

**MECHANISM OF INACTIVATION OF MICROORGANISMS
BY PULSED HIGH HYDROSTATIC PRESSURE**

Proje No: 107O309

Doç.Dr. Hami ALPAS
Dr. Sencer BUZRUL
Prof.Dr. Faruk BOZOĞLU
Dr. Mutlu PİLAVTEPE

MAYIS 2010
ANKARA

ÖNSÖZ

2509 kodlu TÜBİTAK-FRANSA PIA BOSPHORUS İŞBİRLİĞİ PROGRAMI kapsamında 01/01/2008 – 31/12/2009 tarihleri arasında Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux - Bordo Üniversitesi ile ODTÜ Gıda Mühendisliği arasında tamamlanan 107O309 nolu projede vurgulu yüksek hidrostatik basınç kullanılarak mikroorganizmaların inaktivasyon mekanizmaları model ve gıda sistemlerinde çalışılmıştır.

TEŐEKKÜR

Proje ekibi olarak TÜBİTAK-TOVAG ve CNRS tarafından ortaklaŐa sağlanan desteğe teŐekkür ederiz.

Proje raporumuzu proje sürecinde kaybettiğimiz Fransız araştırma grubunun değerli üyesi Pierre Thyndiuk'a ithaf ediyoruz.

PROJE GRUBU

Proje yürütücüsü: Doç.Dr.Hami Alpas

Araştırmacılar: Prof.Dr.Faruk Bozoğlu, Dr.Sencer Buzrul, Dr. Mutlu Pilavtepe

İÇİNDEKİLER

Önsöz	2
İçindekiler	5
Tablo ve şekil listeleri	6
Özet	7
Abstract	7
Proje ana metni	8
1. Giriş	8
2. Genel Bilgiler	9
3. Gereç ve Yöntem	11
4. Bulgular ve Tartışma	12
4.1. Tutma zamanı olmadan uygulanan vurgulu yüksek basıncın etkisi	14
4.2. Tutma zamanı uygulanan vurgulu yüksek basıncın inaktivasyona etkisi	15
4.3. Tek ve vurgulu basınç sonrası 4°C'de saklamanın etkisi	17
4.4. Vurgulu basıncın raf ömrüne etkisi	19
5. Sonuç	22
6. Referanslar	23

Tablo ve şekil listeleri

Tablolar

Tablo 4.4.1. Saklama sürecinde portakal suyunda (pH=3.75) <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775'nin iyileşmesi	20
Tablo 4.4.2. Saklama sürecinde portakal suyunda <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090'nin iyileşmesi	21
Tablo 4.4.3. Saklama sürecinde pepton çözeltisinde <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775'nin iyileşmesi	21
Tablo 4.4.4. Saklama sürecinde pepton çözeltisinde <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090'nin iyileşmesi	22

Şekiller

Şekil 1.1 Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) Cihazı Çalışma Şeması	8
Şekil 1.2. Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) Cihazı (FRAMATOME; Fransa)	9
Şekli 2.1. YHB cihazı bilgisayar kontrol sistemi	10
Şekil 4.1. 300 MPa 300 saniye x 1 vurgu için elde edilen basınç ve sıcaklık profili	12
Şekil 4.2. 300 MPa 60 saniye x 5 vurgu için elde edilen basınç ve sıcaklık profili	13
Şekil 4.3 Su, etilen-glikol ve etanol için basınç-sıcaklık profili	14
Şekil 4.1.4 300 MPa, 10 vurgu (300 MPa'a çıkış ve iniş) için elde edilen basınç ve sıcaklık profili	14
Şekil 4.1.5 Şekil 7'de gösterilen profilin her bir vurgu için <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 inaktivasyon değerleri	15
Şekil 4.2.6 300 MPa, 30 saniye x 10 vurgu için elde edilen basınç ve sıcaklık profili	16
Şekil 4.2.7 Vurgulu (1'den 10'a kadar) basınç (300 MPa) <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 inaktivasyon değerleri	16
Şekil 4.3.8 300 MPa, 300 saniye x 1 vurgu'nun ilk üç günlük <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 inaktivasyon değerleri	17

Şekil 4.3.9 300 MPa, 60 saniye x 5 vurgu'nun ilk üç günlük <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 inaktivasyon değerleri	18
Şekil 4.3.10 300 MPa, 30 saniye x 10 vurgu'nun ilk üç günlük <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 inaktivasyon değerleri	18
Şekil 4.4.11. Birincil yaralanma (I1), ikincil yaralanma (I2), aktif hücre (AC) ve ölü hücre (DC) arasındaki muhtemel geçiş mekanizması	20

Özet

Mikroorganizmaların tek vurgulu yüksek hidrostatik basınç (YHB) altındaki mikrobiyal inaktivasyonları daha önce çalışılmış (Alpas 2003; Kaletunc 2004) ve matematiksel modellerle ifade edilmişti (Buzrul ve Alpas, 2004; Buzrul 2005, Avsaroglu 2006). Ancak vurgulu yüksek hidrostatik basınç altında mikroorganizmaların inaktivasyon mekanizmaları ve hızları araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda basınca dirençli *Escherichia coli* ATCC 11775 ve (Garcia-Graells 2000) *Listeria innocua* ATCC 33090 suşlarının peptonlu su ve portakal suyu içerisindeki inaktivasyon mekanizmaları değişik vurgu basınç kombinasyonlarında incelenmiş ve olası yaralanma ve iyileşme mekanizmaları araştırılmıştır. Birden fazla vurgulu ve sabit bekleme süresi olmayan YHB uygulamalarında vurgu sayısı arttıkça mikrobiyal inaktivasyonun ve yaralanma oranının arttığı görülmüştür. YHB sırasındaki uygulama süresinin *Escherichia coli* ATCC 11775 hücrelerinin inaktivasyonunda önemli olduğu ve basınç işlemi sonrası yaşayan hücrelerin %95 oranında yaralanmış olduğu belirlenmiştir. Tek ve birden çok vurgulu YHB işlemi arasındaki inaktivasyon farkı az olsa da bu hücrelerin 4 C'de saklanması sırasında birden çok vurgu uygulanmış olanların daha uzun sürede iyileştikleri gözlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında portakal suyuna inoküle edilmiş hücreler vurgulu YHB işlemi sonrası 37C^de saklanmış ve iyileşme mekanizmaları incelenmiştir. Bu hücrelerin raf ömrü sürecinde aktif hücre haline gelmeleri ciddi bir gıda güvenliği riski doğuracaktır. *Escherichia coli* ATCC 11775'in YHB sonrası I2 tip yaralanma göstermesine rağmen 350, 450 ve 550 MPa basınç işlemini takiben sırasıyla 1, 2, ve 3 gün içerisinde aktif hücre haline geldiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Vurgulu yüksek hidrostatik basınç, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Listeria innocua* ATCC 33090, inaktivasyon mekanizması, portakal suyu

Abstract

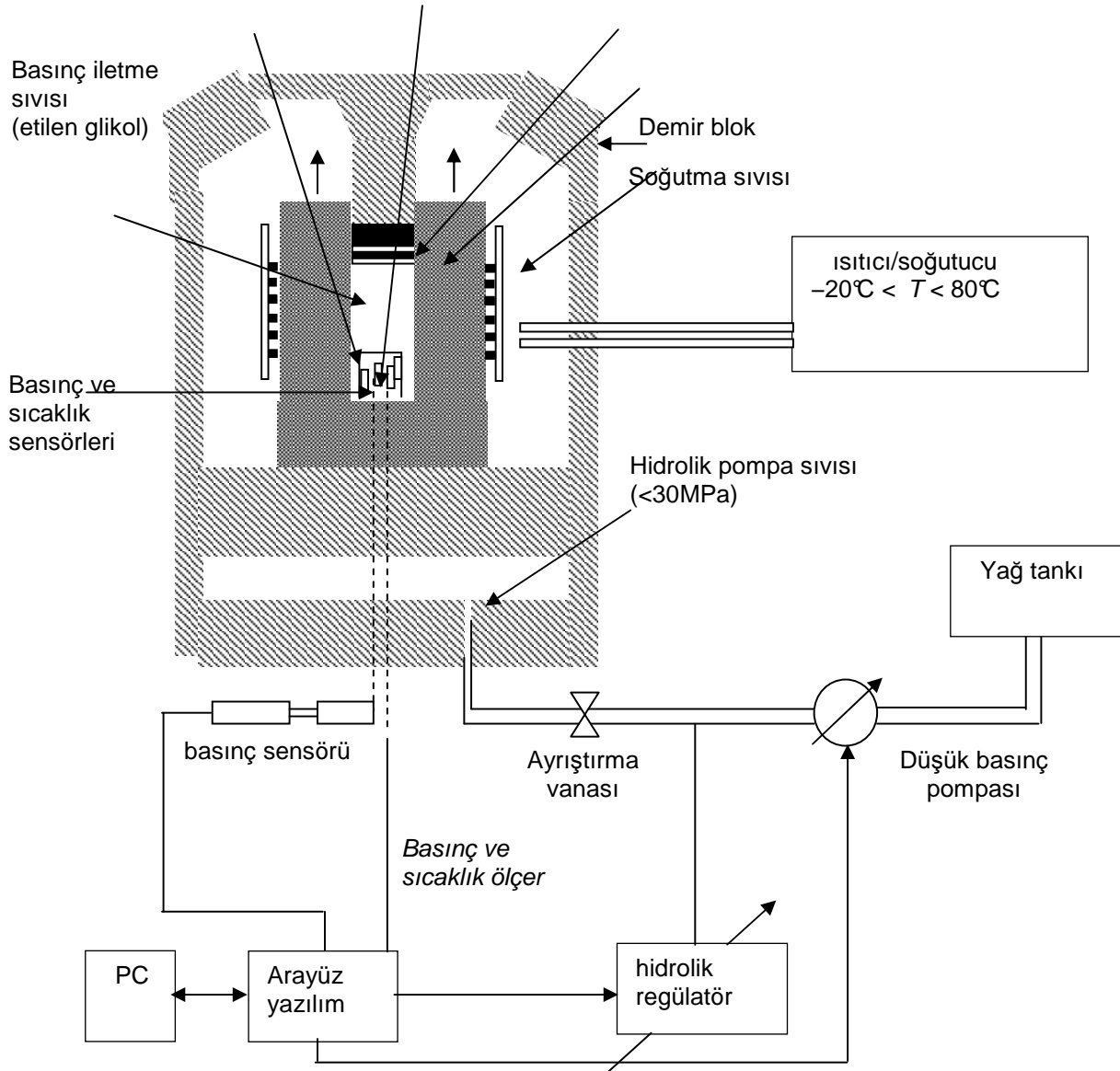
The inactivation mechanisms of microorganisms under one single pressure cycle have been studied (Alpas et al 2003; Kaletunc et al 2004) and some successful mathematical models have been proposed in literature (Buzrul and Alpas, 2004; Buzrul et al 2005, Avsaroglu et al 2006). However the inactivation rates and possible mechanisms under pulsed pressure treatment deserves special interest to be investigated. Therefore, the objective of this study is to investigate the inactivation mechanisms of pulsed HHP inactivation pattern of pressure resistant *Escherichia coli* ATCC 11775 (Garcia-Graells et al., 2000) and pressure resistant *Listeria innocua* ATCC 33090 (Tay et al. 2003) in peptone water and in orange juice by use of pulsed HHP treatment as well as determining the recovery mechanism(s). Multi-pulsed HHP treatment with no holding time indicated that as the pulse number increased the number of inactivated and injured cells also increased. Holding time had significant effect on the inactivation of *E. coli*. *E. coli* cells showed at least 1.6 log₁₀ more reduction on selective medium than the non-selective medium indicating that more than 95 % of the survivors were severely injured for both single- and multi-pulsed treatments with holding time. Although the inactivation difference was low between single- and multi-pulsed HHP treatments, storage at 4 °C revealed there was less recovery from injury for multi-pulsed HHP treatment. In the second part of the project, the possibility of recovery of pulsed pressure injured cells at 37°C in orange juice was investigated. If these cells could recover and become active during the storage period, this would be

a main thread of food safety. *Escherichia coli* ATCC 11775 was found to repair from I2 type injury to become active cells after 1, 2 and 3 days at 350, 450 and 550 MPa; respectively.

Keywords: Pulsed high hydrostatic pressure, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Listeria innocua* ATCC 33090, inactivation mechanism, orange juice

1. Giriş:

Proje kapsamında planlanan Vurgulu Hidrostatik Basınç deneylerinin I. aşaması 10-20 Aralık 2008 tarihinde Bordo Üniversitesi l'de Yüksek Hidrostatik Basınç laboratuvarında tamamlanmıştır. Bölümümüzdeki mevcut YHB cihazıyla gerçekleştiremediğimiz vurgulu basınç deneylerinin ilk aşaması Yüksek Hidrostatik Basınç cihazında (FRAMATOME, Fransa) tamamlanmıştır (Şekil 1 ve 2). Proje kapsamında planlanan Vurgulu Hidrostatik Basınç deneylerinin II. ve son aşaması ise 13-18 Aralık 2009 tarihlerinde tamamlanmıştır. Fransız proje ekibi ise Mayıs 2008 tarihinde ODTÜ'yu ziyaret etmiştir. Ekibin 2009 yılı içinde planlanan ziyaretleri proje ekibinden Pierre Tynduk'un ölümü üzerine iptal edilmiştir. Ancak Fransız proje ekibiyle proje sürecinde devamlı temas halinde bulunulmuş ve bu süreçte ortak katıldığımız uluslararası toplantılarda (Temmuz 2009 Tokyo ve Eylül 2009 Paris) görüşmeler yapılmış ve proje çıktıları ortak olarak hazırlanmıştır.



Şekil 1.1. Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) Cihazı Çalışma Şeması



Şekil 1.2. Yüksek Hidrostatik Basınç (YHB) Cihazı (FRAMATOME; Fransa)

2. Genel Bilgiler:

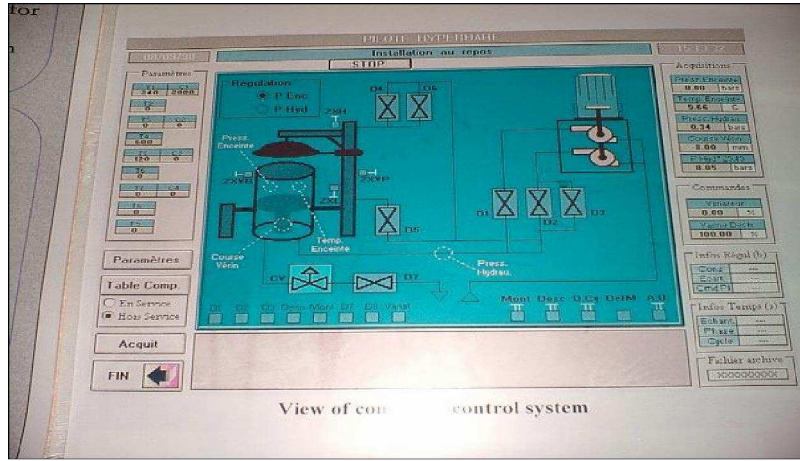
Isısız olmayan inaktivasyon metotları kullanarak gıdaların duyusal özelliklerine zarar vermeden mikroorganizmaları inaktive etmek konusundaki araştırmalar son yıllarda artmıştır (Noma ve ark., 2004). Bu metotlar içerisinde Yüksek Hidrostatik Basınç belki de en popüler olanıdır ve son 20 yılda YSB ile ilgili araştırmalar adeta patlamıştır (Metrick ve ark., 1989; Styles ve ark., 1991; Cheftel 1992; Hayakawa ve ark., 1994; El Moueffak ve ark., 1995; Palou ve ark., 1997; Garcia Graels ve ark., 1998; Linton ve ark., 2001; Tay ve ark., 2003; Buzrul ve Alpas, 2004; Avsaroglu ve ark., 2006; Buzrul ve ark., 2007; Buzrul 2009) ve günümüzde dünyada değişik ülkelerde YSB ile üretilen ürünler marketlerde yerini almıştır.

Çok yüksek basınç kullanımı hem ekonomik olmaması hem de sistemlerin karmaşık yapısı nedeniyle tavsiye edilmemekte ve bu konudaki araştırmalar güvenli gıda üretimine olanak verecek mikrobiyal inaktivasyonu sağlayacak ekonomik, sürdürülebilir ve ticari olarak uygun sistemlerin üretilmesine yönelmektedir (Donsi ve ark., 2007).

Bu bağlamda gerekli tepe-en yüksek basıncın düşürülmesine yönelik değişik girişimler literatürde bolca bulunmaktadır. Bunlar yüksek basıncı ortalama sıcaklıklar ile birlikte uygulamak (Alpas ve ark., 1998, Patterson ve Kilpatrick 1998); antimikrobiyal ajanların yüksek basınçla birarada kullanımı (Ponce ve ark., 1998; Garcia-Graels ve ark., 1999) şeklinde gruplanabilir. Bu amaçla diğer bir alternatifte vurgulu yüksek basınç kullanımıdır (Buzrul ve ark., 2008). Vurgulu yüksek basıncın tek-vurgulu olana üstünlükleri bazı çalışmalarda verilmiştir (Aleman ve ark., 1996; Palou ve ark., 1998; Fioretto ve ark., 2005). Bu çalışmalarda her ne kadar vurgulu yüksek basıncın bazı üstünlüklerinin altı çizilmiş olsa da; bunun patojenlerin inaktivasyonun üzerine etkileri yeterince araştırılmamıştır.

Bu nedenle projenin ilk aşamasında (ocak-haziran 2008) ODTÜ'deki mevcut sistemin kapasite ve teknik sınırları içerisinde maksimum 300 MPa'ya kadar direk basınçlama ve 1-2 seferde "vurgulu" basınç denenmiş ancak vurgulu basınç denemeleri sistemdeki contaların sızdırması sonucu verimli olamamıştır. Bölümümüzdeki basınç ünitesiyle yapılan ön deneylerden elde edilen sistemin vurgulu basınç deneyleri yapmaya uygun olmadığı anlaşılmış ve sistemle ancak direk basınçlama yapılmıştır. Dolayısıyla projede de planlandığı ve öngörüldüğü gibi "vurgulu" basınç denemelerinin tümü Fransa-Bordo I üniversitesindeki sistemde yapılmış ve ODTÜ'deki pilot sistemde ise ancak 300 MPa'ya kadar olan direk-kontrol denemeler tamamlanmıştır. Bu bağlamda deney tasarımı ve kullanılacak malzemeler ve mikroorganizmalar üzerinde bir kez daha fikir birliğine varılmış ve detaylı çalışma planı ortak olarak çıkarılmıştır.

Yüksek Hidrostatik Basınç cihazında (FRAMATOME, Fransa) basınç ileten ortam olarak etilen-glikol kullanılmıştır. Cihaz 400 MPa/dakika'ya kadar ayarlanabilen sıkıştırma ve gevşetme hızına sahip olup tüm parametreler (sıcaklık artışı, sıkıştırma ve gevşetme hızı) bilgisayar ortamında kaydedilmektedir (ölçüm aralıkları maksimum 0.5 saniye) (Şekli 3). Cihazın basınç-sıkıştırma ve gevşetme ivmelerinin ayarlanabilir olması ve kapasitesi; planlanan değişik vurgu-basınç iletimine olanak vermektedir.



Şekli 2.1. YHB cihazı bilgisayar kontrol sistemi

Mikroorganizmalar yapılan işlemler sonucu inaktif olabilmekte, yaşayabilmekte veya tekrar aktive olabilecek şekilde yaralanabilmektedirler. Yapılan işlem sonucu yaralanan mikroorganizmalar seçici ortamlarda büyüyemedikleri için ölü olarak kabul edilirler. Özellikle düşük pH'lı gıdalarda bu tür yaralı mikroorganizmaların-yaralarını düzelterek-aktif hale gelmeleri daha uzun süre alabilir veya aktif hale gelemezler. Daha önce yapılan HHP çalışmaları bu tür yaralanmaların olduğunu göstermektedir (Alpas, 2000, Alpas ve Bozoglu, 2003). Bu tür yaralanmalar mikrobiyel yapıda yapısal ve/veya metabolik yaralanmalar olarak ortaya çıkmakta ve değişik mekanizmalarla

tamir edilebilmektedir. Çalışmalar metabolik yaralanmaların tamir edilmeden yapısal yaralanmaların tamir edilemeyeceğini göstermektedir (Bozoglul, 2004).

Bu çalışmanın amaçları:

i) tutma zamanı uygulanarak ve uygulanmayarak (hedeflenen basınca erişip anında gevşetme işlemi yapılarak atmosferik basınca indirgemek ve-veya hedef basınçta istenilen süre tutmak) tekli ve çoklu vurgulu yüksek basınç işleminin *Escherichia coli* ATCC 11775 suşu inaktivasyonuna etkisinin araştırılması

ii) elde edilen veriler ışığında 4C'de 3 gün süresince saklama sonucunda elde edilen yaralanma iyileşmesinin araştırılması

iii) Gözlenen yaralanma iyileşmesinin olası mekanizma(larının)ının araştırılması

şeklinde belirlenmiştir.

3. Gereç ve Yöntem

Gerçekleştirilen ön deneyler ışığında 300 MPa, 300 saniye, 20°C parametreleri seçilm iş ve vurgu sayısı en az 1 en çok 10 olacak şekilde aşağıdaki gibi belirlenerek yedi farklı deney seti tasarlanmıştır:

- i) 300 saniye x 1 vurgu;
- ii) 150 saniye x 2 vurgu;
- iii) 100 saniye x 3 vurgu;
- iv) 75 saniye x 4 vurgu;
- v) 60 saniye x 5 vurgu;
- vi) 50 saniye x 6 vurgu;
- vii) 30 saniye x 10 vurgu.

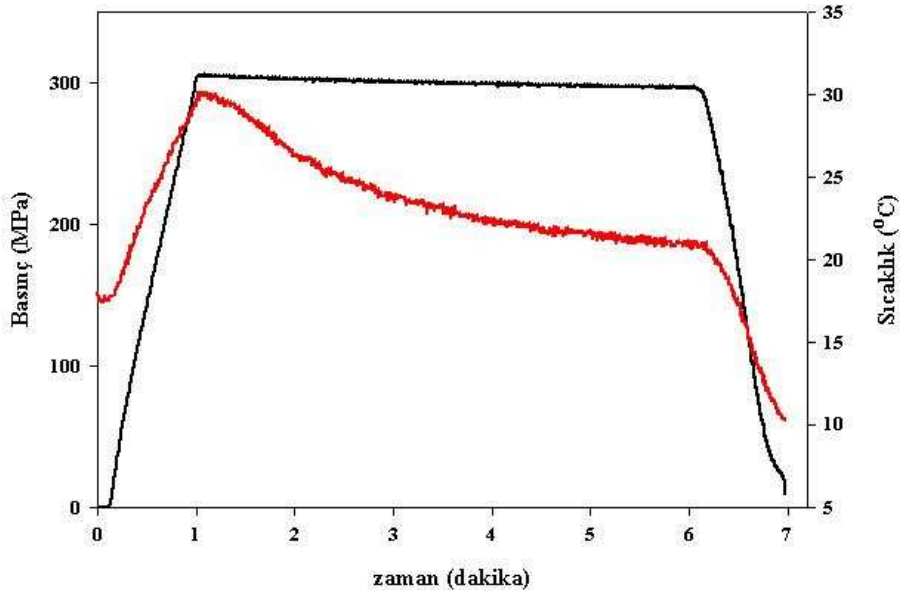
Deney parametreleri belirlendikten sonra tüm deneyler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde patojen olmayan ve daha önceki ortak çalışmalarımızda YHB'ye dayanıklı olduğu belirlenen *Escherichia coli* ATCC 11775 suşu (.R.A.P. laboratory – Périgueux, Fransa) % 0,1'lik peptone çözeltisi içerisinde basınçlanmış ve hem genel (selektif olmayan-TSAYE) hem de *E. coli* bakterisine özgü (selektif-VRBA) ortamlara yüzeye yayma metoduyla ekilerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildikte sonra bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir. Ekimlerde hazır kitler kullanılmıştır (3M, Türkiye).

Projenin son aşamasında da *Escherichia coli* ATCC 11775 ve *Listeria innocua* ATCC 33090 suşları % 0,1'lik peptone çözeltisi ve Portakal suyu (Flaş pastörize-Casino-Bordo-Fransa) içerisinde basınçlanmış ve hem genel (selektif olmayan-TSAYE) hem de ilgili bakterilere özgü (selektif) ortamlara yüzeye yayma metoduyla ekilerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildikte sonra bakteri büyümeleri 4 gün (96 saat) boyunca kontrol edilmiştir. Raf ömrü çalışmaları ilgili ortamlarda büyüme (+) veya büyümeme (-) olarak raporlanmıştır. Raf ömrü için çalışılan bakterilerin optimum büyüme sıcaklığı olan 37°C özellikle seçilmiş ve bu sıcaklıkta çalışılan sürelerde (toplam 4 gün) büyüme gözlenmemesi durumunda daha düşük sıcaklıklardaki saklamaların güvenli olacağı varsayılmıştır. Ekimlerde 3M firmasından proje ekibinin kendi mali imkanlarıyla sağladığı hazır kitler kullanılmıştır. *Escherichia coli* ATCC 11775 ve *Listeria innocua* ATCC 33090 başlangıç-kontrol sayımları 8-9 log₁₀ kob/ml civarındadır.

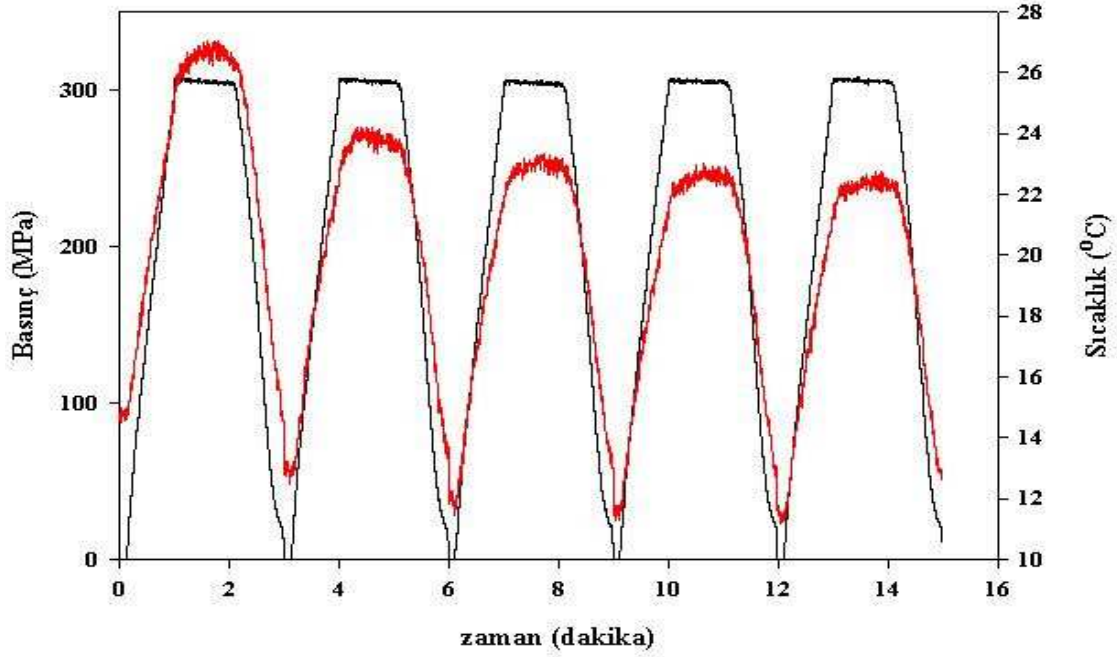
Deneyler 350- 425 ve 500 MPa, 300 saniye (30 saniye X 10 vurgu) ve (basınç altında sıcaklık değişimine bağlı olarak) 22-28°C aralığında tamamlanmıştır. Basınçlanan örneklerin 1 saat içinde (buzlu suda bekletilerek) ekimleri yapılmış ve tüm deneyler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Basınç ivmesi sıkıştırma ve gevşetme için 60 saniye olarak sabitlenmiştir. İstatistiksel analizlerde ANOVA (SPSS 10.0 Windows, SPSS, Şikago, ABD) uygulanmış ve deneylerde uygulanan vurgu sayısının yaşam oranlarına etkisi verilmiştir. Tukey, Duncan ve Student-Newman-Keuls testleride örnek ortalamalarının karşılaştırılmasında kullanılmıştır (p < 0.05).

4. Bulgular ve Tartışma

300 MPa'da sürekli (300 saniye x 1 vurgu) ve vurgulu (60 saniye x 5 vurgu) yüksek basınç uygulamalarından elde edilen tipik basınç-sıcaklık profilleri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

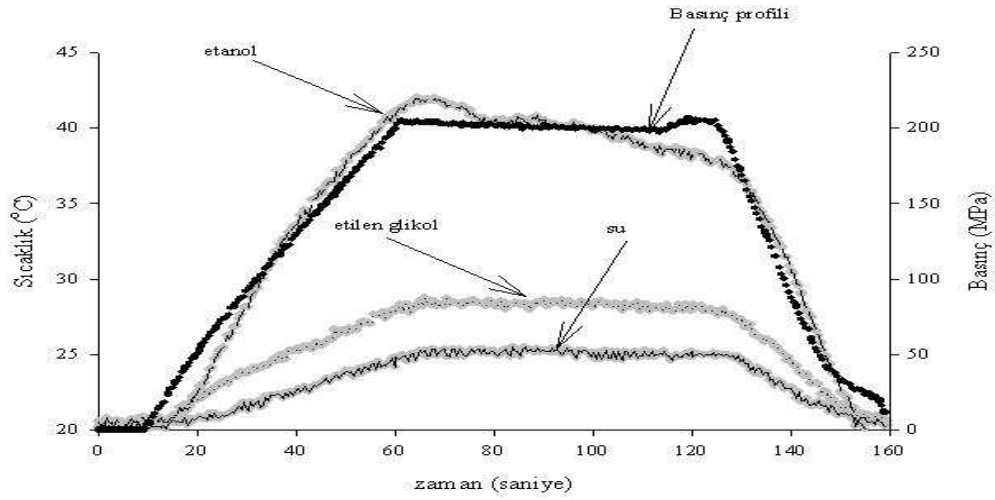


Şekil 4.1. 300 MPa 300 saniye x 1 vurgu için elde edilen basınç ve sıcaklık profili



Şekil 4.2. 300 MPa 60 saniye x 5 vurgu için elde edilen basınç ve sıcaklık profili

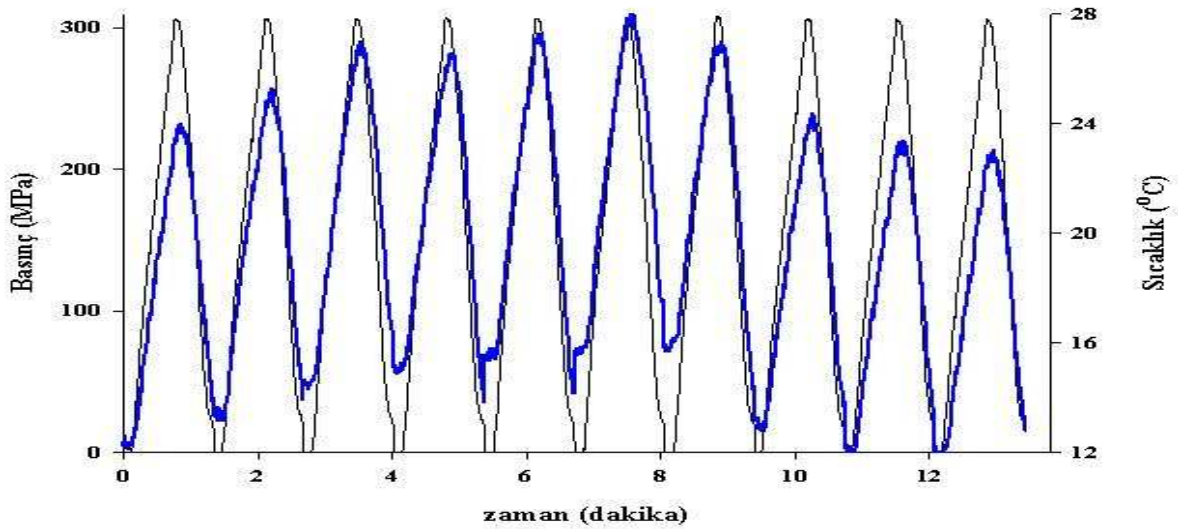
Yukarıda da belirtildiği gibi deneyler sırasında sıkıştırma hızına bağlı olarak ortaya çıkacak ısı etkisi (compression heating) hesaba katılarak basınç ileten ortamın ısısı (etilen-glikol) yaklaşık 22 °C'de kontrol altında tutulmuştur. Burada öndeneyle sırasında elde edilen etilen-glikol karışımının basınç altında sıcaklık artış ivmesi dikkate alınmıştır (Şekil 4.3). Böylece tasarlanan vurgulu basınç deneylerinin tam olarak hedeflenen sıcaklıkta gerçekleşmesi sağlanmıştır.



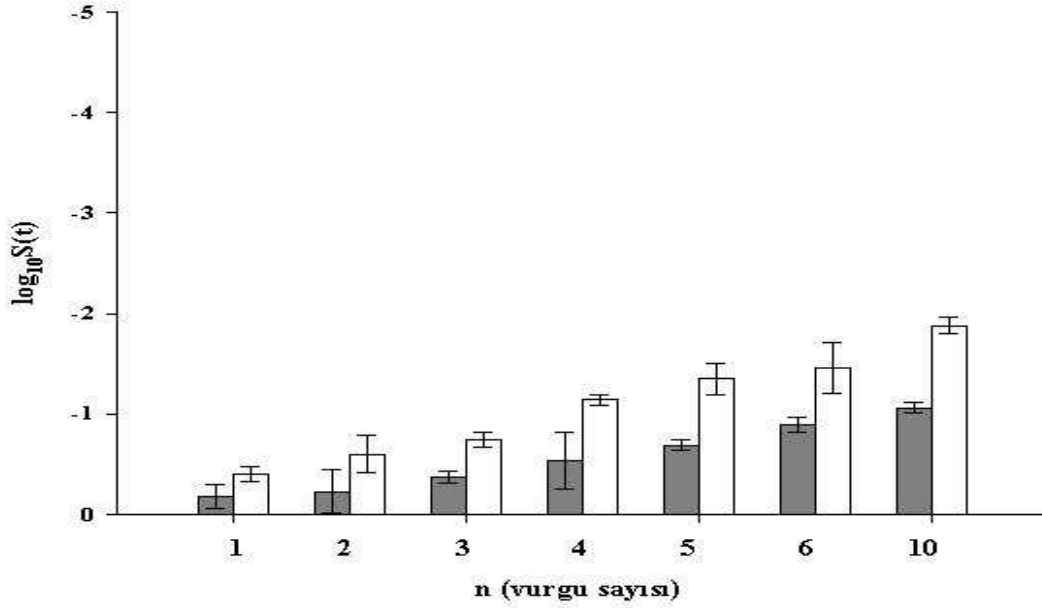
Şekil 4.3. Su, etilen-glikol ve etanol için basınç-sıcaklık profili (Buzrul, 2008)

4.1. Tutma zamanı olmadan uygulanan vurgulu yüksek basıncın inaktivasyona etkisi

Tutma zamanı olmadan uygulanan vurgulu yüksek basıncın (hedeflenen basınca direkt olarak sıkıştırma ve hedeflenen basınca ulaşıldığı anda ivedi olarak atmosferik basınca gevşetme) etkisi çalışılmıştır. Şekil 4.1.4. burada elde edilen sıcaklık, basınç profilini vermektedir. Basınç ileten sıvının başlangıç sıcaklığı 12°C olup 300 MPa'ya sıkıştırma sonucu 24°C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.1.4'deki ilk vurgu). Süreçte ulaşılan en yüksek sıcaklık 10 vurgu sonucu elde edilen 28°C'dir.



Şekil 4.1.4. 300 MPa, 10 vurgu (300 MPa'a çıkış ve iniş) için elde edilen basınç (siyah çizgiler) ve sıcaklık (mavi çizgiler) profili



Şekil 4.1.5. Şekil 4.1.4'de gösterilen profilin her bir vurgu için *Escherichia coli* ATCC 11775 inaktivasyon değerleri. Gri renk selektif, beyaz renk ise selektif olmayan ortamlar için sonuçları göstermektedir. Hata barları %95'lik güven aralığını göstermektedir.

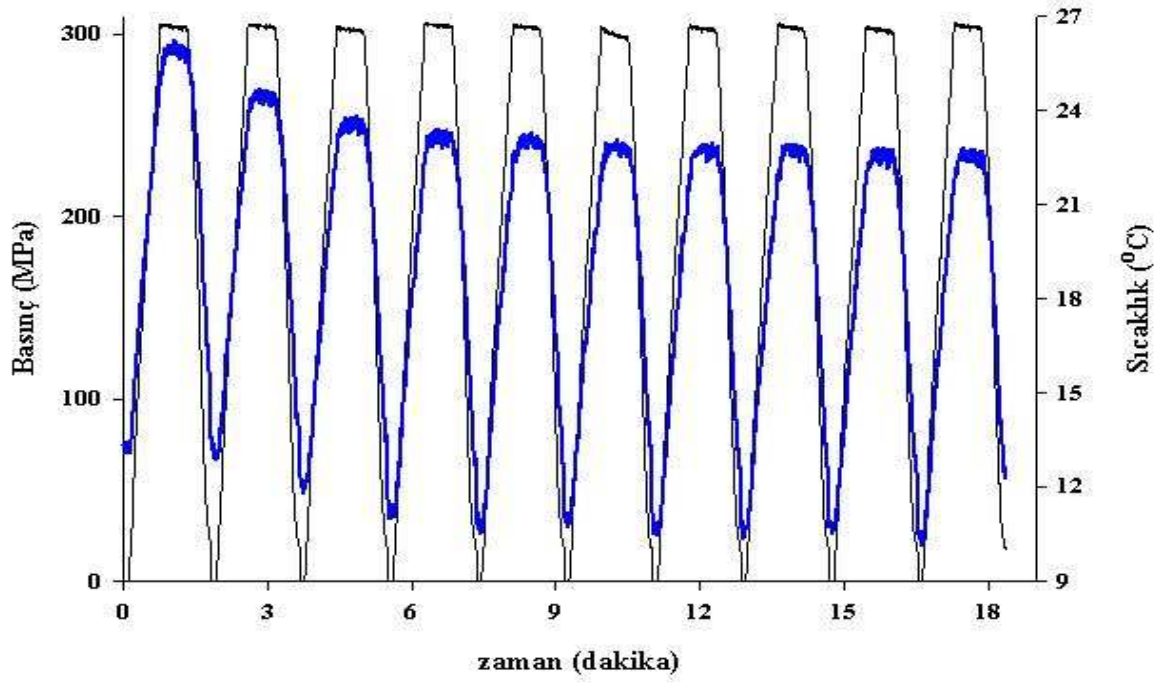
Şekil 4.1.4'de 300 MPa'da sadece sıkıştırma ve bırakma (hedef basınçta bekleme olmadan) yapılarak elde edilen basınç-sıcaklık profili gösterilmiştir. Şekil 4.1.5'deyse Şekil 4.1.4'de betimlenen her bir vurgu için elde edilen inaktivasyon değerleri gösterilmektedir. Böylece, hedef basınçta (300 MPa) bekleme yapılmadan ($t = 0$) her bir vurgunun inaktivasyon değerleri selektif ve selektif olmayan ortamlara göre elde edilerek zamanın vurgulu basınçtaki etkisi gösterilmiştir.

Şekil 4.1.5'de vurgu sayısı arttıkça yaralanan ve inaktive olan *E. Coli* sayısında artış görülmekte ve 2'den fazla vurgu sayısında selektif ve selektif olmayan ortamlarda elde edilen inaktivasyon farklarının istatistiksel olarak önemli olduğu ($p < 0.05$) analiz edilmektedir. Vurgu sayısı 10 olduğunda ise inaktivasyon 1 logdan fazladır. YSB vurgularının inaktivasyona benzer etkileri Donsi ve ark. tarafından da raporlanmıştır (Donsi ve ark., 2007).

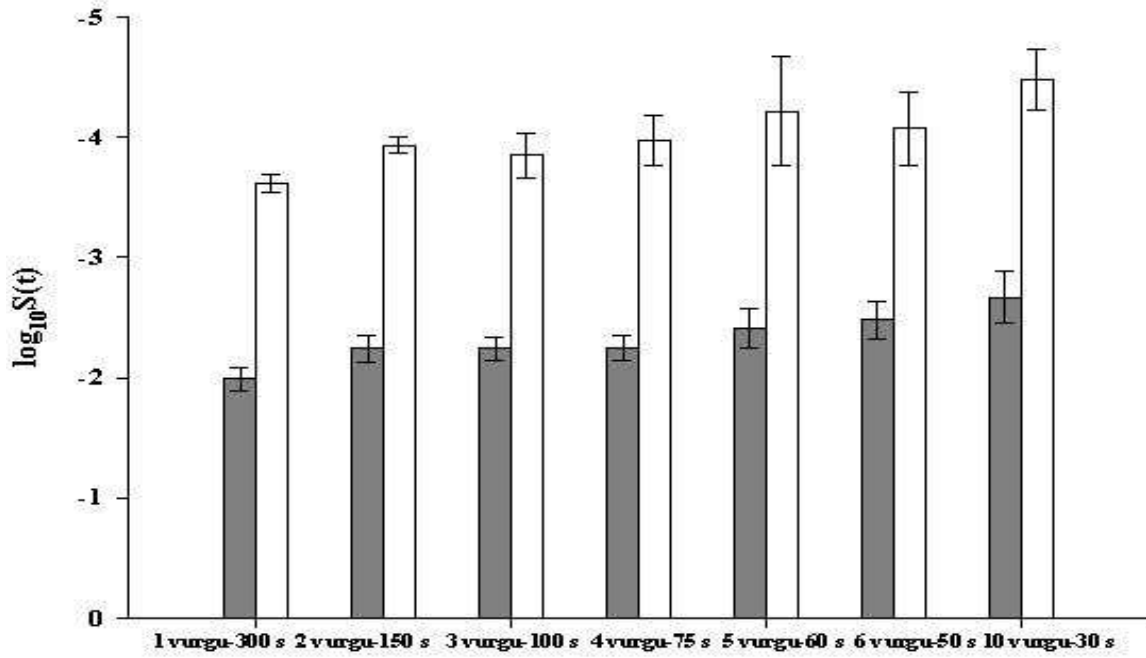
Chapleau ve ark. (2006) vurgulu yüksek basınç uygulanırken kullanılan sıkıştırma ve gevşetme imlerinin bakteri inaktivasyonuna önemli ölçüde katkı sağladığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca *Salmonella typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde uygulanan yavaş sıkıştırma ve gevşetme imlerinin inaktivasyonu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ancak çalışmamızdaki deneylerde sabit sıkıştırma ve gevşetme imesi kullanılmıştır.

4.2. Tutma zamanı uygulanan vurgulu yüksek basıncın inaktivasyona etkisi

Bu aşamada 10 vurguya kadar olan vurgul yüksek basınç uygulamasının 300 saniyede inaktivasyona etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.2.6. basınç-sıcaklık değişimini göstermektedir. 2. vurgudan sonra sıcaklık 22'ye yükselmiştir. Şekil 4.2.7'de *E. coli*'de oluşan inaktivasyon değişimini tek ve çoklu vurgu arasındaki farklar betimlenerek vermektedir. Şekil 4.1.5 ve 4.2.7. karşılaştırıldığında tek ve çoklu vurgu arasındaki (elde edilen inaktivasyon seviyesi açısından) büyük fark gözükmemektedir.



Şekil 4.2.6. 300 MPa, 30 saniye x 10 vurgu için elde edilen basınç (siyah çizgiler) ve sıcaklık (mavi çizgiler) profili



Şekil 4.2.7. Vurgulu (1'den 10'a kadar) basınç (300 MPa) *Escherichia coli* ATCC 11775 inaktivasyon değerleri. Gri renk selektif, beyaz renk ise selektif olmayan ortam için sonuçları göstermektedir. Hata barları %95'lik güven aralığını göstermektedir.

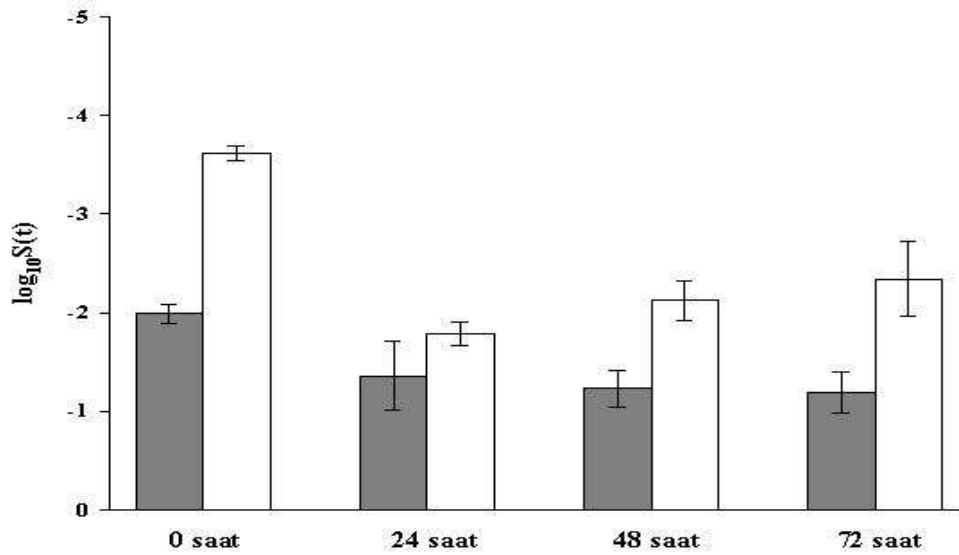
Şekil 4.2.6'da 300 MPa 30 saniye x 10 vurgu yapılarak elde edilen basınç-sıcaklık profili gösterilmiştir. Hem Şekil 4.4'de hem Şekil 2.6'da sıcaklık belli aralıklarda (22-28 °C) tutularak, inaktivasyon değerlerine etkisi en aza indirilmesi sağlanmıştır.

Şekil 4.1.5 ile Şekil 4.2.7 kıyaslandığında 5 dakikalık (300 saniye) vurgulu basınçın, zaman olmadan (sıkıştırma-bırakma) yapılan vurgulu basınca göre inaktivasyon değerini büyük ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir.

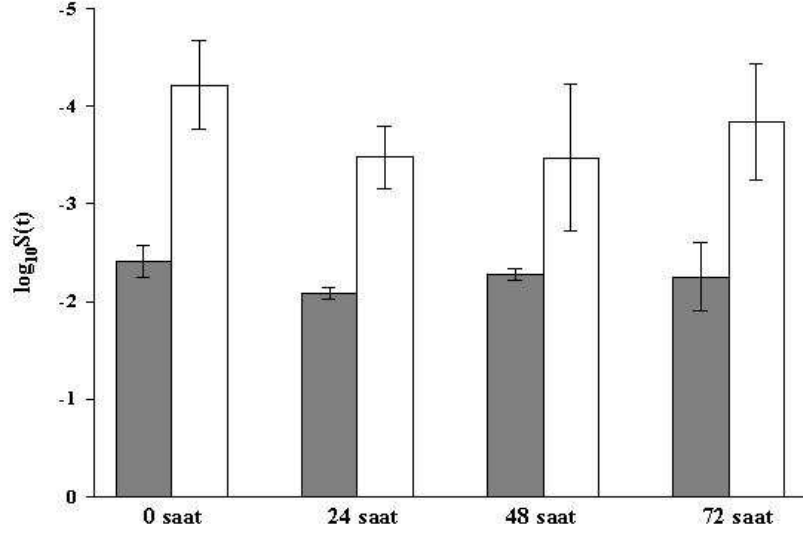
Şekil 4.2.7'den de anlaşıldığı gibi vurgu sayısı 300 MPa'da inaktivasyon değerini çok fazla etkilememektedir. Ancak 300s x 1 vurgu ile 30 s x 10 vurgu arasındaki inaktivasyon farkı önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.3. Tek ve vurgulu basınç sonrası 4°C'de saklamayı etkisi

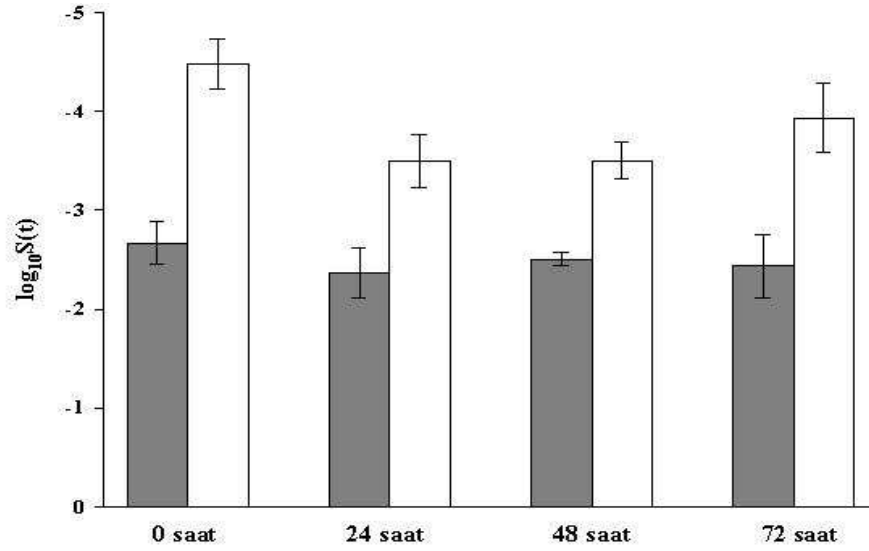
Şekil 4.3.8, 4.3.9 ve 4.3.10'da 300 saniye x 1 vurgu, 60 saniye x 5 vurgu ve 30 saniye x 10 vurgu basınç için üç günlük 4°C'de saklama sonucu elde edilen inaktivasyon değerleri verilmiştir. Vurgu sayısı her ne kadar inaktivasyon değerlerini çok fazla değiştirmese de üç günlük değerler vurgulu basınçın sürekli basınca (300 saniye x 1 vurgu) göre daha etkili sonuç verdiğini göstermektedir. Garcia-Graells ve ark. (1998) YSB uygulanmasının *E.coli* hücrelerinin yaralanmasına yol açtığını ve hücrelerin düşük pH'ya karşı hassaslaştıklarını raporlamıştır ve bu Buzrul ve ark. (2008) tarafından da doğrulanmıştır.



Şekil 4.3.8. 300 MPa, 300 saniye x 1 vurgu'nun ilk üç günlük *Escherichia coli* ATCC 11775 inaktivasyon değerleri. Gri renk selektif, beyaz renk ise selektif olmayan ortam için sonuçları göstermektedir. Hata barları %95'lik güven aralığını göstermektedir.



Şekil 4.3.9. 300 MPa, 60 saniye x 5 vurgu'nun ilk üç günlük *Escherichia coli* ATCC 11775 inaktivasyon değerleri. Gri renk selektif, beyaz renk ise selektif olmayan ortamlar için sonuçları göstermektedir. Hata barları %95'lik güven aralığını göstermektedir.



Şekil 4.3.10. 300 MPa, 30 saniye x 10 vurgu'nun ilk üç günlük *Escherichia coli* ATCC 11775 inaktivasyon değerleri. Gri renk selektif, beyaz renk ise selektif olmayan ortam için sonuçları göstermektedir. Hata barları %95'lik güven aralığını göstermektedir.

Tutma zamanı uygulanan ve uygulanmayan vurgulu yüksek basıncın *E. coli* inaktivasyonu üzerine istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) ölçüde etkili olduğu görülmüştür. Tutma zamanı örneklerde %90'dan fazla yaralanma ölçülmüştür. Tutma zamanı uygulanan ve tek ve çoklu vurgu ile basınçlanan *E. coli* hücrelerindeki inaktivasyon farkı düşük olsa da (istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur); bunların 4C'de saklanması sırasında çoklu vurgu uygulanan örneklerden daha az sayıda yaralanma iyileşmesi görülmüştür.

Bu anlamda çalışmanın bu bölümü sonucunda, tutma zamanı uygulanan ve yeterince vurgulanan (10 vurguya kadar) yüksek basınç ile buzdolabı sıcaklığında tutulan ürünlerin raf ömründe iyileştirmeler olabileceği ön bilgisine ulaşılmış (daha detaylı, kapsamlı ve farkı patojenler ve gıdalar ile çalışmalar yapılması ihtiyacı ile birlikte) ve çalışmanın ikinci aşamasında elde edilen inaktivasyon ve yaralanma iyileşmesi mekanizmalarının çalışılmasına geçilmiştir.

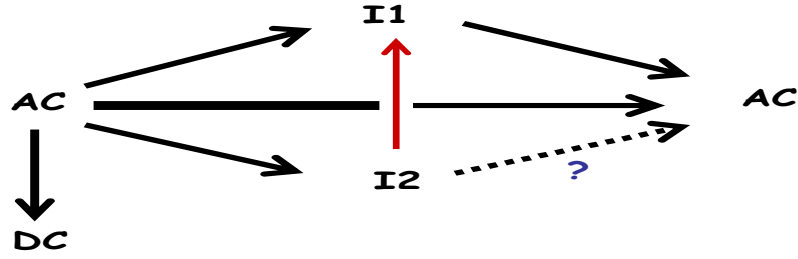
4.4. Vurgulu basıncın raf ömrüne etkisi:

Yukarıda belirtildiği üzere raf ömrü çalışmaları ilgili ortamlarda büyüme (+) veya büyümeme (-) olarak raporlanmıştır. Raf ömrü için çalışılan bakterilerin optimum büyüme sıcaklığı olan 37°C özellikle seçilmiş ve bu sıcaklıkta çalışılan sürelerde (toplam 4 gün) büyüme gözlenmemesi durumunda daha düşük sıcaklıklardaki saklamaların güvenli olacağı varsayılmıştır. Ekimlerde 3M firmasından temin edilen hazır kitler kullanılmıştır. *Escherichia coli* ATCC 11775 ve *Listeria innocua* ATCC 33090 başlangıç-kontrol sayımları 8-9 log₁₀ kob/ml civarındadır.

Escherichia coli ATCC 11775 ve *Listeria innocua* ATCC 33090 suşu (R.A.P. laboratory – Périgueux, Fransa) 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 olmayan ortamda büyüyen ancak selektif ortamda büyüyemeyen hücreler; (+/-)
- ikincil yaralanma (I2): başlangıçta hem selektif hem de selektif olmayan ortamda büyüyemeyen ancak saklama sürecinde önce selektif olmayan ortamda daha sonra da selektif ortamda büyüme gösteren hücreler; (-/-)

olarak tanımlanmış ve aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.4.11).



Şekil

4.4.11. Birincil yaralanma (I1), ikincil yaralanma (I2), aktif hücre (AC) ve ölü hücre (DC) arasındaki muhtemel geçiş mekanizması.

Saklama sıcaklığı olarak 37°C kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.4.1-2-3 ve 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4.4.1. Saklama sürecinde portakal suyunda (pH=3.75) *Escherichia coli* ATCC 11775'nin iyileşmesi (Kontrol=9 log₁₀ cfu/ml)

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(-/-) ^a	- ^b	-	-
425	(-/-)	-	-	-
500	(-/-)	-	-	-

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

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

Tablo 4.4.2. Saklama sürecinde portakal suyunda *Listeria innocua* ATCC 33090'nın iyileşmesi (Kontrol=9 log₁₀ cfu/ml)

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(-/-) ^a	- ^b	-	-
425	(-/-)	-	-	-
500	(-/-)	-	-	-

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

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

Tablo 4.4.1 ve 4.4.2'de portakal suyunda çalışılan bakterilerde seçilen HHP koşullarının başlangıçta varolan yaklaşık 9 log₁₀ cfu/ml mikrobiyal yükü inaktive ettiği ve portakal suyundaki mevcut pH'nında etkisiyle optimum büyüme sıcaklığı olan 37 °C'de bile 4 gün boyunca hücrelerin aktive olamadıkları gözlenmiştir. Aynı çalışma pepton çözeltisinde tekrarlanmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4.4.3. Saklama sürecinde pepton çözeltisinde *Escherichia coli* ATCC 11775'nin iyileşmesi (Kontrol=9 log₁₀ cfu/ml)

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(-/-) ^a	1 ^b	-	-
425	(-/-)	2	-	-
500	(-/-)	3	-	-

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

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

Tablo 4.4.4. Saklama sürecinde pepton çözeltilisinde *Listeria innocua* ATCC 33090'nın iyileşmesi (Kontrol=9 log₁₀ cfu/ml)

Basınç (MPa)	YHB sonrası koloni oluşumu (Non-selektif/selektif)	Gün I2'den I1'e	Gün I1'den AC'ye	Gün I2'den AC'ye
350	(+/-) ^a	- ^b	-	-
425	(-/-)	-	-	-
500	(-/-)	-	-	-

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

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

5. Sonuçlar

Tablo 4.4.3 ve 4.4.4'de elde edilen sonuçlar incelendiğinde, *Escherichia coli* ATCC 11775'nin pepton çözeltisi içinde başlangıçta $9 \log_{10}$ kob/ml olan mikrobiyel yükünün çalışılan tüm basınç-sıcaklık-zaman kombinasyonlarında vurgulu basınç sonrası inaktive edildiği görülmekle birlikte (-/-) bunun aslında doğru olmadığı $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'deki saklama sürecinde ortaya çıkmıştır. Bu saklama sıcaklığında 350, 450 ve 550 MPa uygulamaları sonrası sırasıyla 1, 2 ve 3 gün sonra selektif olmayan ortamlarda büyüme görülmüş ve aslında başta tamamen ölü (-/-) şeklinde değerlendirilen hücrelerin birincil yaralanmaya -(I1): selektif olmayan ortamda büyüyen ancak selektif ortamda büyüemeyen hücreler; (+/-)- sahip oldukları görülmüştür. Bu tip hücreler uygun ortamı ve süreyi bulduklarında yapısal tamirlerini başararak aktif hücre (+/+) haline gelebilir ve problem yaratabilirler. Ancak deney süresi içinde bu hücreler bunu tamamlayamamışlardır.

Listeria innocua ATCC 33090 içinse pepton çözeltisinde çalışılan vurgulu basınç seviyelerinden 350 MPA yeterli olmamış ve YHB işlemi sonrası I1 tip hücreler elde edilmiştir (selektif olmayan ortamda büyüyen ancak selektif ortamda büyüemeyen hücreler; (+/-)). Ancak bu hücrelerde çalışmadaki saklama sürecinde yapısal tamirlerini tamamlayamamış ve aktif hücre haline gelememişlerdir. Diğer basınç seviyelerinde ise toplam bir inaktivasyon elde edilmiştir.

Projenin bu aşamasında elde edilen bulgular, bakteriye ve uygulanan basınca ve vurgulamaya bağlı olarak bazı hücrelerin basınç işleminden tamamen zarar görmediklerini (I1 tip) ve hücrelerin yapısal yaralanmaya (hücre duvarı ve/veya hücre membranı bütünlüğünün kaybı-birincil yaralanma) uğradıklarını 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 (AC) dönüşebilecek patojenlerin varlığı düşünüldüğünde büyük bir gıda güvenliği tehdidi oluşturabilir. Böyle bir tehdidi önlemek için raf ömrü çalışmalarının bu tip iyileşme süreçlerini kapsayacak şekilde tasarlanmaları gıdaların mikrobiyolojik güvenilirliklerini arttıracaktır.

Elde edilen yaralanma verilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için seçilen yaralanma koşullarında hücrelerin SEM analizleri yapılmıştır. Ancak özellikle portakal suyunun saydamlığı engellemesi ve muhtemelen araştırma birimi tarafından belirlenmiş ve halen kullanılan SEM örneği hazırlama metodunun (vakum altında altınla sabitleme süreci ve SEM cihazının detay kapasitesi) etkisiyle yaralanmaların yapısal ve-veya hücresel olup olmadıklarını anlayabilecek kadar net SEM resimleri elde edilememiştir.

İleride yapılacak çalışmalarda elde edilen sonuçların SEM ve gerekirse TEM ile detaylı olarak incelenmesi vurgulu basınç sonrası hücrelerde meydana gelebilecek değişikliklerin daha iyi anlaşılması ve mikrobiyal olarak elde edilen verilerin desteklenmesi açısından faydalı olacaktır.

6. Referanslar

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).

AVSAROGLU D., BUZRUL S., ALPAS H., AKCELİK M., BOZOGLU F., Use of the Weibull model for lactococcal bacteriophage inactivation by high hydrostatic pressure, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 78-83, (2006).

ALPAS H., LEE J., BOZOGLU F., KALETUNC G., 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).

BUZRUL S., ALPAS H., Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: A preliminary study, *FEMS Microbiology Letters*, 238, 29-36, (2004).

BUZRUL S., ALPAS H., BOZOGLU F., Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures, *Food Research International*, 38, 151-157, (2005).

BUZRUL, S., ALPAS, H., LARGETEAU, A., BOZOGLU, F., DEMAZEAU, G., Compression Heating of Selected Pressure Transmitting Fluids and Liquid Foods during High Hydrostatic Pressure Treatment", *Journal of Food Engineering*, 85 466-472, (2008).

BUZRUL, S., ALPAS, H., LARGETEAU, A. DEMAZEAU, G.. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 275-278, (2008).

BOZOGLU F., ALPAS H., KALETUNC G., Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40, (3), 243-247,, (2004).

BUZRUL, S., High Hydrostatic Pressure (HHP) Applications in Food Science: A Study on Compression Heating, Microbial Inactivation Kinetics, Pulsed ressure and High Pressure Carbon Dioxide Treatments, (Doktora Tezi), ODTÜ Mühendislik Fakültesi, (2008).

CHAPLEAU, N., RİTZ, M., DELÉPINE, S., JUGİAU, F., FEDERİGHİ, M., DE LAMBALLERİE, M. Influence of kinetic parameters of high pressure processing on bacterial inactivation in a buffer system. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 324-330, (2006).

CHEFTEL, J.C. Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In *High Pressure and Biotechnology* (Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson). Colloque INSERM, pp. 195-209. London, John Libbey Eurotext Ltd., (1992).

DONSİ, G., FERRARİ, G., MARESCA, P. Pulsed high pressure treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 78, 984-990, (2007).

EL MOUEFFAK, A., CRUZ, C., ANTOİNE, M., MONTURY, M., DEMAZEAU, G., LARGETEAU, A., ROY, B., ZUBER. High pressure and pasteurization effect on duck foie gras. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 737-743, (1995).

FİORETTO, F., CRUZ, C., LARGETEAU, A., SARLİ, T.A., DEMAZEAU, G. EL MOUEFFAK, A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in tryptic soy broth and caviar samples by high pressure processing. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1259-1265, (2005).

- GARCÍA-GRAELLS, C., HAUBEN, E.J.A., MÍCHIÉLS, 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).
- GARCÍA-GRAELLS C., VALCKX C., MÍCHIÉLS, C. W. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4173-4179, (2000).
- HAYAKAWA, I., KANNO, T., TOMITA, M. & FUJIO, Y. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Science*, 59, 159-163, (1994)
- KALETUNC G., ALPAS H., BOZOGLU F., Evaluation of high hydrostatic pressure induced structural changes in *Leuconostoc mesenteroides*", *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1116-1122, (2004).
- METRICK, C., HOOVER, D.G. & FARKAS, D.F. Effect of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54, 1547-1549, (1989).
- NOMA, S., TOMITA, C., SHIMODA, M. & HAYAKAWA, I. Response of *Escherichia coli* O157:H7 in apple and orange juices by high hydrostatic pressure treatment with rapid decompression. *Food Microbiology* 21, 469-473, (2004).
- PALOU, E., LOPEZ-MALO, A., BARBOSA-CANOVAS, G.V., WELTÍ-CHAMES, J., SWANSON, B.G. Combined effect of high hydrostatic pressure and water activity on *Zygosaccharomyces bailii* inhibition. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 417-420, (1997).
- PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., WELTÍ-CHANES, J., SWANSON B.G. Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Food Protection*, 61, 1213-1215, (1998).
- PATTERSON, M.F., KILPATRICK, D.J. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61, 432-436, (1998).
- PONCE, E., PLA, R., SENDRA, E., GUAMÍS, B., MOR-MUR, M. Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 15-19, (1998).
- STYLES, M.F., HOOVER, D.G. FARKAS, D.F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56, 1404-1407, (1991).
- TAY A., SHELLHAMMER T. H., YOUSEF A. E., CHISM G.W., Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances, *Journal of Food Protection*, 66, 2057-2061, (2003).
- ZHAO, T. & DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 57, 780-783, (1993).

**TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ
FORMU**

Proje No: 107O309

Proje Başlığı: **MECHANISM OF INACTIVATION OF MICROORGANISMS BY PULSED HIGH
HYDROSTATIC PRESSURE**

Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç.Dr.Hami Alpas (Yürütücü)

Dr. Sencer Buzrul-Dr.Mutlu Pilavtepe-Prof.Dr.Faruk Bozoğlu (Araştırmacılar)

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Gıda Müh. Böl. ODTÜ-06531-Ankara

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

TÜBİTAK-Atatürk Bulvarı No:221-Kavaklıdere-Ankara

CNRS (Fransa) Institut de Chimie de la Matière Condensée de, (ICMCB) UPR CNRS 9048, 87 Avenue du Dr. A. Schweitzer, 33608, Bordeaux, France

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/01/2008 – 31/12/2009

Öz (en çok 70 kelime)

Bu çalışmada vurgulu yüksek hidrostatik basınç (VYHB) kullanılarak *E. coli* ATCC 11775 ve *L. innocua* ATCC 33090'nın inaktivasyon mekanizması belirlenmiştir. Portakal suyuna inoküle edilmiş suşlarda 37 °C'de 4 güne kadar raf ömrü takip edilmiş ve bazı hücrelerin VHYB'den tamamen zarar görmedikleri (I1 tip) ve hücrelerin yapısal yaranmaya uğradıkları görülmüştür. Bu anlamda I2 türü yaranmanın basınç işleminin hemen ardından gözlenmeyebileceği, yaranmanın iyileşmesini takiben aktif hücreye (AC) dönüşebilecek patojenlerin büyük bir gıda güvenliği tehdidi oluşturabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Vurgulu yüksek hidrostatik basınç, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Listeria innocua* ATCC 33090, inaktivasyon mekanizması, portakal suyu

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet Gereklİ Değİl X

Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

- Multi-pulsed high hydrostatic pressure treatment for inactivation and injury of *Escherichia coli*, Journal of Consumer Protection and Food Safety-DOI 10.1007/s00003-010-0647-2-basımda (2010).

