



2003_423

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu
Agriculture, Forestry & Veterinary Research Grant Group

101800

**Yüksek Sıvı Basınç ve Bakteriosinlerin Süt ve Portakal
Suyundaki Gıda Bazlı Mikroorganizmaların
İnaktivasyonu Üzerine Etkisi**

Proje Kod No: TOGTAG-NSF-2001/1

1010135

**Prof. Dr. Faruk Bozoğlu
Yard. Doç. Dr. Hami Alpas**

Kasım 2003

Ankara

101800

**Yüksek Sıvı Basınç ve Bakteriosinlerin Süt ve Portakal
Suyundaki Gıda Bazlı Mikroorganizmaların
İnaktivasyonu Üzerine Etkisi**

Proje Kod No: TOGTAG-NSF-2001/1

1010135

**Prof. Dr. Faruk Bozoğlu
Yard. Doç. Dr. Hami Alpas**

Kasım 2003

Ankara

Önsöz

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım Orman ve Gıda Teknolojisi Araştırma Grubu, Yürütme Komitesi Sekreterliği tarafından desteklenen bu projede Yüksek Hidrostatik Basınç tekniği kullanılarak gıdalarda patojen mikroorganizmaların inaktivasyon mekanizması ve ürünlerde raf ömrü çalışmaları yapılmıştır.

Teşekkür

Proje grubu; öncelikle Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım Orman ve Gıda Teknolojisi Araştırma Grubu, Yürütme Komitesi Sekreterliğine, projemizi dikkatle izleyen Prof. Dr. Jale Acar'a, araştırmalarımızda bize tüm olanaklarını açan Sayın Dr. Gönül Kaletunç'a ve Ohio State Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne vermiş oldukları destek için teşekkür eder.

Proje Grubu

Proje Yürütücüsü

Prof. Dr. Faruk Bozoğlu, Gıda Mühendisliği Bölümü, Orta Dođu Teknik Üniversitesi,
Ankara

Araştırmacı

Yard. Doç. Dr. Hami Alpas, Gıda Mühendisliği Bölümü, Orta Dođu Teknik Üniversitesi,
Ankara

İçindekiler

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	5
TABLolar.....	6
ŞEKİLLER.....	7
ÖZ.....	8
ABSTRACT.....	9
PROJE ANA METNİ.....	10
1. Giriş.....	10
1.1. Yüksek sıvı basınç prosesi.....	10
1.2. HHP'nin mikroorganizmalar üzerindeki etkisi.....	11
2. Düzenek ve Yöntem.....	13
3. Bulgular ve Değerlendirme.....	14
3.1. <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> O157:H7'nin yüksek hidrostatik basınç hassaslığının diferansiyel taramalı kalorimetre ile değerlendirilmesi.....	14
3.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 'de yüksek hidrostatik basınç sonucu oluşan yapısal değişimlerin değerlendirilmesi.....	17
3.3. Saklama sıcaklığının YHB uygulanmış sütte ve portakal suyunda bulunan gıda bazlı patojenlerin yaralanma / iyileşme süreci etkisi.....	22
4. Sonuç.....	27
5. Yayınlar ve tebliğler.....	28
6. REFERANSLAR.....	29

Tablolar

Tablo 3.1. Kontrol ve YHB uygulanmış hücrelerin belirgin enthalpy ve canlılık verileri.....	17
Tablo 3.3.1. Saklama sürecinde sütte <i>L. monocytogenes</i> CA'nın iyileşmesi.....	23
Tablo 3.3.2. Saklama sürecinde sütte <i>S. enteritidis</i> FDA'nın iyileşmesi.....	24
Tablo 3.3.3. Saklama sürecinde sütte <i>S. aureus</i> 485'in iyileşmesi.....	24
Tablo 3.3.4. Saklama sürecinde sütte <i>E coli</i> O157:H7 933'ün iyileşmesi.....	25

Şekiller

Şekil 3.1.1. <i>S. aureus</i> 485 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika).....	15
Şekil 3.1.2. <i>S. aureus</i> 765 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika).....	15
Şekil 3.1.3. <i>E. coli</i> O157:H7 933 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika).....	16
Şekil 3.1.4. <i>E. coli</i> O157:H7 931 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika).....	16
Şekil. 3.2.1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SEM mikrografları (Tüm mikrograflar 3500 kere büyütülmüştür).....	19
Şekil. 3.2.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SEM mikrografları (Tüm mikrograflar 50000 kere büyütülmüştür).....	20
Şekil. 3.2.3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TEM mikrografları A) kontrol B) 250 MPa, 35°C, 5 dakika, C) 500 MPa, 35°C, 5 dakika.....	21

Öz

Bu çalışmanın amacı Gıda endüstrisinde kullanılmaya başlayan yüksek sıvı basınç teknolojisinin (HHP) seçilmiş gıda patojenleri üzerine etkilerini araştırılmasıdır.

Bu çalışmada öncelikle HHP'nin bakterilerin inaktivasyon mekanizmasının incelenmesi ele alınmıştır. 250-500 MPa aralığında yapılan çalışmalar, DSC,SEM ve TEM metotları ile incelenmiş ve 300 MPa'nın altındaki inaktivasyonlarda literatürde daha önce bahsedilen hücre zarı ve hücre duvarının herhangi bir değişikliğe uğramadığını, bakteri ölümlerinin bu basınçlarda ribozomların bozulmasından ileri geldiğini 300 MPa'nın üzerindeki basınçlarda da ribozom bozulmalarının yanında yapısal bozulmalarında olduğu gösterilmiştir.

Araştırmanın ikinci kısmında ise, basınç sonrası değişik sıcaklıklarda (4, 22 ve 30°C) saklanan numunelerde, seçilen patojenlerin tekrar çoğalıp çoğalamayacağı araştırılmıştır. Özellikle düşük asitli gıda maddelerinde (süt gibi) basınç sonrası yaralanmış (injured) bakterilerin kolayca kendilerini tamir ederek aktif hale gelebilme ihtimallerinin gıda tüketicilerinde yaratabilecekleri risk araştırılmıştır. Çalışmalar sütte bulunan bu patojenlerin basınç sonrası özellikle düşük basınçlarda (250 MPa) her sıcaklıkta kendilerini belli sürelerde tamir edebileceklerini ve risk yaratabileceklerini göstermiştir. Bu durum portakal sularında gözlenmemiştir. Araştırmalar bu yaralanmaların 300 MPa ve üzerinde iki tür olduğunu ve bunlardan birinin (ribozomlar) tamirinden önce ikinci yapısal tamirin olamayacağını ve bu nedenle proses sonrası yapılan mikrobiyel sayımların yanıltıcı olduğunu göstermiştir. Bu tür yaralanmalar içinde bir mekanizma önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yüksek sıvı basınç, inaktivasyon, patojen.

Abstract

The main purpose of this study is to analyze the effect of High Hydrostatic Pressure (HHP)- which is a food processing technique recently been used in food industry- on selected foodborne pathogens.

The main effort throughout the study was focused on the bacterial inactivation mechanism(s) resulted by HHP treatment. After treating bacteria at a pressure range of 250 to 500 MPa, the bacterial cultures was analyzed using DSC, SEM and TEM. The results revealed that, the inactivation created by pressures up to 300 MPa was primarily due to ribozomal disintegration not structural damage-an outcome new to literature up to date. On the opposite, the bacterial inactivation mechanism resulted after HHP treatment of 300 MPa and higher was due to mainly damage in the cell structure in addition to ribozomal disintegration.

In the second part of the project, the possibility of recovery of pressure injured cells at different storage temperatures (4°C, 22°C and 30°C) was investigated. This would prove the possible risk or potential of recovery of pressure induced cells especially found in low acid foods such as milk during the storage period. If these cells could recover and become active during the storage period, tthis would be a main thread of food safety. This phenomenon was not observed for orange juice. The results of the study proved us that at pressures of 250 MPa or lower, all pressure injured cells in milk was recovered and became active creating a major risk in termes of food safety. However, at pressure of 300 MPa and higher, two main types of injury recovery was observed. Among these recoveries, it was found that the second type could take place only if the first type recovery (where ribozomal injury is recovered) is completed. Therefore, it is a high possibility that the microbial counts taken just after HHP treatment could be misleading if the suggested mechanism is valid. At the end of the study, a different mechanism for such a type of injury is proposed.

Keywords: HighHydrostatic Pressure, inactivation, pathogen

Araştırma Projesi Ana Metni

1. Giriş

1.1. Yüksek Sıvı Basınç Prosesi

Gıda endüstrisinde yüksek kalite sağlayan ve daha ucuz olabilecek gıda işleme sistemleri devamlı olarak araştırılmaktadır. Tüketicilerin tercihinde, daha az işlem görmüş, içinde katkı koruyucuları bulunmayan ürünler yönündedir. Bu nedenle yüksek sıvı basınç prosesi gıdalarda kaliteyi en yüksek tutabilen ve herhangi bir koruyucu gerektirmeden insan sağlığına ve gıdanın bozulmasına etki eden mikroorganizmaların inaktivasyonu için kullanılacak bir sistem olarak gösterilmektedir.

HHP'nin gıdalarda kullanılması ilk olarak 1899'da Hite tarafından uygulanmış fakat zamanında fazla ilgi gösterilmemiştir. Hite yaptığı çalışmalarda sütün 600 MPa'da bir saat tutulması sonucu çiğ sütün raf ömrünün dört gün uzatılabileceğini göstermiştir (Hite et al., 1899). Bunun yanında aynı zamanlarda yapılan çalışmalar meyve sularında bu sürenin 5 seneye kadar uzayabileceğini göstermiştir.

Hite'nin çalışmalarını referans gösteren Cruess (1929) bu sistemin meyve sularında endüstriyel olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Bu başarılı çalışmalara rağmen HHP ile işlenmiş gıda ürünlerinin piyasaya çıkması yaklaşık 70 yıl almış ve ilk HHP ile işlenmiş meyve suları 1991 yılında Japonya'da piyasaya çıkmıştır.

Pascal prensiplerine göre HHP'nin etkisi çok kısa sürede olmakta ve gıdanın yapısı veya geometrisine göre bağımsızlık göstermektedir. Genelde suyun kullanıldığı basınç ileten bir ortamda oda sıcaklıklarından yapılan işlem, daha önce kullanılan ve ısıya dayanan işlemlerdeki enerji gereksinimini minimuma indirmektedir.

Yüksek sıvı basıncı ile yapılabilecek işlemler:

- mikroorganizmaların inaktivasyonu (Hoover et al., 1989)
- biopolimer modifikasyonu; protein denaturasyonu (Heremans, 1982); enzim inaktivasyonu ve aktivasyonu (Morild, 1981); jel formasyonu (Cheftel, 1991); parçalanmaya etkisi (Okamoto, 1991); veya ekstraksiyon (Krubayashi ve Hayashi, 1991).

- sadece kovalent olmayan bağların parçalanması özelliği ve kalitenin korunması (tat ve renk gibi) (Hayashi, 1989)
- ürün fonksiyonlarının geliştirilmesi (Farr, 1990; Deuchi ve Hayashi, 1991)

HHP'nin gıdalarda yapı ve besi değerlerini değiştirmeden mikroorganizmaları öldürmesi yeni bir gıda işleme sistemi olarak geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Bunu yanında, HHP az enerji gerektiren, çevre dostu, minimum sanitasyona ihtiyacı olan ve antimikrobiyal etkisi çok 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. Zaman ve kütlede bağımsızdır ve bunun için işlem zamanı minimuma inmektedir.

Tüm bunlara rağmen sistemin kendine has dezavantajları da bulunmaktadır. Bakteri, küf ve mayaların düşük basınçlarda inaktive edilmelerine karşın bakteri sporlarının inaktivasyonu için daha yüksek basınçlar gerekmektedir. Çok yüksek basınçlara çıkılan sistemler ise hem pahalı hem de metal yorulmasına bağlı olarak daha sık bozulabilmekte ve bunu için endüstriyel kullanımları ekonomik olarak şu an mümkün görünmemektedir. Bu nedenle limitli bir kullanım alanı vardır.

1.2. HHP'nin mikroorganizmalar üzerindeki etkisi

HHP mikroorganizmaların genetik yapısı, metabolik aktivitesi, biyokimyasal aktivitesi, hücre duvar yapısı gibi birçok faktörü etkilemektedir.

1.2.1. HHP'nin hücre yapısı üzerine etkisi

HHP'nin hücre yapısını önemli şekilde etkileyerek mikroorganizmaların büyüme ve çoğalmasını etkilediği bilinmektedir. 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 etkilenmektedir (Cheftel, 1995; Alpas et al., 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 gözlenmektedir (Mackey et al., 1995; Stewart et al., 1997).

1.2.2. Biyokimyasal reaksiyonlar

Basınç, biyokimyasal reaksiyonları, gerekli hacmin azaltılması veya reaksiyonlardaki polimerik yapıları üçlü boyuttaki yapılarının değişmesi sonucu azaltır veya durdurur. Özellikle yapılardaki hidrojen bağlarının etkilenmesi proteinlerin jelimsi yapılarının bozulmasına neden olmakta ve reaksiyonların durmasına yol açmaktadır. Bu tür değişimler bazen kalıcı olmasına rağmen genellikle geri dönüşümlü olmaktadır (Elgasim ve Kennick, 1980). Basıncın bazı enzimlerin aktivitelerini arttırdığıda görülmüştür (Fukuda ve Kunugi, 1985).

1.2.3. Genetik mekanizmaları

DNA yapısı nedeni ile bulundurduğu çok sayıdaki hidrojen bağı ve heliks yapısı ile basınca dayanıklılık gösterirken ribozomların basınçtan daha çok etkilendikleri gözlenmektedir. Bakterilerde 30 S ribozomlarının basınçtan en çok etkilendikleri bulunmuştur (Smith ve Pintauro, 1981). Ribozomların denatürasyonu protein sentezini önlediği için bazı mikroorganizmalar yaşama ve çoğalma olanaklarını bulamamaktadır. Ribozom denatürasyonu belli şartlarda ve zamana bağlı olarak kendini tamir edebilme özelliğini taşımaktadır (Alpas ve ark., 2003).

1.2.4. Hücre zarı ve duvarı

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).

Hücre duvarı bakterilerin hücre şeklini verdiği gibi hücreye yapısal bir sağlamlık verir. Bu yapının 300 MPa'a kadar fazla etkilenmediğini fakat daha yüksek basınçlarda ise fiziksel bir bozulmanın olduğu gözlenmiştir.

2. Düzenek ve yöntem

2.1. Yüksek sıvı basınç sistemi

Tipik bir HHP sisteminde, yüksek basınca dayanıklı bir ana yapı ve kapatma sistemleri, basınç sağlayacak bir pompa, sıcaklığı kontrol eden bir ısıtma ünitesi bulunur (Şekil 2.1). Sistemin en önemli parçası içine numunelerin konduğu ve istenilen yüksek basıncı tutabilecek özellikte olan kısımdır. Basınca dayanıklı naylon poşetlerde veya viallerde basınç odasına konan numune bu odada istenilen sıcaklıkta istenilen süre için belli bir basınca tutulur. İzostatik basınç sıvısı olarak da genellikle su kullanılmaktadır. Basınçlama sırasında numune ve basınç sıvısında hava kalmamasına dikkat edilmelidir.

Basınç sistemleri genellikle kesikli sistemler olmasına rağmen, son senelerde kombine sistemlerin geliştirilmesi ile süt ve meyve suyu gibi sıvı ürünlerin yarı kesikli sistemlerde sürekli sistemlere benzer bir şekilde işlemek mümkün olmaktadır.

2.2. Yaralı mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar yapılan işlemler sonucunda inaktive olabilirler, yaşayabilirler veya tekrar aktive olabilecek şekilde yaralanabilirler. Yapılan işlem sonucunda 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 çıkmakta ve değişik mekanizmalarla tamir edilmektedir. Çalışmalar metabolik yaralanmaların tamir edilmeden yapısal yaralanmaların tamir edilmeyeceğini göstermektedir.

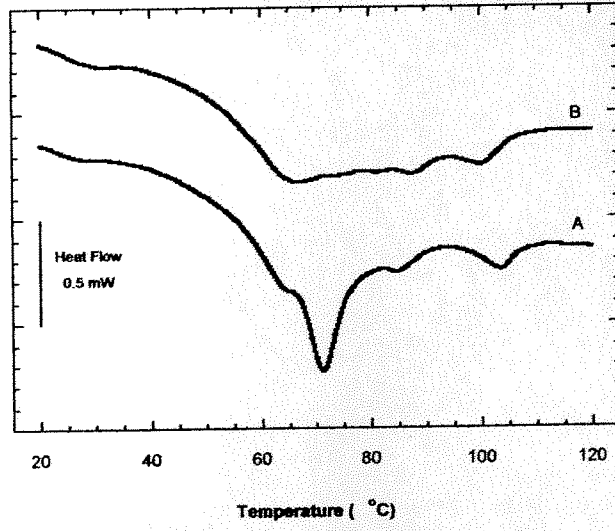
3. Bulgular ve Değerlendirme

3.1. *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7'nin Yüksek Hidrostatik Basınç Hassaslığının Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Değerlendirilmesi

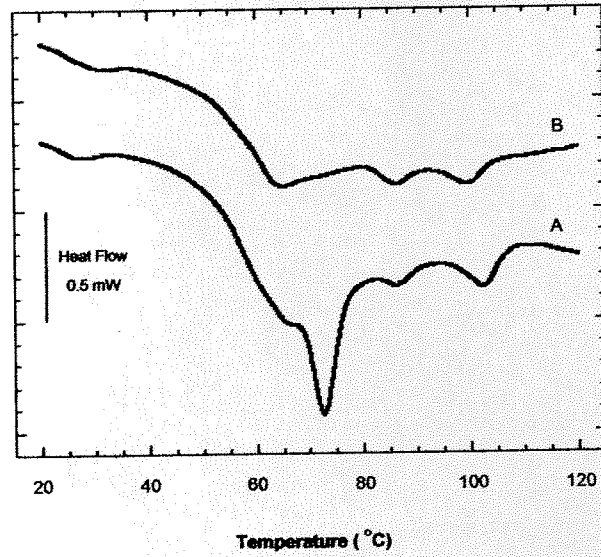
YHB 'nin bakteriler üzerindeki etkisi birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Bununla beraber literatürde YHB'nin hücrelerde yol açtığı geri dönüşümsüz değişiklikler ve bunların sonucu oluşan hücre ölümleriyle ilgili pek az çalışmaya rastlanmaktadır. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK), genel olarak bakterilerde ısı kaynaklı değişimlerin belirlenmesinde kullanılmakta ve hücre yaralanması ya da ölümü ile hücresel komponentlerin stabilitesi arasındaki ilişki değerlendirilebilmektedir. Bu çalışmada DTK, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7'nin YHB uygulamasına hassaslıklarını göstermek amacıyla kullanılmıştır. YHB işlemi sonunda oluşan canlılık kaybı ölçülmüş ve elde edilen kalorimetrik veri ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen termogramlar incelendiğinde (Şekil 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 ve 3.1.4) Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için kontrol termogramlarının farklı oldukları ancak aynı bakterinin farklı suşları için böyle bu farkın ortadan kalktığı görülmektedir.

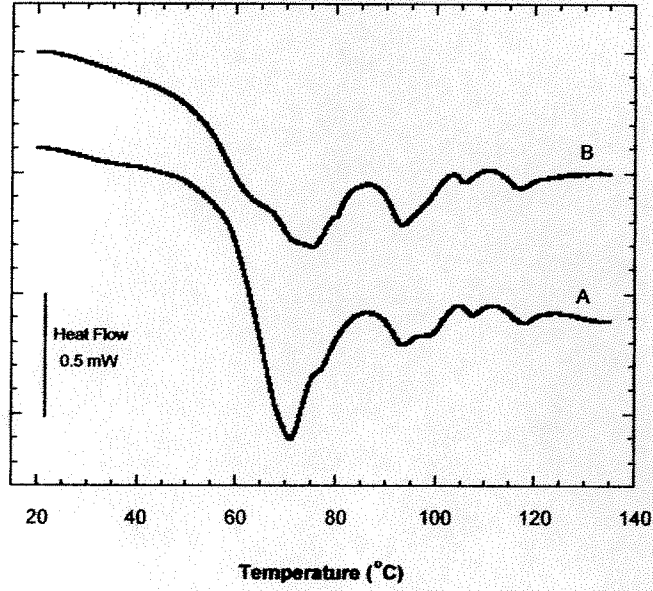
Hücresel komponentlerin ısıya bağlı değişimlerinin ölçümünü sağlayan belirgin enthalpi (J/g) değerleri incelendiğinde (Tablo 3.1) her iki bakteri türü ve her bakterinin farklı suşları için değerlerin benzer oldukları görülmektedir.



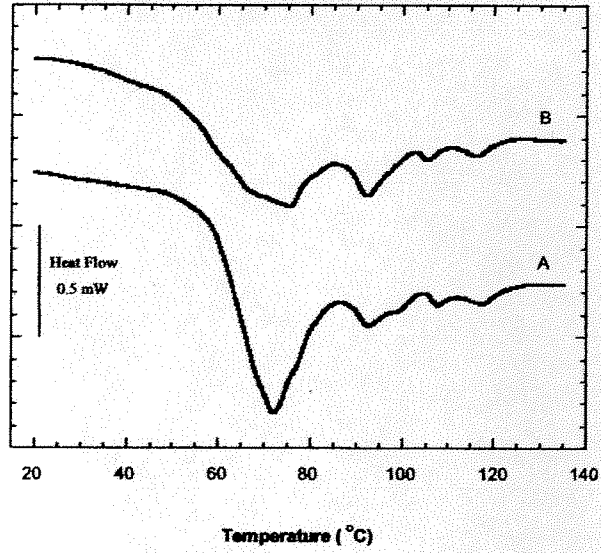
Şekil 3.1.1. *S. aureus* 485 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika)



Şekil 3.1.2. *S. aureus* 765 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika)



Şekil 3.1.3. *E. coli* O157:H7 933 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika)



Şekil 3.1.4. *E. coli* O157:H7 931 DTK termogramları A) kontrol B) YHB işlemi sonrası (345 MPa, 35°C, 10 dakika)

Tablo 3.1. Kontrol ve YHB uygulanmış hücrelerin belirgin enthalpy ve canlılık verileri

Bacteri	Belirgin Enthalpi (J/g)	Belirgin Enthalpideki fraksiyonel azalma ($\Delta H_0 - \Delta H$) / ΔH_0	Canlı hücre (cfu/ml)	Log canlılık kayı -Log ₁₀ (N/N ₀)
<i>S. aureus</i> 485, kontrol	4.0		1.6 x 10 ⁹	-
<i>S. aureus</i> 485,345 MPa	2.7	0.32	5.0 x 10 ⁶	2.5
<i>S. aureus</i> 765, kontrol	3.8		2.0x10 ⁹	-
<i>S. aureus</i> 765, 345 MPa	2.4	0.37	1.6 x 10 ⁶	3.1
<i>E. coli</i> 933, kontrol	3.7		2.0 x 10 ⁹	-
<i>E. coli</i> 933, 275 MPa	2.8	0.24	2.0 x 10 ⁷	2.0
<i>E. coli</i> 931 Control	3.7		1.3 x 10 ⁹	-
<i>E. coli</i> 931, 275 MPa	2.7	0.27	6.3 x 10 ⁶	2.3

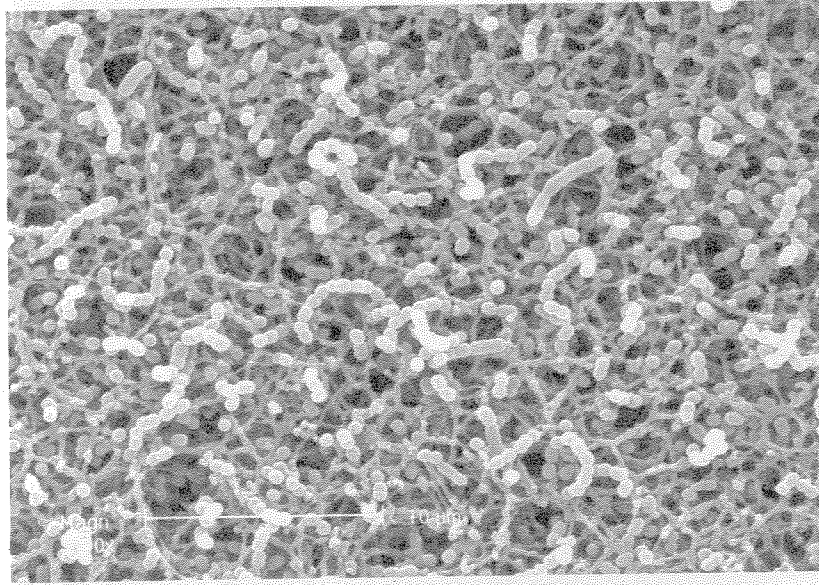
Hem belirgin entalpi değerlerinden hem de canlılık kaybı verilerinden *S. aureus* 485 suşunun *S. aureus* 765 suşuna oranla YHB işlemine karşı daha dirençli olduğunu söylemek mümkündür (Tablo 3.1.)

Bu çalışma sonuçları, bakterilerin YHB direnç değişimlerinin kalorimetrik veri ile kuantitatif olarak kanıtlanabileceğini göstermiştir. DTK ile ölçülen belirgin entalpi değerlerinin YHB işlemi sonrasında düşmesindeki temel nedenin hücrelerin ribozom inaktivasyonları ve canlılık kaybı olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla beraber, ısısız ve basınca bağlı ribozom denatürasyonunun birbirlerinden tamamen farklı mekanizmalara sahip oldukları özemsenerik bakterilerin ve/veya aynı bakterinin farklı suşlarının ısı ve basınç dirençlerinin tamamen farklı olabileceği vurgulanmıştır. Bu önemli özellik belirgin bakterilerin inaktivasyonunu hedefleyen gıda süreçlerinin tasarımında kritik bir faktör olarak gözönünde tutulmalıdır.

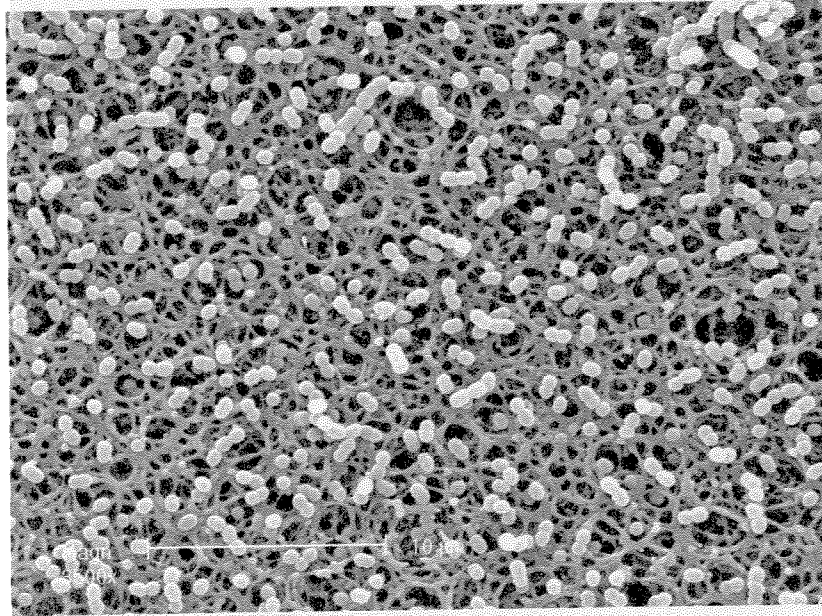
3.2. *Leuconostoc mesenteroides*'de Yüksek Hidrostatik Basınç sonucu Oluşan Yapısal Değişimlerin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada YHB uygulaması sonrasında *Leuconostoc mesenteroides* hücrelerinde 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

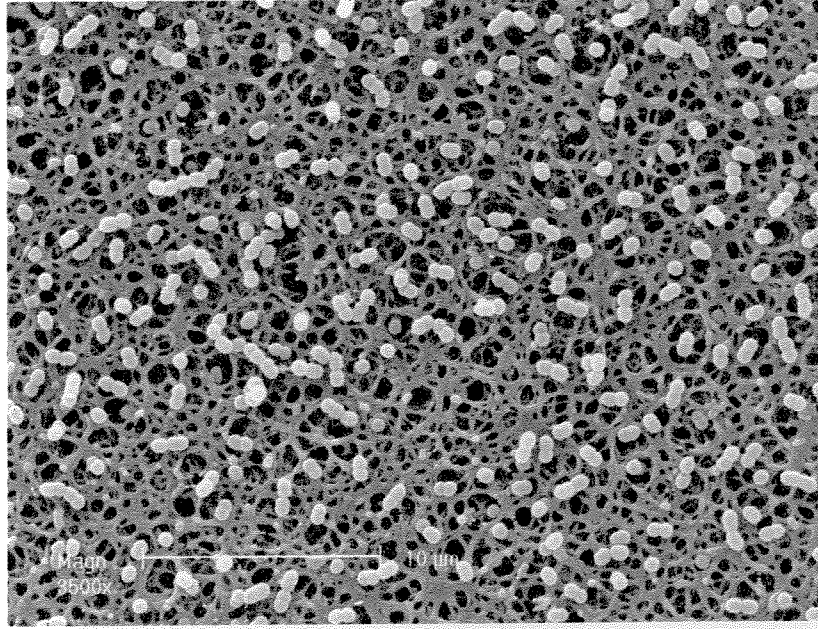
değişimler yarattığını göstermektedir. Basınç uygulanmamış kontrol resimlerinde görülen 3 ve daha fazla hücreden oluşan hücre zincirlerinin basınç arttıkça azaldıkları ve tipik hücre aranjmanlarının ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 3.2.1). Basınç uygulanmamış hücrelerin daha düzgün yüzeysel yapıya sahip oldukları ancak 500 MPa basınç işlemi sonucu yüzeyde pürüzler ve çatlaklar oluştuğu hatta su toplamış kabarcıklı yapıya benzer kalıcı yapıların oluştuğu görülmektedir (Şekil 3.2.2). Bu yapıların özellikle lentikular hücrelerin bölünme yerlerine paralel sıralandıkları saptanmıştır.



a) kontrol

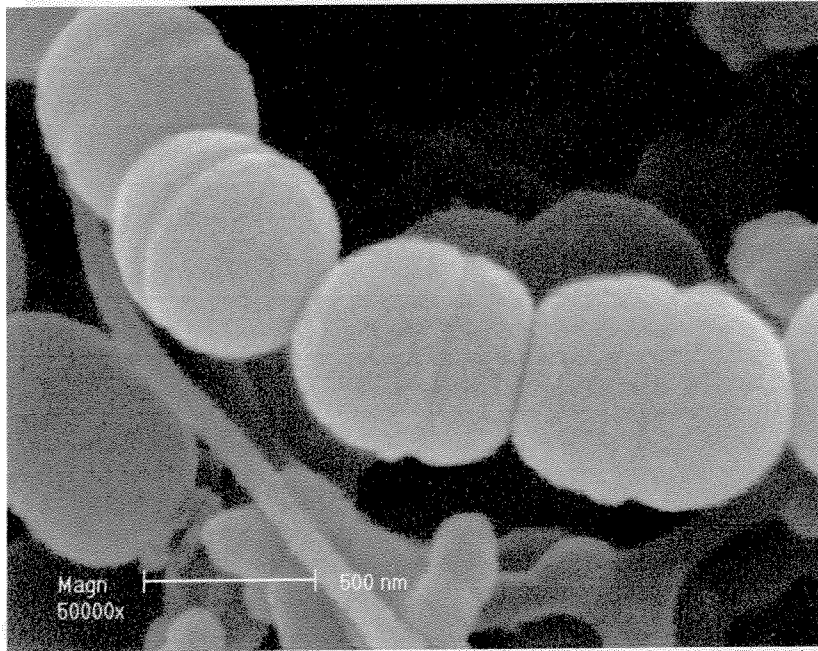


b) 250 MPa, 35°C, 5 dakika

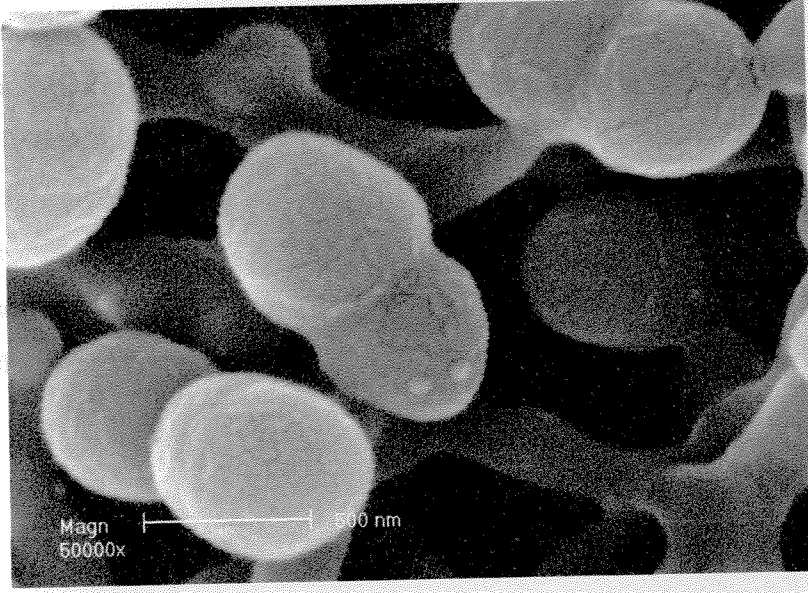


c) 500 MPa, 35°C, 5 dakika

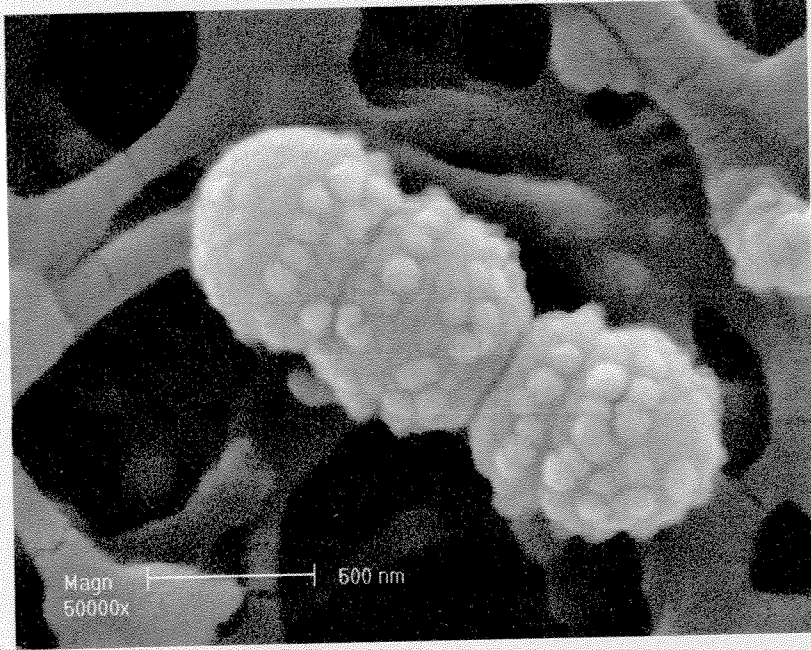
Şekil. 3.2.1. *Leuconostoc mesenteroides* SEM mikrografları. Tüm mikrograflar 3500 kere büyütülmüştür.



a) kontrol



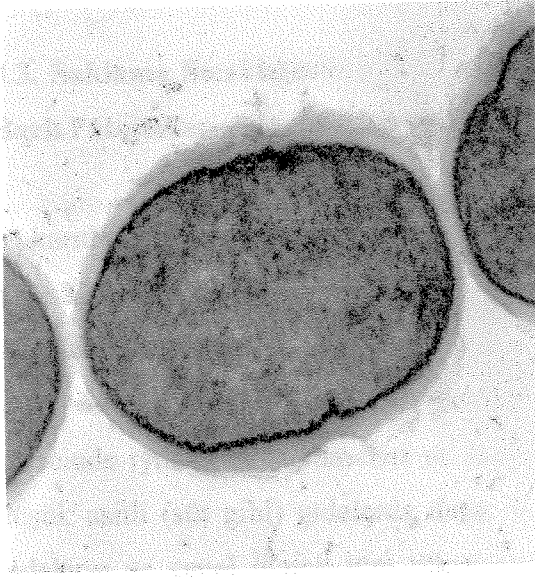
b) 500 MPa



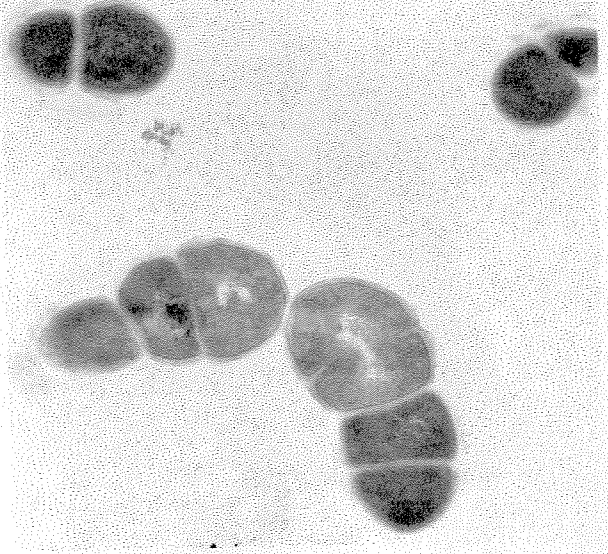
c) 500 MPa, 35°C, 5 dakika

Şekil. 3.2.2. *Leuconostoc mesenteroides* SEM mikrografları. Tüm mikrograflar 50000 kere büyütülmüştür.

TEM fotomikrograflarında rastlanan en önemli değişikliğinse hücre membranı disintegrasyonu ve sitoplazmadaki elektron yoğun alanın genişlemesi olduğu görölmüştür (Şekil 3.2.3). 35 derecede 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 not edilmiştir. Aynı sıcaklık-zaman kombinasyonunda uygulanan 500 MPa'lık basınç ise hücre membranının tamamen parçalanmasına ve sitoplazmik maddelerin ve nükleoid bölgenin bütünüyle kaybına yol açmıştır.



a)



b)



c)

Şekil. 3.2.3. *Leuconostoc mesenteroides* TEM mikrografları a) kontrol b) 250 MPa, 35°C, 5 dakika, c) 500 MPa, 35°C, 5 dakika.

Özetle projenin bu kısmında elde edilen verilerle YHB uygulaması sırasında hücrenin dış ve iç yüzeyinde oluşan değişimler SEM ve TEM fotomikrograflarıyla gösterilmiştir. Hücre membranı ve sitoplazmik hücresel komponentlerin YHB ile olumsuz ve geriye dönüşümsüz etkilendikleri ve bu sırada meydana gelen karmaşık bir dizi olay sonucu basınç uygulamasının hücre yaralanmasına ve hatta ölümüne yol açabildiği görülmüştür. YHB işlemi sırasında hangi olayların meydana geldiği ve hücre ölümünün nelere bağlı olarak oluştuğunun belirgin olarak anlaşılması bu işlemin kullanımındaki optimal basınç-sıcaklık-zaman gibi parametrelerin seçilmesinde yol gösterici olacaktır.

3.3. Saklama Sıcaklığının YHB Uygulanmış Sütte ve Portakal Suyunda Bulunan Gıda Bazlı Patojenlerin Yaralanma/İyileşme Süreci Etkisi

Yukarıda belirtilen çalışmalarda YHB'nin bakteriler üzerindeki yaralanma ve ölüm mekanizmaları incelenmişti. Bu çalışmada ise gıdaların YHB uygulaması sonucunda saklama süreçlerinde oluşabilecek mikrobiyel gelişmeler çalışılmıştır. 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 (süt gibi) gıdalarda daha da önem kazanmakta ve gıda bazlı patojenler bu tip gıdaların ve genel olarak tüm tüketicilerin güvenliğini tehdit etmektedir. Bununla birlikte, YHB işlemi sonucunda oluşabilecek bu tip bir yaralanma yüksek asitli gıdalar için bir avantaj olarak kullanılabilir. Çalışmada portakal suyunda patojenlerin büyümemesi ve yaralanmalarının görülmemiş olması bu varsayımı desteklemektedir. Bu tip gıdaların daha düşük basınca tabi tutulması ve oluşabilecek yaralı hücrelerin büyümesinin gıdada bulunan yüksek asitli ortam tarafından engellenmesi olasıdır. Bu anlamda, projenin bu son aşamasında YHB uygulanmış sütte bulunan yaralanmış gıda bazlı patojenlerin raf ömrü sürecinde saklama sıcaklığına bağlı iyileşme süreçleri ve mekanizmaları incelenmiştir.

Çalışmada gıda bazlı *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* suşları kullanılmış ve YHB işlemi sonrası oluşan hücrelerin durumu:

- Aktif hücreler (AC): selektif ve selektif olmayan ortamda görünür koloni oluşturan hücreler;
- birincil yaralanma (I1): selektif ortamda büyüemeyen ancak selektif olmayan ortamda büyüyen hücreler;

- ikincil yaralanma (I2): başlangıçta hem selektif hem de selektif olmayan ortamda büyüemeyen ancak saklama sürecinde önce selektif olmayan ortamda daha sonra da selektif ortamda büyüme gösteren hücreler olarak tanımlanmıştır.

Saklama sıcaklığı olarak 4, 22 ve 30°C kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.3.1-2-3 ve 4'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3.1. Saklama sürecinde sütte *L. monocytogenes* CA'nın iyileşmesi

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Saklama sıcaklığı (°C)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(+/+) ^a	4	-	-	-
		22	-	-	-
		30	-	-	-
450	(+/-)	4	-	1 ^b	-
		22	-	1	-
		30	-	1	-
550	(- / -)	4	-	-	6
		22	-	-	1
		30	-	-	1

^a Ortamdaki büyüme olması (+) veya olmaması (-)

^b Hücresel transformasyonun gerçekleşmesi için gereken süre (gün olarak)

- ikincil yaralanma (I2): başlangıçta hem selektif hem de selektif olmayan ortamda büyüemeyen ancak saklama sürecinde önce selektif olmayan ortamda daha sonra da selektif ortamda büyüme gösteren hücreler

olarak tanımlanmıştır.

Saklama sıcaklığı olarak 4, 22 ve 30°C kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.3.1-2-3 ve 4'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3.1. Saklama sürecinde sütte *L. monocytogenes* CA'nın iyileşmesi

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non- selektif/selektif)	Saklama sıcaklığı (°C)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(+/+) ^a	4	-	-	-
		22	-	-	-
		30	-	-	-
450	(+/-)	4	-	1 ^b	-
		22	-	1	-
		30	-	1	-
550	(-/-)	4	-	-	6
		22	-	-	1
		30	-	-	1

^a Ortamdaki büyüme olması (+) veya olmaması (-)

^b Hücresel transformasyonun gerçekleşmesi için gereken süre (gün olarak)

Tablo 3.3.2. Saklama sürecinde sütte *S. enteritidis* FDA'nın iyileşmesi

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Saklama sıcaklığı (°C)	Gün I2'den II'e	Gün II'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(+/–) ^a	4	-	4 ^b	-
		22	-	1	-
		30	-	1	-
450	(+/–)	4	-	-	-
		22	-	1	-
		30	-	1	-
550	(+/–)	4	-	-	-
		22	-	10	-
		30	-	10	-

^a Ortamdaki büyüme olması (+) veya olmaması (-)

^b Hüresel transformasyonun gerçekleşmesi için gereken süre (gün olarak)

Tablo 3.3.3. Saklama sürecinde sütte *S. aureus* 485'in iyileşmesi

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Saklama sıcaklığı (°C)	Gün I2'den II'e	Gün II'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(–/–) ^a	4	15 ^b	-	-
		22	1	2	-
		30	1	2	-
450	(–/–)	4	-	-	-
		22	1	2	-
		30	1	2	-
550	(–/–)	4	-	-	-
		22	1	3	-
		30	1	3	-

^a Ortamdaki büyüme olması (+) veya olmaması (-)

^b Hüresel transformasyonun gerçekleşmesi için gereken süre (gün olarak)

Tablo 3.3.4. Saklama sürecinde sütte *E coli* O157:H7 933'ün iyileşmesi

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Saklama sıcaklığı (°C)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(+/-) ^a	4	-	1 ^b	-
350	(+/-) ^a	22	-	1	-
350	(+/-) ^a	30	-	1	-
450	(-/-)	4	8	-	-
450	(-/-)	22	-	-	1
450	(-/-)	30	-	-	1
550	(-/-)	4	-	-	-
550	(-/-)	22	-	-	-
550	(-/-)	30	-	-	-

^a Ortamdaki büyüme olması (+) veya olmaması (-)

^b Hücresel transformasyonun gerçekleşmesi için gereken süre (gün olarak)

Genel olarak basınç hücrenin hangi bölgesine spesifik olarak etki ettiği bilinmemekle beraber, hücre duvarı, sitoplazmik membran, DNA, RNA ve hücre içi ve mebrana bağlı enzimlerin basınçtan etkilendikleri bildirilmektedir (Simpson ve Gilmour, 1997; Ritz ve ark., 2000). Özellikle düşük asitli gıdalarda bulunabilecek yaralı bakteriler, uzun raf ömrü gözönüne alındığında iyileşerek önemli bir güvenlik problemi yaratabilirler. Elde edilen verilerden bu tip aktif patojenlerin (YHB işlemi sonrası tamamen ortadan kaldırıldığı düşünülse bile) basınca konu gıdada bulunabilme ihtimali olduğu görülmüştür.

Elde edilen hücre yaralanmalarının bakteri türüne ve uygulanan basınç büyüklüğüne bağlı oldukları ve önerilen I2 türü metabolik yaralanmanın tamirinin, hücrenin tekrar aktif hale gelebilmesi için kritik bir mekanizma olduğu bulunmuştur. I2 tip yaralanmanın onarılmasını takiben (I2'den I1'e) kolonilerin selektif ortamda büyüebildikleri ve ancak bir faz sonra (I1'den AC'ye) selektif olmayan ortamda büyümelerinin mümkün olduğu görülmüştür.

Literatürde basınca bağlı yaralanmanın iyileşmesi üzerine oldukça fazla çalışma olmakla birlikte, basınç işlemi sonrasında saklama sürecinde oluşabilecek potansiyel iyileşme ve varsa bunun mekanizması hakkında çalışma bulunmamaktadır.

Projenin bu aşamasında elde edilen bulgular, bakteriye ve uygulanan basınca bağlı olarak bazı hücrelerin basınç işleminden zarar görmeden sıyrılabildiklerini (aktif hücreler; AC); bazı hücrelerin yapısal yaralanmaya (hücre duvarı ve/veya hücre membranı bütünlüğünün kaybı) uğrayarak (birincil yaralanma); bir kısmının da metabolizmalarının yaralandığını (ikincil yaralanma) göstermiştir. Bu anlamda I2 türü yaralanma (ikincil yaralanma) basınç işleminin hemen ardından gözlenmeyebilir. Bu da yaralanmanın iyileşmesini takiben potansiyel olarak I2'den I1'e ve oradan da aktif hücreye dönüşebilecek patojen düşünüldüğünde büyük bir gıda güvenliği tehdidi oluşturabilir. Böyle bir tehdidi önlemek için raf ömrü çalışmalarının bu tip iyileşme süreçlerini kapsar şekilde tasarlanmaları düşük asitli gıdaların mikrobiyolojik güvenilirliklerini arttıracaktır.

4. Sonuçlar ve Tartışma

4.1. Yapraklar

YHB sıcaklığa basınca ve ürüne bağlı olarak gıdalarda bulunması muhtemel patojenler üzerinde değişik etkiler göstermektedir. Yapılan çalışmalar basıncın 300 MPa'ın altında kullanılması halinde bakteriyel ölümlere yapısal bozulmalardan daha çok ribozomal bozulmaların yol açtığını ve 300 MPa'ın üzerinde ise ribozomal ve yapısal bozulmaların her ikisinde meydana geldiğini göstermiştir. Düşük basınçların kullanıldığı çalışmalarda (< 300 MPa) gıda maddesinin asitliğine bağlı olarak basıncın etkisi ile popülasyonda bulunan yaralanmış hücrelerin saklama sıcaklığına bağlı olarak sütte (pH = 6.70) zamanla düzelerek aktif hücrelerin oluşması ve büyümesi gözlenmiş fakat portakal suyunda ise (pH = 3.70) bu düzelmelerin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar YHB'nin hücreler üzerindeki etkisinin iki aşamalı olduğunu ve özellikle 300 MPa'nın altındaki işlemlerde meydana gelebilecek yaralanmaların saklama sırasında düşük asitli gıdalarda risk yaratacağını ortaya koymuştur. Bu nedenle gıda risklerinin önlenmesi için YHB çalışmalarının her gıdaya özgün olarak uzatılmış raf ömürleri şeklinde yapılması önemi ortaya konmuştur.

5.2. Tehlikeli ve Potansiyel

Alpas, H., F. Bırcaklı,

Yapılan çalışmaların sonuçları

Yapılan çalışmaların sonuçları

5. Projeden yapılan yayın, tebliğ ve posterler

5.1. Yayınlar

Alpas, H., J. Lee, F. Bozoglu ve 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).

G. Kaletunc, Alpas, H.ve F. Bozoglu, "Evaluation of high hydrostatic pressure induced structural changes in *Leuconostoc mesenteroides*", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), (Şubat 2004).

Faruk Bozoglu, Hami Alpas ve Gönül Kaletunç, "Effect of storage temperature on injury recovery of foodborne pathogens in High Hydrostatic Pressure (HHP) treated milk", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40(2), 231-235 (2004).

5.2. Tebliğ ve Posterler

Alpas, H., F. Bozoglu, J. Lee ve G. Kaletunç, "Studies on the effect of high hydrostatic pressure (HHP) on cell morphology of *Leuconostoc mesenteroides* with scanning electron microscopy (SEM)", *IFT Annual Meeting, Anaheim, California, 61C-25, 149, IFT, 2002.*

Referanslar

Alpas, H. ve F. Bozoglu, 2000. 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.

Alpas, H., J. Lee, F. Bozoglu ve G. Kaletunc, 2003. 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.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P. and Ray, B. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9), 4248-4251.

Alpas, H., N. Kalchayanand, F. Bozoglu ve B. Ray, 2000. 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.

Cheftel, J.-C. 1991. Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. *Actualité des Industries Alimentaires et Agro-Alimentaires*. 108(3), 487-491.

Cheftel, J.-C. 1995. High pressure, microbial inactivation and food preservation, *Food Science and Technology*. 1, 75-90.

Chong, G. and Cossins, A.R. 1988. A differential polarized fluorometric study of the effects of high hydrostatic pressure upon the fluidity of cellular membranes. *Biochemistry*. 22, 409-412.

Cruess, W.v. 1924. Commercial Fruit and Vegetable Products. Mc-Graw Hill Book Co., Inc., New York.

Deuchi, T. and Hayashi, R. 1991. Pressure application to thawing of frozen foods and to food preservation under sub-zero-temperature. *In: High Pressure Science for Food*. Edited by Hayashi, R. pp 101-110. San-ei Pub. Co., Kyoto, Japan.

Elgasim, E.A. and Kennick, W.H. 1980. Effects of pressurization of prerigor beef muscles on protein quality. *Journal of Food Science*. 45, 1122-1124.

Farr, D. 1990. High pressure technology in the food industry. *Trends in Food Sci. Technol.* 1, 14-16.

Fukuda, M. and Kunugi, S. 1984. Pressure dependence of thermolysin catalysis. *Eur. J. Biochem.* 142, 565-570.

Heremans, K. 1982. High Pressure Effects on Proteins and Other Biomolecules. *Ann. Rev. Bioeng.* 11(1), 1-21.

Hite, B. H. 1899. The effect of pressure in the preservation of milk. *W. Virginia Agricultural Experiment Station Bull.* 58, 15-35.

Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. and Knorr, D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* 43(3), 99-107.

Knorr, D. 1993. Effect of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* 47(6), 156-161.

Kuribayashi, T. and Hayashi, R. 1991. Extraction of pectin by high pressure treatment. *In: High Pressure Science for Food*. Edited by Hayashi, R. pp. 101. San-ei Pub. Co., Kyoto, Japan.

Mackey, B.M., Forestiera, K. and Isaacs, N. 1995. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotech.* 9(1and2), 1-11.

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. pp. 93-166. Academic Press Inc., London.

Okatomo, M., Hayashi, R., Enomoto, A., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. 1991. High pressure proteolytic digestion of food proteins: Selective elimination of β -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate. *Agric. Biol. Chem.* 55(5), 1253-1257.

Smith, J.L. and Pintauro, N.D. 1981. New preservatives and future trends. *In: Development in Food Preservatives.* Edited by Tilbury, R.H. pp. 137-160. Barking, England, Applied Science Publishers Ltd.

Stewart, C.M., Jewett, F.F., Dunne, C.P. and Hoover, D.G. 1997. Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Safety.* 17, 23-36.

8. Öz (Abstract)

Bu çalışmanın amacı Gıda endüstrisinde kullanılmaya başlayan yüksek sıvı basınç teknolojisinin (HHP) seçilmiş gıda patojenleri üzerine etkilerini araştırılmasıdır.

Bu çalışmada öncelikle HHP'nin bakterilerin inaktivasyon mekanizmasının incelenmesi ele alınmıştır. 250-500 MPa aralığında yapılan çalışmalar, DSC,SEM ve TEM metotları ile incelenmiş ve 300 MPa'nın altındaki inaktivasyonlarda literatürde daha önce bahsedilen hücre zarı ve hücre duvarının herhangi bir değişikliğe uğramadığını, bakteri ölümlerinin bu basınçlarda ribozomların bozulmasından ileri geldiğini 300 MPa'nın üzerindeki basınçlarda da ribozom bozulmalarının yanında yapısal bozulmalarında olduğu gösterilmiştir.

Araştırmanın ikinci kısmında ise, basınç sonrası değişik sıcaklıklarda (4, 22 ve 30°C) saklanan numunelerde, seçilen patojenlerin tekrar çoğalıp çoğalamayacağı araştırılmıştır. Özellikle düşük asitli gıda maddelerinde (süt gibi) basınç sonrası yaralanmış (injured) bakterilerin kolayca kendilerini tamir ederek aktif hale gelebilme ihtimallerinin gıda tüketicilerinde yaratabilecekleri risk araştırılmıştır. Çalışmalar sütte bulunan bu patojenlerin basınç sonrası özellikle düşük basınçlarda (250 MPa) her sıcaklıkta kendilerini belli sürelerde tamir edebileceklerini ve risk yaratabileceklerini göstermiştir. Araştırmalar bu yaralanmaların 300 MPa ve üzerinde iki tür olduğunu ve bunlardan birinin (ribozomlar) tamirinden önce ikinci yapısal tamirin olamayacağını ve bu nedenle proses sonrası yapılan mikrobiyel sayımların yanıltıcı olduğunu göstermiştir. Bu tür yaralanmalar içinde bir mekanizma önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yüksek sıvı basınç, inaktivasyon, patojen.

9. Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler:

Alpas, H., J. Lee, F. Bozoglu ve 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).

G. Kaletunc, Alpas, H.ve F. Bozoglu, "Evaluation of high hydrostatic pressure induced structural changes in *Leuconostoc mesenteroides*", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), (Şubat 2004).

Faruk Bozoglu, Hami Alpas ve Gönül Kaletunç, "Effect of storage temperature on injury recovery of foodborne pathogens in High Hydrostatic Pressure (HHP) treated milk", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40(2), 231-235, (2004).

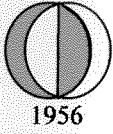
Alpas, H., F. Bozoglu, J. Lee ve G. Kaletunç, "Studies on the effect of high hydrostatic pressure (HHP) on cell morphology of *Leuconostoc mesenteroides* with scanning electron microscopy (SEM)", *IFT Annual Meeting*, Anaheim, California, 61C-25, 149, IFT, 2002.

10. Bilim Dalı

Doçentlik B. Dalı Kodu:ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11. Dağıtım (*):	Sınırlı	Sınırsız ✗
12. Raporun Gizlilik Durumu:	Gizli	Gizli Değil ✗



9 Şubat 2004

Sayın Prof.Dr. Neşet Kılınçer
Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri
Araştırma Grubu
Yürütme Komitesi Sekreteri

Yürütücüsü bulunduğum TOGTAG-NSF-2001/1 nolu projeye ait kesin raporu (Yard. Doç. Dr.Hami Alpas'ın ismi ekli olarak) içeren CDyi ve 2 nüsha kesin raporu ekte bilgilerinize sunarım.

Saygılarımla

Prof.Dr.Faruk Bozoğlu

YİET
Uzmanı
Erin