

Gıda Muhafazasında Yüksek Hidrostatik Basıncın Mikroorganizmalar

Üzerine Etkisi

M. Arıcı

Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ

Yüksek hidrostatik basınç patojen ve saprofit mikroorganizmaların inaktivasyonu yeteneğine sahip olduğu bilinen yeni bir gıda muhafaza metodudur. Gıda üretiminde mikroorganizmaların inaktivasyonu amacıyla yüksek basınç uygulamaları kullanımı gittikçe artan bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Burada basınç, sıcaklık yerine kullanılan stabilize edici bir faktör durumundadır. Yüksek hidrostatik basınç uygulaması, üzerinde en çok çalışılan alternatif bir metottur. Sıcaklık, basınç, süre gibi farklı çalışma şartları altında birçok mikroorganizma grubunun inaktivasyonunun gerçekleştirildiği pek çok çalışmada bildirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yüksek basınç, gıda muhafaza, mikroorganizmalar, pastörizasyon

The Effect of High Hydrostatic Pressure on Microorganisms in Food Preservation

High hydrostatic pressure is a new food preservation technology known for its capacity to inactivate spoilage and pathogenic microorganisms. High-pressure treatments are receiving a great deal of attention for the inactivation of microorganisms in food processing, pressure instead of temperature is used as stabilizing factor. High hydrostatic pressure treatment is the most studied alternative process, many works reported successful results in inactivating a wide range of microorganisms under different operative conditions such as temperature, pressure, exposure time.

Key words: High pressure, food preservation, microorganisms, pasteurisation

Giriş

Günümüz gıda pazarında tüketiciye ulaşmak için en sık kullanılan reklam ifadesinin “güvenli gıda” olduğunu görmekteyiz. Tüketici için en önemli faktörlerin başında gıdanın dayanıklılığı gelmektedir. Bu nedenle üretilen gıdalar tüketiciler için daha uzun süreli bir kullanım imkânı sağlamalıdır. Bunun yanında, tüketiciye cazip gelecek, yüksek besleyicilik değerine sahip gıdaların geliştirilmesi ve üretimi gıda endüstrisinin bir diğer görevi olmuştur. Gıdaların muhafazasında genel olarak yapılması gereken iki temel uygulamadan birincisi mikrobiyolojik aktivitenin durdurulmasıdır. Bu uygulama mikroorganizmaların

tamamen uzaklaştırılması, gelişmelerinin engellenmesi veya öldürülmesi ile mümkün olur. Diğer ise dokulardaki kimyasal olayların (enzimatik reaksiyonlar, su aktivitesi, oksidatif olaylar vb.) kontrol altına alınmasıdır. Bu kimyasal olaylar hem gıdaya bulaşan mikroorganizmalardaki ve hem de gıdadaki tabii enzimler ve kimyasal reaksiyonlardan ileri gelmektedir. Bu noktada gıda teknolojisi açısından en önemli husus gıda kalitesindeki ve besleyicilik değerindeki en az değişim ile gıda güvenliğinin en üst noktaya ulaştırılmasıdır. Bu nedenle etkili gıda muhafaza yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine yıllardan beri çalışılmakta

olup tarihsel gelişim içerisinde gıdaları fermente etme (salamura, tuzlama, turşu), konserve ve güneş altında kurutma, mayalama teknikleri ile işlenmemiş gıdaların uzun süre tüketilebilir gıda formuna çevrilmesi çalışmaları göze çarpmaktadır (Jay, 1992).

Endüstride görülen gelişmeler yukarıdaki uygulamaların daha uygun şekilde gerçekleşmesini sağlamakla yetinmemiş, pastörizasyon, dondurma, ışınlama, modifiye ve kontrollü atmosfer gibi teknikleri gıda endüstrisinin hizmetine sunmuştur. Bu gelişmelerden biri de 20. yüzyılın son çeyreğinde yoğun bir şekilde araştırılmaya başlanan yüksek hidrostatik basınç ile gıda muhafazası olmuş, özellikle Japonya bu çalışmaların öncülüğünü yapmış ve yüksek basınçla işlenen ilk ticari ürünler Japonya’da piyasaya sunulmuştur. Japon gıda pazarına yüksek basınçla muamele edilmiş ticari ürünlerin arzından sonra, gıdalarda yüksek hidrostatik basınç uygulamaları, gıda araştırma ve geliştirme etkinliklerinin odağına yerleşmiştir (Minerich ve Labuza, 2003; Trujillo ve ark., 2002).

İlk çalışmalar, ürün kalitesinde en az değişiklik ile raf ömrünün uzatılması üzerineyken, sonraki çalışmalarda bununla birlikte işleme tekniklerini geliştirmede yeni ihtimaller (basınçla desteklenen dondurma ve çözündürme), gıda ve gıda eşdeğerlerinin yapı ve fonksiyonlarının yeniden düzenlenmeleri (nişastanın çirilenmesi, proteinlerin jelatinizasyonu vb.) için büyük bir potansiyelin varlığı farkedilmiştir. Yüksek hidrostatik basınç yakın zamanda gıda endüstrisi yanında, eczacılık ve endüstriyel biyoteknolojide de büyük ilgi görmüştür (Bauer ve Knorr, 2005; Fox, 1989). 1980’li yıllarda gıdalardaki önemli mikroorganizmaların yüksek basınç ile inaktivasyon kinetikleri konusunda yeterli bilgiye ulaşamazken, yüksek hidrostatik basınç işlemi görmüş gıdalardaki mikroorganizmaların ve enzimlerin inaktivasyonu hakkında günümüzde oldukça fazla bilgiye rastlamak mümkündür. Bu makalede gıda muhafazasında yüksek hidrostatik basınç mikroorganizmalar üzerine etkisi ve mekanizmaları incelenmiştir.

Tarihsel gelişim

Bilim adamları 19. yüzyılda yüksek basınç, modern fizik ve kimyaya dayalı temellerini oluşturmuşlar ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşayan canlılar üzerinde çalışmaya başlamışlardır. Daha sonraki süreçte, sırayla Mariana (110,6 MPa) ve Philippine (101,7 MPa) çukurlarındaki bakteri ve hayvansal yaşam tanımlanmıştır. Muhafaza amacıyla gıdaların basınçla işlenmesi ABD’de Hite (1899) ve Hite ve ark. (1914) gibi araştırmacılar tarafından ilk olarak 19 yüzyıl sonunda ve 20 yüzyıl başlarında çalışılmıştır. Yüksek hidrostatik basınç bakterileri öldürdüğüne dair ilk rapor Roger tarafından 1895 yılında açıklanmış olmasına rağmen, gıda endüstrisinde yüksek hidrostatik basınç ile mikrobiyal inaktivasyonu açıklayan önemli çalışma Bert Hite’in Temmuz 1899’da yayınlanan makalesidir. Hite’in ilk çalışması oda sıcaklığında 1 saat 600 MPa’lık basınçla maruz bırakılan çiğ sütün raf ömrünün 4 gün uzatılabilmesi olmuştur. Bununla birlikte, sütte asitlik artışı da 200 MPa’lık bir uygulama ile 24 saat geciktirmeyi başarmıştır. Hite ve ark. (1914), 400 ve 820 MPa arasında değişen basınç işlemine tabi tutulan çoğu meyve suyunun, işlemden sonra en az 5 yıl boyunca ticari olarak steril kaldıklarını göstermişlerdir. Larsen ve ark. (1918) yüksek hidrostatik basınç mikrobiyal gelişmeyi inhibe ettiğini ve hücrelerin ölümüne sebep olduğunu ispatlamışlardır. Gıda Teknolojileri Enstitüsünün 1974’de yapılan yıllık toplantısında Wilson, basınç ve yükseltilmiş sıcaklıkların bir gıda muhafaza metodu olarak kullanımını yeniden tespit eden bir tebliğ sunmuştur. Ancak 1985’e kadar basınç uygulamalarının potansiyel mikrobiyolojik etkileri gıda endüstrisinin dikkatini fazla çekmemiş, bunda uygun ekipmanların bulunamaması da işlemin uygulamalarını geciktirmiştir. 1970’ler ve 1980’lerde seramik ve metal endüstrilerinde yüksek basınç tekniklerinin kullanımında elde edilen olumlu gelişmeler, gıdaların endüstriyel düzeyde bu metotla işlenmesi ihtimalini akla getirmiştir. Hammaddede teknolojisinde görülen bu teknik ilerlemelerden sonra, yüksek hidrostatik basınç teknolojisinin ticari kullanımı amacıyla 21 Japon şirketinden oluşan bir araştırma konsorsiyumunun kurulması gıda maddeleri üzerinde yüksek basınç araştırmalarını

hızlandırmıştır. 1990'lı yıllarda, yüksek basınç ile işlenen çeşitli ticari gıda ürünleri Japon gıda pazarında ortaya çıkmıştır. Reçeller, marmelatlar, meyve suları ve yoğurt gibi ürünler üreten Japonya şu an için bu teknolojiye lider konumuna gelmiştir. Bugün Japonya'da bazı gıda işletmeleri; portakal suyu, reçel, marmelat, meyveli yoğurtlar, salata sosları ve meyve sosları vb. gibi ürünlerle bu teknolojinin ticari olarak kullanımını başlatmıştır. Avrupa'da süpermarket raflarında dilimlenmiş pişirilmiş jambon ve portakal suyu gibi değişik ürünler de mevcuttur (Trujillo ve ark., 2002).

Yüksek basıncın fiziksel tanımı

Yüksek basınç işlemi (Ultra Pressure Processing = HPP) veya ultra yüksek basınç (Ultra High Pressure Process = UHP) olarak da tanımlanan yüksek hidrostatik basınç, katı ve sıvı gıdaların ambalajlı veya ambalajsız olarak, 100 ve 1000 MPa (1000 ile 10000 bar) arasında basınca maruz bırakılmasını içine alan bir işlemdir. Basınç uygulaması sırasında kullanılacak işlem sıcaklığı 0°C'nin altından başlayıp (adiyabatik ısıdan kaynaklanabilecek etkileri en aza indirmek için), 100°C'nin üstüne kadar çıkabilir. Basınç tankları; bir çok döngü boyunca uygulanan basınçlara emniyetli bir biçimde karşı koymak için özel olarak tasarlanmıştır. Ticari olarak basınç uygulama süresi milisaniyeden başlayıp (çalkalayıcı pompalarla sağlanır), 1200 saniyenin üzerindeki sürelerle kadar değişir. Gıdalara uygulanan yüksek hidrostatik basınç işleminde kullanılan basıncın kovalent bağlar üzerinde az bir etkiye sahip olduğu ortaya çıktığından, oda sıcaklığında veya oda sıcaklığına yakın sıcaklıklarda yüksek hidrostatik basınç işlemine maruz bırakılan gıdalar, doğrudan basınç uygulamasına bağlı olarak önemli kimyasal değişimler geçirmezler. Yüksek hidrostatik basınç mikroorganizmaların ve enzimlerin daha seri bir şekilde inaktivasyonlarını sağlamak için ısıl işleme kombine edilerek uygulanabilir. Yüksek hidrostatik basınç boyut, şekil ve gıda kompozisyonundan bağımsız olarak, bir gıda kitlesinin her yerine daima aynı şiddette etkili olur. Dolayısıyla, gıdanın paket boyutu, şekli ve kompozisyonu işlem tayininde birer faktör değildir (Farkas ve Hoover, 2000).

Yüksek basıncın inaktivasyon mekanizmaları

Yüksek basıncın inaktivasyon mekanizması fiziksel olarak Le Chatelier prensibi ile açıklanabilir. Kuvvetten kaçış olarak bilinen yasaya göre, dengede olan bir fiziksel sisteme dışarıdan bir etki yapıldığında, sistem bu etkiyi en aza indirecek şekilde kendini değişikliğe uğratar. Basınç artarsa hacim azalır ve yoğunluk artar, dolayısıyla denge mol sayısı az olan tarafa kayar ve sistemin kimyasal dengesi değişir.

Hücre zarında meydana gelen değişiklikler: Basınç uygulanmış hücre zarları, genellikle değişen geçirgenlikler gösterirler. Her bir fosfolipit molekülünün çapraz bölgesindeki bir indirgenmeyle birlikte, hacimde bir azalma gerçekleşir. Genel olarak, basıncın mikroorganizmalarda zarar verdiği ilk bölgenin hücre zarı olduğu anlaşılmıştır. Basıncın sebep olduğu hücre zarındaki görev bozuklukları (malfonksiyonlar) muhtemelen membran proteinlerinin denatürasyonuna bağlı olarak, amino asit alımının inhibisyonuna neden olurlar. Pek çok çalışma, basınç uygulamasından sonra mikroorganizmaların hücre içi elemanlarının kaybını göstermiştir. Hücrelerden bu bileşenlerin sızmaları, hücre zarındaki hasara işaret eder ve hücrelerden artan kayıp oranı yükseldikçe ölümün ve hasarın derecesi de o nispete artar (Farkas ve Hoover, 2000; Russell, 2002).

Basıncın hücrede sebep olduğu değişimler: Sulu sistemlerde iyonize olmuş grupların konsantrasyonunun artması sonucu hacim azalması ortaya çıkar. Basınç etkisiyle elektrostatik iyon bağları ayrılır ve sonuçta pH değeri düşer (Saf suyun pH'sı 25°C ve 0,1 MPa'da 7 iken, 100 MPa'da 6,25'dir). Hücre morfolojisi basınç uygulamasıyla değişir ve yüksek basınç uygulanmasıyla hücre bölünmesi yavaşlar. Hücreler uzar ve protoplazma viskozitesi değişir. Bu değişimlerin sonucunda gerçekleşen çeşitli morfolojik değişimler ise hücre duvarı ve hücre membranının birbirinden ayrılması ve devamında hücre duvarının kalınlaşması ve kıvrılması olarak sayılabilir.

Metabolizma üzerindeki etkiler: Mikrobiyal hücrelerin basınçla inaktivasyonunda önemli protein içeren bölgeleri enzimler ve özellikle zara bağlı ATPaz'lardır (Mackey ve ark., 1995; Marquis

ve Bender, 1987). Bazı organizmalarda basıncın sebep olduğu ölüm ve hasarlarda, basıncın anahtar enzimlerin denatürasyonunda önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır. Enzim inaktivasyonunu teşvik eden faktörler molekül içi yapıların değişimi ve enzimin aktif bölgelerindeki değişimlerdir. Basınç altındaki enzim inaktivasyonunu etkileyen faktörler arasında, pH, substrat konsantrasyonu ve enzimin alt ünite yapısı da yer alır. Enerji açığa çıkaran reaksiyonlar basınç etkisiyle engellenerek hücrenin hayati faaliyetleri yavaşlatılabilir. Basınç, reaksiyon sistemlerini; (a) reaksiyon için gerekli olan uygun moleküler boşluğun azalması, (b) zincirler arası reaksiyonun artması yoluyla etkiler.

Genetik mekanizma üzerindeki etkiler: DNA'nın tabii yapısında stabilizasyon ortaya çıkar. DNA yapısında mevcut fazla sayıda intermoleküler hidrojen köprüsü bağlarından dolayı, proteinlere kıyasla basınca daha fazla tolerans gösterir. Diğer taraftan enzimler tarafından katalizlenen DNA replikasyon ve transkripsiyonu da engellenir.

Yüksek hidrostatik basıncın mikroorganizmalar üzerine etkileri

Bakteriyel endosporların basınca en dayanıklı olduğu bilinen hayat formları oldukları kesin olarak tespit edilmiştir. Isıya en dayanıklı patojen ve aynı zamanda insanlar için en tehlikeli olanlardan biri *Clostridium botulinum* olup en yaygın olarak da A, B, E ve F tipleridir. *C. botulinum* aynı zamanda, yüksek hidrostatik basınç uygulanan mikroorganizmalar arasında basınca en dayanıklı ve tehlikeli organizmalar listesinin en başında yer almaktadır. Aynı şekilde *C. botulinum*'un sporları, basınca en dayanıklı olduğu bilinen sporlar arasındadır. 17B ve Cap 9B suşlarının spor süspansiyonları 75°C'de 30 dakika boyunca 827 MPa basınç uygulamasına dayanabilmişlerdir. Endişe duyulan spor oluşturmaları arasında, gerek fakültatif aerobik tabiatı ve gerekse de insanlarda ölüme neden olabilmesinden dolayı *Bacillus cereus*, üzerinde en fazla çalışılan mikroorganizma olmuştur.

Genellikle Gram-pozitif vejetatif bakteriler, çevresel etkenlere Gram-negatif bakterilerin vejetatif hücrelerinden daha dirençlidirler. Bu tespit çoğunlukla basınca karşı direnci de içine alır. Yüksek hidrostatik basınç uygulamalarıyla

ilgili olarak patojen, spor oluşturmeyen Gram-pozitif bakteriler arasında *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* en çok çalışılan iki türdür. *Staphylococcus aureus*'un uygulanan basınca yüksek direnç gösterdiği belirlenmiştir. Çeşitli patojen Gram-negatif bakterilerin hassasiyet gösterdiği geniş bir basınç aralığı vardır. Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucunda, *E. Coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp.'nin basınca karşı sporlara eşdeğer direnç gösterdikleri ve bu mikroorganizmaların gıda güvenliğindeki önemleri ile gıdalarda etkili yüksek hidrostatik basınç uygulamalarının gelişiminde büyük öneme sahip olduklarını ortaya koymuşlardır.

Yüksek hidrostatik basıncın bakteriler üzerine etkileri: Isıya dirençli bakteriler, genellikle ısıya duyarlı olanlardan daha yüksek oranda basınca dirençlidir, fakat önemli istisnalar vardır. Örnek olarak S. Senftenberg 775W ısıya en dirençli olarak bilinen bakteridir. *Salmonella*'nın ısıya dirençli bir serotipi olan S. Typhimurium'a kıyasla (D_{57,5} = 3 dak) S. Senftenberg 775W basınca daha fazla duyarlılık göstermiştir (Metrick ve ark., 1989).

Gıdalarla taşınan çok önemli patojenlerden olan *Vibrio parahaemolyticus*, yüksek hidrostatik basınca çiğ gıdalarda sıkça rastlanan önemli bir Gram-pozitif bakteri olan *Listeria monocytogenes*'den daha hassastır (Styles ve ark., 1991). 23°C'lik tampon çözeltisindeki 10⁶ kob/mL *L. monocytogenes*, 345 MPa'lık bir basınç uygulamasıyla 20 dakika içinde inaktive olurken, midye suyu içinde aynı konsantrasyondaki *Vibrio parahaemolyticus*'a bu basıncın yarısı bir basınç uygulanmasında (173 MPa), bu zamanın yarısı kadar bir zaman içerisinde (10 dakika) inaktive edilmiştir. *L. monocytogenes* için süt, tampon çözeltisine kıyasla koruyucu bir etki oluşturmuştur (Metrick ve ark., 1989).

Sitrat tamponunda, düşük pH (3,0-4,0) ile kombine olarak uygulanan basınçta yaklaşık 10⁷ kob/mL konsantrasyonundaki *L. monocytogenes* 30 dakika içinde etkisiz hale getirilmiştir (Stewart ve ark., 1997). Besin ortamı olarak Trypticase soy agar (TSA) ile birlikte % 0,6'lık maya ekstratı kullanıldığında 6,0'nın altında bir pH'da, 304 MPa'lık bir basınç uygulaması da canlı bakteri bulunmaması ile sonuçlanmış olmakla birlikte, *Listeria*'lar için onarım agarı kullanıldığında, 10² kob/mL'lik bir konsantrasyonda

canlılıklarını yeniden kazanabilirler. Hayatta kalan bu hücreler, 5,6'nın altındaki bir pH'da canlılığını yeniden kazanamayan hasarlı bir alt-kültür oluştururlar.

Patterson ve ark. (1995), gıda zehirlenmesine yol açan bazı bakterilerin yüksek hidrostatik basınca tepkisini incelemişler, *Yersinia enterocolitica* sayısı, tuzlu fosfat tamponunda (PBS-phosphate-buffer-saline) 15 dakika süreli 275 MPa'lık bir basınç uygulamasıyla 5 logaritmik ünite düzeyinde indirgenmiştir. 15 dakikalık bir uygulamayla 5 logaritmik ünitelik bir indirgenme için *S.Typhimurium* 350 MPa, *L. monocytogenes* 375 MPa, *S.Enteritidis* 450 MPa, *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* 700 MPa'lık basınç uygulamasına ihtiyaç duymaktadırlar. Bakteriler, UHT sütte, etten veya tampondan daha yüksek bir basınç eğilimi göstermişlerdir.

Patterson ve Kilpatrick (1998) süt ve kanatlı etlerindeki *E. coli* O157:H7 NCTC 12079 ve *S. aureus* NCTC 10652'e karşı yüksek hidrostatik basınç işlemi uygulamışlar, yüksek hidrostatik basınç tek başına uygulandığında, her iki üründe de patojenlerin etkili inaktivasyonunu sağlamamış, UHT sütte 50°C'de 15 dakika boyunca 400 MPa'lık bir uygulama *E.coli* sayısını yaklaşık 5 logaritmik ünite düzeyinde indirgerken, aynı süre ve sıcaklıkta 500 MPa'lık bir uygulama *S. aureus* sayısında yaklaşık 6 logaritmik ünite düzeyinde bir indirgeme gerçekleştirmişlerdir.

Gervilla ve ark. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, *Listeria innocua* 910 CECT ile aşılana % 6 yağlı koyun sütü özel basınç uygulama sıcaklıklarının tayini amacıyla araştırılmış, *L.innocua*'yı inaktive etmek için 2°C'deki basınç uygulamalarının oda sıcaklığında (25°C) uygulanan basınçtan daha etkili, fakat 50°C'deki uygulamalardan daha az etkili olduğu bulunmuştur.

L. monocytogenes'in üç suşu geniş aralıkta bir basınç hassasiyeti göstermiştir (Simpson ve Gilmour, 1997). Scott A atmosfer sıcaklığında 30 dak. boyunca 450 MPa'lık uygulamayla elimine edilemezken, diğer suş (tavuk eti izolatu) 400 MPa'da 15 dakikalık bir uygulama sonucu uzaklaştırılmıştır (Her ikisi için başlangıç konsantrasyonu 5×10^8 kob/mL). Üçüncü suş ise NTC11994 30 dakika, 450 MPa'lık bir uygulama sonucu tamamen inaktive edilmiştir. Bu kültürlerle sığır, serum albumini,

glukoz ve zeytinyağı ile modifiye edilen tuzlu fosfat tamponunda (PBS) basınç uygulanmış, saf PBS ile kıyaslandığında, bu bileşenlerin *Listeria*'yı basınçla inaktivasyona karşı koruduğu bulunmuştur.

S. aureus, *L. monocytogenes*, *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 suşları için basınç dirençlerinin çeşitliliği Alpas ve ark. (1994) tarafından belirlenmiş ve bununla birlikte, türlerdeki basınç dirençlerinin dağılımı basınç uygulama sıcaklığı 25°C'den 50°C'ye yükseltildiğinde belirgin olarak azalmıştır. Bu sonuç, yüksek hidrostatik basıncın ılımlı bir ısıyla birlikte gerçekleştirilmesi gerekliliği için bir başka sebebi açıklamaktadır.

Yüksek hidrostatik basıncın bakteri sporları üzerine etkileri: 800 MPa'nın üzerindeki yüksek hidrostatik basınçlar kullanılmadığı müddetçe, düşük asitli gıdalarda bakteri endosporlarının etkili bir biçimde uzaklaştırılması için, yüksek hidrostatik basınç ile kombine olarak ısı uygulaması bir gerekliliktir. Yüksek hidrostatik basınç ile inaktivasyona en büyük direnci bakteri sporları gösterir.

Clouston ve Wills (1969) 25°C'de 1700 MPa'la kadar olan yüksek hidrostatik basıncın *Bacillus pumilus* sporlarının ısı ve radyasyon direncine etkisini incelemişler, germinasyonun başlangıcının 500 MPa'nın üzerindeki basınçlarda gerçekleştiği ve bu basınçla inaktivasyonun ön şartı olduğu bulunmuştur. Butz ve ark. (1992) 25-40 °C sıcaklıklarda, 150 ve 450 MPa arasındaki basınçların bakteriyel sporlar üzerine etkisini araştırmışlar ve nispeten daha düşük basınçlarla (60-100 MPa) bir ön muamelenin yüksek basınçta sporların hızlandırılmış inaktivasyonlarına yol açacağını göstermişlerdir. Sporların inaktivasyonu için, birkaç çalışmada HPP'nin iki-aşamalı uygulaması konusunda benzer öneriler getirmektedir. İlk uygulama sporları çimlendirir veya aktive eder ve daha yüksek bir basınçta ikinci bir uygulama çimlenmiş sporları ve vejetatif hücreleri inaktive eder (Heinz ve Knorr, 1998).

Yüksek hidrostatik basıncın mayalar ve küfler üzerine etkileri: Mayalar gıdaları bozan önemli bir mikroorganizma grubudur, fakat hiç biri önemli bir gıda patojeni değildir. Toksikjenik küf gelişmesi gıda güvenliği açısından önemlidir. Butz ve ark. (1996) ısıya dirençli küfler *Byssochlamys nivea*,

Byssoschlamys fulva, *Eurotium (Aspergillus fisheri)*, *Eupenicillium* spp. ve *Paecilomyces* spp.'nin değişik uygulama sıcaklıklarıyla (10-70°C) kombine olarak kullanılan 300 ile 800 MPa arasındaki yüksek hidrostatik basınç uygulamalarına tepkilerini incelemişlerdir. Tüm vejetatif formlar 25°C/300 MPa'lık bir uygulama ile birkaç dakika içinde inaktive edilmiş, ne var ki askosporların inaktivasyonu için daha yüksek basınçlar gerektirmiştir. 600 MPa'lık bir uygulama 60 dakika içinde *Byssoschlamys nivea* ve *Eupenicillium* askosporları dışında tüm askosporları imha etmiştir. *Byssoschlamys nivea*'nin 10⁶ kob/mL'nin altındaki başlangıç popülasyonunu 10 dakika içinde tahrip etmek için 800 MPa'lık işleme basıncı ve 70°C'lik işleme ısısı gerekmiştir. 10°C'de 600 MPa'lık bir basınç 10⁷ kob/mL'lik *Eupenicillium*'u 10 dakika içinde elimine etmek için yeterli gelmiştir. 4-7 aralığındaki pH'nın *Byssoschlamys* türlerinin basınçla inaktivasyonunda çok küçük bir etkisi olduğu görülmüştür. Diğer taraftan düşük su aktiviteleri (0,89) üzüm suyunda ve tuzlu suya kıyasla askosporların basınca karşı hassasiyetini artırmıştır.

Yüksek hidrostatik basıncın virüsler üzerine etkileri: Virüslerin yüksek basınca karşı tepkilerini hesaplamak için ilk teşebbüs Giddings ve ark. (1929) tarafından tütün mozaik virüsüyle (TMV) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada TMV'nin inaktivasyonunun etkili olması için 135.000 psi (920 MPa)'lık basınç gerektiği belirlenmiştir. Virüsler arasında yüksek seviyelerde yapısal çeşitlilik vardır ve bu çeşitlilik geniş aralıktaki basınç dirençleriyle yansıtılır (Smelt, 1998). İnsan patojeni virüslerin basınca TMV'den daha yüksek oranda hassasiyet gösterdiği ortaya çıkmıştır. Brauch ve ark. (1990) bakteriyofajların (DNA virüs) 300-400 MPa arasındaki uygulamalarda dikkate değer biçimde inaktive olduğunu gösterirken, Butz ve ark. (1992) de *Sindbis* virüsünün 20°C'de 300-700 MPa arasındaki basınçlardan nispeten etkilenmediğini göstermişlerdir. Shigehisa ve ark. (1996) *Herpes simplex* virüsü tip 1'in 400 MPa'da 10 dakikalık bir uygulamayla 8 log PFU (plaque forming unit)'lik indirgenmesini ve insan *citomegalovirus*'unun ise 300 MPa'da 10 dakikalık bir uygulamayla 5 log PFU'luk yıkımını göstermişlerdir. Shigehisa ve ark. (1996) ayrıca HIV tip 1 üzerine basınç etkilerini

değerlendirmişler ve HIV tip 1'in 5,5 log doku kültürü enfekte edici dozunun 25°C'de 400 MPa'da 10 dakikalık bir uygulamadan sonra elimine edildiğini ancak daha düşük düzeyde basınç uygulamalarının etkisiz kaldığını bulmuşlardır.

Yüksek hidrostatik basıncın parazitler üzerine etkileri: *Cryptosporidium* ve *Cylospora*'nın çeşitleri ve sporları ile protozoanlardan *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia*'nin basınç dirençleri üzerinde bilgi eksikliği vardır. Bilgiler henüz tam olarak açığa kavuşturulmamış olmasına rağmen, bu parazitlerin hayatta kalan formlarının basınca bakteriyel spordan ve bakteriyel hücrelerden daha hassas olacağını varsaymak mümkündür. *Trichinella spiralis*'in 200 MPa'da 10 dakikalık bir uygulamayla öldürüldüğü tespit edilmiştir (Ohnishi, 1993). *Cryptosporidium* ve *Cylospora*'nın basınç dirençlerini değerlendirmek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç olsa da, parazitlerin bakteriler kadar basınca hassas olmadığını varsaymak mümkündür.

Kritik işlem faktörleri

Yüksek hidrostatik basınç uygulamalarında kritik olan işlem faktörleri; (1) Mikroorganizma tipi, (2) Kültür hazırlama, mikroorganizmanın yaşı ve çoğalma şartları, (3) Gıdanın bileşimi ve pH, (4) Su aktivitesi (a_w), (5) Sıcaklık, (6) Basınç (Şiddeti, Kompresyon ve dekompresyon hızları, Uygulama basıncına ulaşmak için gerekli süre, Basınç uygulama süresi), (7) Sekonder Faktörler (Redoks potansiyeli, Bakteriyosinlerin ilavesi) olarak sıralanabilir.

Mikroorganizma tipi: Bazı önemli istisnalara rağmen genellikle Gram pozitif bakteriler basınca Gram negatif bakterilerden daha dayanıklıdır. Mackey ve ark. (1995) hiçbir direkt ölçüm yapmamış olmalarına karşın daha akışkan bir membrana sahip bakterilerin yüksek basınca daha dirençli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kültür hazırlama, mikroorganizmanın yaşı, çoğalma şartları: Genel olarak, ekspanansiyel çoğalma fazında olan hücreler basınca durgunluk fazında olan hücrelere kıyasla daha duyarlıdır. Basınçla mikroorganizmaların tamamlanmamış inaktivasyonları, optimal çoğalma şartlarında hasarlı hücrelerin kendilerini onarmasına sebep olacaktır (Farkas ve Hoover, 2000).

Gıdanın bileşimi ve pH'sı: Genel olarak asit gıdalarda bulunan mikroorganizmalar basınçla inaktivasyona, yüksek pH'ya sahip gıdalardakilerden daha dayanıksızdırlar. Dolayısıyla asidik pH uygulamalarıyla inaktivasyon hızları artırılır. Gıdaların kompresyonu, uygulanan basıncın bir fonksiyonu olarak gıdanın pH'sını değiştirebilir. Heremans (1995) elma suyunda, basınçta her 100 MPa'lık bir artışın, pH'da 0,5 birimlik bir azalmaya yol açtığına işaret eder. pH değişiminin yönü ve şiddeti her bir gıda işleme prosesi için belirlenmelidir. pH'nın düşürülmesiyle birlikte çoğu mikroorganizma yüksek hidrostatik basınçla inaktivasyona daha dirençsiz hale gelir ve subletal strese giren hücrelerin kendilerini onarması güçleşir.

Su aktivitesi (a_w): Basıncın bir fonksiyonu olarak, eğer varsa, su aktivitesinin yönündeki ve şiddetindeki değişim henüz bildirilmemiştir. Oxen ve Knorr (1993) su aktivitesinin 0,98-1,00'den 0,94-0,96'ya indirilmesinin, bir gıdada bulunan mikroorganizmaların inaktivasyon hızlarında göze çarpan bir azalmayla sonuçlandığını göstermiştir. Su aktivitesindeki azalmanın mikroorganizmaları yüksek hidrostatik basınçla inaktivasyona karşı koruduğu görülür. Öte yandan, mikrobiyal hücrelerin basınçla subletal hasar görebileceği ve düşük su aktivitesinin bu hücrelerin onarımını inhibe edeceği beklenebilir. Sonuçta, su aktivitesinin net etkisi hakkında bir tespit bulunmak zor olabilir. Gıdalar mikroorganizmalar için, mikrobiyolojik besin ortamı ve tamponlara kıyasla daha iyi basınç koruyucu ortamlardır.

Linton ve ark. (1999), pH'nın *E. coli* O157:H7'nin inaktivasyon hızına belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir. pH düştükçe, çoğu mikroorganizma yüksek hidrostatik basınç ile inaktivasyona daha dirençsiz hale gelip ve ölmeye yakın düzeyde hasar gören hücrelerin onarımı başarısız olduğundan, pH ve su aktivitesi yüksek hidrostatik basınç ile işlem görmüş gıdalarda toplum sağlığı bakımından öneme sahip patojen mikroorganizmaların inaktivasyonunda önemli kritik işleme faktörleri arasında yer alır.

Sıcaklık: Gıda sıcaklığında, oda sıcaklığının üzerinde az bir yükselmenin ve kısmen de oda sıcaklığının altına bir düşüşün, yüksek basınç uygulaması sırasında mikroorganizmaların inaktivasyon hızını

artırdığı bulunmuştur. 45-50°C arasındaki sıcaklıkların gıda patojenlerinin ve gıdaları bozan mikroorganizmaların inaktivasyon hızlarını artırdığı belirlenmiştir. *C. botulinum* gibi spor oluşturan bakterilerin inaktivasyonu için 500-700 MPa'lık basınçlarla birlikte 90-110°C'lik sıcaklıklar kullanılır (Farkas ve Hoover, 2000).

Basınç: Basınç şiddeti, zamanı ve basınç işleminin uygulandığı sıcaklığın yükseltilmesi, bakteriyel endosporlar istisna olarak, inaktif olan mikroorganizmaların sayısını artırır. Basınç uygulama süresi ne kadar olursa olsun, altındaki her hangi bir derecede basınçla mikrobiyal inaktivasyonun gerçekleşmeyeceği "minimum kritik basınç" vardır. HPP'de göz ardı edilmemesi gereken önemli bilgi parçaları çıkış süreleri (uygulama basıncına ulaşmak için gerekli süre), basıncın kesilme zamanları ve kompresyona bağlı olarak sıcaklıktaki değişimlerdir (Zook ve ark., 1999).

Sekonder faktörler: Diğer faktörler HPP'nin "etkinliğinde" önemli rol oynar. Mesela, basınç çözücüsünün redoks potansiyeli bazı mikroorganizmaların inaktivasyonunda önemli olabilir (Hoover, 1993). Bakteriyosinlerin ilavesi de mikroorganizmaların basınçla inaktivasyonuna etki edebilir.

Sonuç

Yüksek hidrostatik basınç, bazı olumsuzluklarından dolayı diğer muhafaza metodlarıyla kombine olarak uygulanmalıdır. Bu olumsuzluklardan en başta geleni enzimatik etkinliklerin (polifenol oksidazlar) ve oksijenin yol açtığı enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Düşük pH'larından dolayı meyve ve sebzelerde, yüksek hidrostatik basıncın oldukça etkili olmasına rağmen, sınırlandırıcı parametre olan esmerleştirici enzimlerin varlığından dolayı oksijeni uzaklaştırmak için ürünü haşlamak, işlemeyen hemen sonra dondurmak veya vakum uygulamasıyla birlikte askorbik asit kullanarak esmerleşme reaksiyonlarını önlemek gerekmektedir. Halihazırda pazarda yüksek hidrostatik basınçla muhafaza edilmiş sınırlı sayıda ürün vardır ve bu yüzden ticari işlemlere dayandırılacak sadece az sayıda endüstriyel tecrübe mevcuttur. Belirlenmiş basınç-sıcaklık kombinasyonları, gıdaların yüksek hidrostatik basınçla muamelesi için cihazları üreten

şirketlere aktüel işleme maliyet hesaplarını geliştirmekte yardım edecektir. Yüksek basınç uygulama cihazlarının ilk tesis maliyetleri, yükselen işlem basıncıyla birlikte üstsel olarak

artmaktadır. İşleme maliyetleri; basınç uygulama süresi ve sistemi çalıştırma maliyetlerinden doğrudan etkilenir (Farkas ve Hoover, 2000).

Kaynaklar

- Alpas, H., Kalchayandand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. and Ray, B. 1994. Hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4248-4251.
- Bauer, B.A. and Knorr, D. 2005. The impact of pressure, temperature and treatment time on starches: pressure-induced starch gelatinisation as pressure time temperature indicator for high hydrostatic pressure processing. *J. Food Engineering* 68: 329-334.
- Brauch, G., Haensler, U. and Ludwig, H. 1990. The effect of pressure on bacteriophages. *High Pressure Res.* 5: 767-769.
- Butz, P., Habison, G. and Ludwig, H. 1992. Influence of high pressure on a lipid-coated virus. In: *High Pressure and Biotechnology.* (Eds.: R. Hayashi, K. Heremans, P. Masso). Jhon Libby & Co. Ltd. London. pp. 61-64.
- Butz, P., Funtenberger, S., Haberditzil, T. and Tauscher, B. 1996. High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat-resistant moulds. *Lebensm. Wiss. Technol.* 29: 404-410.
- Clouston, J.G. and Wills, P.A. 1969. Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* 97: 684-690.
- Farkas, D.F. and Hoover, D.G. 2000. High Pressure Processing. In: *Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies.* *J. Food Sci. Special Supplement.* pp. 47-64.
- Fox, P.F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72: 1379-1408.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V. and Guamis, B. 1997. Effect of hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewes' milk. *J. Food Protect.* 60: 33-37.
- Giddings, N.J., Allard, H.A. and Hite, B.H. 1929. Inactivation of the tobacco mosaic virus by high pressure. *Phytopathology* 19: 749-750 (in: Farkas and Hoover, 2000).
- Heinz, V. and Knorr, D. 1998. High pressure germination and inactivation kinetics of bacterial spores. In: *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry.* (Ed.: N.S. Isaacs). The Royal Soc. Chem. Cambridge, UK. pp. 436-441.
- Heremans, K. 1995. High pressure effects on biomolecules. In: *High Pressure Processing of Foods.* (Eds.: D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw and A.P.M. Hasting). Nottingham Uni. Press. Leicestershire, UK.
- Hite, B.H. 1899. The effects of pressure in the preservation of milk. Morgantown. *Bull WV Univ. Agric. Exp. Sta. Morgantown* 58: 15-38 (in: Farkas and Hoover, 2000).
- Hite, B.H., Giddings, N.J. and Weakly, C.E. 1914. The effects of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. Morgantown. *Bull WV Univ. Agric. Exp. Sta. Morgantown* 146: 1-67 (in: Farkas and Hoover, 2000).
- Hoover, D.G. 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technol.* 47: 150-155.
- Jay, J.J. 1992. *Modern Food Microbiology.* Chapman Hall, New York.
- Larsen, W.P., Hartzell, T.B. and Diehl, H.S. 1918. The effects of high pressure on bacteria. *J. Inf. Diseases* 22: 271-279 (in: Farkas and Hoover, 2000).
- Linton, M., McClements, J.M.J. and Patterson, M.F. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. *J. Food Protect.* 62: 277-279.
- Mackey, B.M., Forestiere, K. and Isaacs, N. 1995. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.* 9: 1-11.
- Marquis, R.E. and Bender, G.R. 1987. Barophysiology of prokaryotes and proton-translocating ATPases. In: *Current Perspectives in High Pressure Biology.* (Eds.: H.W. Jannisch, R.E. Marquis and A.M. Zimmermann). Academic Press. London. pp. 65-73.
- Metrick, C., Hoover, D.G. and Farkas, D.F. 1989. Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *J. Food Sci.* 54: 1547-1564.
- Minerich, P.L. and Labuza, T.P. 2003. Development of a pressure indicator for high hydrostatic pressure processing of foods. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 4: 235-243.

- Ohnishi, K. 1993. Pressurization of *Trichinella spiralis*. Japanese-only book of Japanese pressure consortium proceedings. Chapter 17 (in: Farkas and Hoover, 2000).
- Oxen, P. and Knorr, D. 1993. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivations of *Rhodotorula rubra*. Lebensm. Wiss. Technol. 26: 220-223.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. and Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. J. Food Protect. 58: 524-529.
- Patterson, M.F. and Kilpatrick, D.J. 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. J. Food Protect. 61: 432-436.
- Russell, N.J. 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing: An overview. Int. J. Food Microbiol. 79: 27-34.
- Shigehisa, T. Nakagami, H., Ohno, H., Okate, T., Kawahata, T., Morimoto, M. and Ueba, N. 1996. Inactivation of HIV in bloodplasma by high hydrostatic pressure. In: High pressure bioscience and biotechnology. (Eds.: R. Hayashi and C. Balny). Elsevier Science. pp. 273-278.
- Simpson, R.K. and Gilmour, A. 1997. The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. Let. Appl. Microbiol. 25: 48-53.
- Smelt, J.P.P. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends Food Sci. Technol. 9: 152-158.
- Stewart, C.M., Jewett Jr., F.F. and Dunne, C.P., 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.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. and Farkas, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. J. Food Sci. 56: 1404-1407.
- Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. and Guamis, B. 2002. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. Innovative Food Sci. Emerging Technol. 3: 295-307.
- Zook, C.D., Parish, M.E., Braddock, R.J. and Balaban, M.O. 1999. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juice. J. Food Sci. 64: 533-535.