enzymes and Quality Factor Changes, IFT Annual Meeting , Anaheim, California, USA, 2002 , 91E-8
- 2) H.Alpas, A. Bayındırlı & F. Bozoğlu ,Effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) treatment on survival food borne pathogens in freshly squeezed fruit juices, IFT Annual Meeting , Anaheim, California, USA, 2002, 91E-4
- 3) A. Bayındırlı, H.Alpas & F. Bozoğlu ,Inactivation of Enzymes in Freshly Squeezed Orange and Apple Juice by a Combination of High Hydrostatic Pressure (HHP) and Mild Heat Treatment, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.29
- 4) H. Alpas, F. Bozoğlu & A. Bayındırlı ,Survival of *Escherichia coli* O157:H7 933 and *Salmonella enteritidis* FDA during Storage in high Hydrostatic Pressure (HHP) Treated Orange and Apple juice, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.22
- 5) F. Bozoğlu, H. Alpas & A. Bayındırlı ,High Hydrostatic Pressure (HHP) Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Orange and Apple Juice upon Storage, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.21



## REFERANSLAR

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, P., Ray, B., Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4248-4251, (1999).
- Alpas, H., Bozoglu, F., The Combined Effect of High Hydrostatic Pressure, Heat and Bacteriocins on Inactivation of Foodborne Pathogens in Milk and Orange Juice, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 387-392, (2000)
- Alpas, H., N. Kalchayanand, F. Bozoglu, B. Ray, Interactions of High Hydrostatic Pressure, Pressurization Temperature and pH on Death and Injury of Pressure-resistant and Pressure-sensitive Strains of Foodborne Pathogens, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 33-42, (2000).
- Alpas, H., J. Lee, F. Bozoglu, G. Kaletunc, Evaluation by differential scanning calorimetry of high hydrostatic pressure-sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 strains, *International Journal of Food Microbiology*, 87, 229-237, (2003).
- Arnold, K.W., Kaspar, C.W., Starvation and stationary phase induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2037-2039, (1995).
- Basak S., Ramaswamy H.S., Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase, *Food Research International*, 29(7), 601-607, (1996).
- Benito, A., Ventoura G., Casadei, M., Robinson, T., Mackey, B., Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat and other stresses, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1564-1569, (1999).

- Cano M.P., Hernandez A., De Ancos B., High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products, *Journal of Food Science*, 62(1), 85-88, (1997).
- Conner, D.E., Kotrola, J.S., Growth and survival of *E. coli* O157:H7 under acidic conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 382-385, (1995).
- Castellari M., Matricardi L., Arfelli G., Rovera P., Amati A., Effect of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts, *Food Chemistry*, 60(4), 647-649, (1997).
- Cheftel, J.C., Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview, In: *High Pressure and Biotechnology*, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson (Eds.). Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd, (1992), 224:195,
- Cheftel, J.C., High pressure, microbial inactivation and food preservation, *Food Science and Technology*, 1, 75-90, (1995).
- Chong, G., Cossins, A.R., A differential polarized fluorometric study of the effects of high hydrostatic pressure upon the fluidity of cellular membranes, *Biochemistry*, 22, 409-412, (1988).
- Cody, S.H., Glynn, M.K., Farrar, J.A., Cairns, K.L., Griffin, P.M., Kobayashi, J., Fyfe, M., Hoffman, R., King, A.S., Lewis, J.H., Swaminathan, B., Bryant, R.G., Vugia, D.J., An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice, *Annual International Medicine*, 130(3), 202-209, (1999).
- Deuchi, T., Hayashi, R., Pressure application to thawing of freezed foods and to food preservation under sub-zero-temperature. In: *High Pressure Science for Food*. Edited by Hayashi, R., San-ei Pub. Co., Kyoto, Japan, (1991) pp 101-110.
- Elgasim, E.A., Kennick, W.H., Effects of pressurization of prerigor beef muscles on protein

- quality, *Journal of Food Science*, 45, 1122-1124, (1980).
- Erickson, J.P., Stamer, J.W., Hayes, M., McKenna, D.N., Van Alstine, L.A., An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings, *Journal of Food Protection*, 58, 1059-1064, (1995).
- Farr, D., High pressure technology in the food industry. *Trends in Food Science and Technology* 1, 14-16, (1990).
- Garcia-Graells, C., Hauben, K.J.A., Michiels, C.W., High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1566-1568, (1998).
- Garlant Miller, L., Kaspar, C.W., *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider, *Journal of Food Protection* 57, 460-464, (1994).
- Gomes M.R.A., Ledward D.A., Effect of high pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases, *Food Chemistry*, 56(1), 1-5, (1996).
- Goodner, J.K., Braddock, R.J., Parish, M.E., Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 1997-2000, (1998).
- Goodner, J.K., Braddock, R.J., Parish, M.E., Sims C.A., Cloud stabilization of orange juice by high pressure processing, *Journal of Food Science*, 64(4), 699-700, (1999).
- Hauben, K.J.A., Wuytack, E.Y., Soontjens, C.F., Michiels, C.W., High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* O157:H7 to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability, *Journal of Food Protection*, 59, 350-359, (1996).
- Hauben, K.J.A., Barlett, D.H., Soontjes, C.C.F., Cornelis, K., Wuytack, E.Y., Michiels, C.W., *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure, *Applied*

- and *Environmental Microbiology*, 63, 945-950, (1997).
- Hayashi, R., Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology, In: *High Pressure and Biotechnology*, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson (Eds.). Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd. 224:185, (1992).
- Heremans, K., High Pressure Effects on Proteins and Other Biomolecules, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 11(1), 1-21, (1982).
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F., Knorr, D., Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms, *Food Technology*, 43(3), 99-107, (1989).
- ICMSF, Microorganisms in foods: Their Significance and Methods of Enumeration. Eds. R.P. Elliott and H. Lundbeck. *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*. Toronto and London, University of Toronto Press, (1978).
- Isaacs, N. S., Chilton, P. , Microbial inactivation mechanisms. In: *High Pressure Processing of Foods*. Eds. D. A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw, and A. P. M. Hastings. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 65-179, (1995).
- Jordan, S.L., Pascual, C., Bracey, E., Mackey, B.M., Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices, *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 463-469, (2001).
- Kalchayanand, N., Sikes, Dunne, C.P., Ray, B., Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization, *Food Microbiology*, 15:207-214, (1998).
- Kimball D., *Citrus Processing: Quality Control and Technology* AVI publishing, New York, (1991). pp 121-123
- Kalefinc G, Lee J., Alpas, H., J. Lee, F. Bozoglu , Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*, *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 70, 1116-1122, (2004).
- Knorr, D., Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality , *Food Technology*, 47(6) 156-161, (1993).
- Kuribayashi, T., Hayashi, R., Extraction of pectin by high pressure treatment. In: *High Pressure Science for Food*. Edited by Hayashi, R., San-ei Pub. Co., Kyoto, Japan, (1991), pp. 101.
- Lechowic , R.V., Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method”, *Food Technology* ,47(6) 170-172, (1993)
- Leyer, G.J., Wang, L.L., Johnston, E.A., Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3752-3755, (1995).
- Lopez-Malo A., Paloa E., Barbosa-Canovas G.V., Welti-Chanes J., Swanson B.G., Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree, *Food Research International*, 31 (8): 549-556, (1998).
- Linton, M., McClements, J.M.J. , Patterson, M.F., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat, *Journal of Food Protection*, 62, 277-279, (1999).
- Mackey, B.M., Forestiera, K., Isaacs, N., Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure, *Food Biotechnology*, 9 , 1-11, (1995).
- McCarthy, M., *E. coli* O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice, *Lancet*, 348, 1299, (1996).
- Mertens B. and Deplace G., Engineering aspects of high pressure Technology in the food Industry, *Food Technology*, June , 164-169, (1993)
- Miller, L.G., Kaspar, C.W., *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple

- cider. *Journal of Food Protection* ,57, 460-464, (1994).
- Morild, E. 1981. Theory of Pressure Effects on Enzymes. In: *Advances in Protein Chemistry*. Edited by Anfinsen, C.B., Edsall, J.T. and Richards, F.M., Academic Press Inc., London. (1981) pp .93-166.
- Nienaber U., Shellhammer T.H. High pressure processing of orange juice: Kinetics of pectinmethylesterase inactivation, *Journal of Food Science*. 66(2), 328-331, (2001a).
- Nienaber U., Shellhammer T.H., High pressure processing of orange juice: Combination treatments and a shelf life study, *Journal of Food Science*. 66(2), 332-336, (2001b).
- Ogawa H., Fukuhisa K., Kuba Y., Fukumota H., Pressure inactivation of yeasts, molds and pectinesterase in satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH and organic acids and comparison with heat sanitation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(5) 1219-1225, (1990).
- Ogawa, H., Fukuhisa, K., Fukutomo, H., Effect of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of citrus juice., In: *High Pressure and Biotechnology*. Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. . , (1992), 224, 269-278.
- Okatomo, M., Hayashi, R., Enomoto, A., Kaminogawa, S., Yamauchi, K., High pressure proteolytic digestion of food proteins: Selective elimination of  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate, *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(5), 1253-1257, (1991).
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A., Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods, *Journal of Food Protection*, 58, 524-529, (1995).
- Ray, B., Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A., Microbial destruction during high pressure

- processing of food,. In: *No, I Processes and Control Technologies in the Food Industry*. Eds. F. Bozoglu, B. Ray, and T. Deak, T. NATO Science Series, IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, (2001), 338: 95-122.
- Seyderhelm I., Boguslawski S, Michaelis G., Knorr D., Pressure induced inactivation of selected food enzymes, *Journal of Food Science*, 61(2), 308-310, (1996).
- Smelt, J.P.P.M., Recent advances in the microbiology of high pressure processing, *Trends in Food Science and Technology*, 9, 152-158, (1998).
- Stewart, C.M., Jewett, F.F., Dunne, C.P., Hoover, D.G., Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Safety*, 17, 23-36, (1997).
- Teo, A.Y.L., Ravishankar, S., Sizer, C.E., Effect of temperature, high-pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in unpasteurized fruit juices, *Journal of Food Protection*, 64(8), 1122-1127, (2001).
- Van den Broeck I, Ludikhuy, A.M. Van Loey , Hendrickx M.E., Inactivation of Orange Pectinesterase by combined High Pressure and Temperature Treatments: A Kinetic Study, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 1960-1970, (2000).
- Weagant, S.D., Bryant, J.L., Bark, D.H., Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise based sauces at room and refrigerated temperatures, *Journal of Food Protection*, 57, 629-631, (1994).
- Weemaes C., Ludikhuyze L., Van Den Broeck I., Hendrickx M., High pressure inactivation of polyphenoloxidases, *Journal of Food Science*, 63(5), 873-877, (1998).

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU		
1- Proje No: TARP- 2537	2-Rapor Tarihi : 17 Mart 2004	
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1/02/2000 – 1/02/2003		
4- Proje Adı: Yüksek hidrostatik basınç uygulaması ile meyve sularında mikroorganizmaların ve enzimlerin inaktivasyonu		
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar Proje Yürütücüsü : Prof.Dr. Alev Bayındırlı , Gıda Mühendisliği Bölümü, ODTÜ, Ankara Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr. Mirzahan Hızal , Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü, ODTÜ, Ankara Y.Doç.Dr. Hami ALPAS, Gıda Mühendisliği Bölümü, ODTÜ, Ankara		
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ, Gıda Mühendisliği bölümü, 06531 Ankara		
7- Destekleyen Kuruluş (ların) Adı ve Adresi: -		
8- Öz (Abstract):  Bu çalışmanın amacı gıdaların işlenmesinde kullanılabilir yüksek sıvı basınç sisteminin tasarlanması ve kurulması ve bu sistemi kullanarak meyve sularında ısıl işlemle beraber yüksek sıvı basıncının elma, portakal, kayısı ve vişne suyunda seçilmiş patojenlerden <i>Staphylococcus aureus</i> 485, <i>Listeria monocytogenes</i> CA, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 933 ve <i>Salmonella enteritidis</i> FDA'nın inaktivasyonunu araştırmaktır. Ayrıca elma suyunda polifenol oksidaz ve portakal suyunda pektin esteraz enzimlerinin yüksek sıvı basınç sistemi ile etkisiz hale getirilmesi de çalışılmıştır. Mikroorganizmalar 350 MPa ve 40°C kombinasyonu ile 5 dakika içinde tamamen etkisiz hale getirilmiştir. Elma suyunda kalan polifenol oksidaz enzim aktivitesi 450 MPa ve 50°C de 60 dakika sonunda % 9±2.25 olarak belirlenmiştir. Portakal suyunda aynı basınç ve sıcaklık kombinasyonu 30 dakikada pektin esteraz aktivitesini % 7 ± 1.56 ya indirmiştir. Kalan enzim aktivitelerinin nedeni yüksek basınca dayanıklı olan izoenzimlerdir. Enzimlerin inaktivasyonu geri dönüşümsüzdür ve saklama sırasında herhangi bir aktivite kazanımı tespit edilmemiştir. 400 MPa dan daha yüksek basınçlar 50 °C yi geçmeyecek ısıl işlem ile kombine edildiğinde enzim inaktivasyonu daha da hızlı olacaktır. Anahtar Kelimeler: Yüksek sıvı basınç, patojen, enzim, meyve suyu		
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler:  1) A. Bayındırlı, H.Alpas & F. Bozoğlu ,Processing of Orange and Apple Juice by a Combination of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat Treatment: Inactivation of Enzymes and Quality Factor Changes, IFT Annual Meeting , Anaheim, California, USA, 2002 , 91E-8  2) H.Alpas, A. Bayındırlı & F. Bozoğlu ,Effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) treatment on survival food borne pathogens in freshly squeezed fruit juices, IFT Annual Meeting , Anaheim, California, USA, 2002, 91E-4  3) A. Bayındırlı, H.Alpas & F. Bozoğlu ,Inactivation of Enzymes in Freshly Squeezed Orange and Apple Juice by a Combination of High Hydrostatic Pressure (HHP) and Mild Heat Treatment, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.29  4) H. Alpas, F. Bozoğlu & A. Bayındırlı ,Survival of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 933 and <i>Salmonella enteritidis</i> FDA during Storage in high Hydrostatic Pressure (HHP) Treated Orange and Apple juice, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.22  5) F. Bozoğlu, H. Alpas & A. Bayındırlı ,High Hydrostatic Pressure (HHP) Inactivation of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> in Orange and Apple Juice upon Storage, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.21		
10- Bilim Dalı: Gıda Bilimleri ve Mühendisliği Doçentlik B.Dalı Kodu: 908 ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu: I.052		
11- Dağıtım:	Sınırlı	■ Sınırsız
12- Raporun Gizlilik Durumu:	Gizli	■ Gizli Değil



BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU		
1- Proje No: TARP- 2537	2-Rapor Tarihi : 17 Mart 2004	
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1/02/2000 – 1/02/2003		
4- Proje Adı: Yüksek hidrostatik basınç uygulaması ile meyve sularında mikroorganizmaların ve enzimlerin inaktivasyonu		
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar Proje Yürütücüsü : Prof.Dr. Alev Bayındırlı , Gıda Mühendisliği Bölümü, ODTÜ, Ankara Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr. Mirzahan Hızal , Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü, ODTÜ, Ankara Y.Doç.Dr. Hami ALPAS, Gıda Mühendisliği Bölümü, ODTÜ, Ankara		
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ, Gıda Mühendisliği bölümü, 06531 Ankara		
7- Destekleyen Kuruluş (ların) Adı ve Adresi: -		
8- Öz (Abstract):  Bu çalışmanın amacı gıdaların işlenmesinde kullanılabilir yüksek sıvı basınç sisteminin tasarlanması ve kurulması ve bu sistemi kullanarak meyve sularında ısı ile beraber yüksek sıvı basıncının elma, portakal, kayısı ve vişne suyunda seçilmiş patojenlerden <i>Staphylococcus aureus</i> 485, <i>Listeria monocytogenes</i> CA, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 933 ve <i>Salmonella enteritidis</i> FDA'nın inaktivasyonunu araştırmaktır. Ayrıca elma suyunda polifenol oksidaz ve portakal suyunda pektin esteraz enzimlerinin yüksek sıvı basınç sistemi ile etkisiz hale getirilmesi de çalışılmıştır. Mikroorganizmalar 350 MPa ve 40°C kombinasyonu ile 5 dakika içinde tamamen etkisiz hale getirilmiştir. Elma suyunda kalan polifenol oksidaz enzim aktivitesi 450 MPa ve 50°C de 60 dakika sonunda % $9 \pm 2.25$ olarak belirlenmiştir. Portakal suyunda aynı basınç ve sıcaklık kombinasyonu 30 dakikada pektin esteraz aktivitesini % $7 \pm 1.56$ ya indirmiştir. Kalan enzim aktivitelerinin nedeni yüksek basınçta dayanıklı olan izoenzimlerdir. Enzimlerin inaktivasyonu geri dönüşümsüzdür ve saklama sırasında herhangi bir aktivite kazanımı tespit edilmemiştir. 400 MPa dan daha yüksek basınçlar 50 °C yi geçmeyecek ısı ile kombine edildiğinde enzim inaktivasyonu daha da hızlı olacaktır. Anahtar Kelimeler: Yüksek sıvı basınç, patojen, enzim, meyve suyu		
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler:  1) A. Bayındırlı, H.Alpas & F. Bozoğlu ,Processing of Orange and Apple Juice by a Combination of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat Treatment: Inactivation of Enzymes and Quality Factor Changes, IFT Annual Meeting , Anaheim, California, USA, 2002 , 91E-8  2) H.Alpas, A. Bayındırlı & F. Bozoğlu ,Effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) treatment on survival food borne pathogens in freshly squeezed fruit juices, IFT Annual Meeting , Anaheim, California, USA, 2002, 91E-4  3) A. Bayındırlı, H.Alpas & F. Bozoğlu ,Inactivation of Enzymes in Freshly Squeezed Orange and Apple Juice by a Combination of High Hydrostatic Pressure (HHP) and Mild Heat Treatment, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.29  4) H. Alpas, F. Bozoğlu & A. Bayındırlı ,Survival of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 933 and <i>Salmonella enteritidis</i> FDA during Storage in high Hydrostatic Pressure (HHP) Treated Orange and Apple juice, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.22  5) F. Bozoğlu, H. Alpas & A. Bayındırlı ,High Hydrostatic Pressure (HHP) Inactivation of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> in Orange and Apple Juice upon Storage, European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin, Germany, 2001, 3.21		
10- Bilim Dalı: Gıda Bilimleri ve Mühendisliği Doçentlik B.Dalı Kodu: 908 ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu: 1.052		
11- Dağıtım:	Sınırlı	■ Sınırsız
12- Raporun Gizlilik Durumu:	Gizli	■ Gizli Değil