

YÜKSEK HİDROSTATİK BASINÇ (YHB) DEĞİŞKEN PARAMETRELERİNİN *Listeria innocua* HÜCRELERİNİN D VE Z DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURIZATION (HHP) VARIABLE PARAMETERS ON D and Z VALUES OF *Listeria innocua*

Hami ALPAS, Faruk BOZOĞLU

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 06531 Ankara, Türkiye

ÖZET: Bu çalışmada 138-345 MPa yüksek hidrostatik basınç, 25-50°C sıcaklık ve 5-30 dakika zaman kombinasyonlarının %0,1'lik pepton solüsyonu içerisindeki (patojen olmayan fakat diğer tüm özellikleri patojen *Listeria monocytogenes* ile benzer) *Listeria innocua* suşunun canlılığına etkileri çalışılmıştır. Normal koşullarda 50°C sıcaklığa hassas olmayan *L. innocua* hücrelerinin 345 MPa basınç ve 50°C sıcaklık kombinasyonuna karşı hassasiyet geliştirdikleri gözlenmiştir. Sonuçlar *L. innocua* hücrelerinin normal koşullardaki büyüme sıcaklıklarında ($\leq 40^\circ\text{C}$) bile hidrostatik basınç kullanılarak öldürülebileceklerini göstermektedir. Çalışılan değerler içinde 50°C'de 345 MPa basıncın hücre canlılığını 9,1 dakikada 7 log azalttığı ve bu koşullarda z-değerinin 173,1 MPa olduğu bulunmuştur.

ABSTRACT: In this study, the combined effectiveness of 138 to 345 MPa, 25 to 50°C and 5 to 30 min to *Listeria innocua* (which is not pathogen but has similar characteristics with pathogen *Listeria monocytogenes*) in 0,1% peptone solution is studied. A proportionately greater sensitivity of the cells to 50°C at 345 MPa was observed whereas the strain is not sensitive to 50°C under normal conditions. The results also show that *L. innocua* cells can be killed by hydrostatic pressure at a predictable rate, even at temperatures at which the strain would normally grow ($\leq 40^\circ\text{C}$). Under the study conditions only the combination of 345 MPa, 50°C and 9,1 min can reduce the viability of this species by 7 logs with a z value of 173,1 MPa.

GİRİŞ ve KAYNAK TARAMASI

Yüksek hidrostatik basınç (YHB), mikroorganizmalara zarar verme özelliğiyle gıdalarda soğuk pastörizasyon metodu olarak son yıllarda ilgi uyandırmıştır (HOOVER ve ark., 1991). Isısal işlemle karşılaştırılırsa, gıdaların besin ve kabul kalitelerini etkilemediği ve enerji verimliliği sağladığı görülür (CHEFTEL ve ark., 1992). Hidrostatik basınç; basınç, zaman ve sıcaklıktan oluşan üç değişkenli bir sistemdir. Bu metodun gıdaların korunumunda etkin olarak kullanılması için bu faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerinin ve hedeflenen mikrobiyolojik zararı sağlayacak minimum koşulların bulunması gereklidir. Son 10 yılda yapılan çalışmalarda, 20-25°C sıcaklık ve 170-690 MPa aralığında basınç uygulamasını takiben gıdalarda bozunuma ve hastalığa yolaçan bakterilerin yaşam kaybı kinetikleri fosfat solüsyonu ve bazı gıda sistemlerinde çalışılmıştır (METRICK ve ark., 1989; STYLES ve ark., 1991; KALCHAYANAND ve ark., 1994; PATTERSON ve ark., 1995). Bu çalışmalarda genel olarak 25°C'de 30 dakika süresince 205 MPa'lık basıncın birçok bakteri türünde ancak 1 logluk yaşam kaybı sağlayabildiği görülmektedir. 25°C ve 345 MPa basınç kombinasyonunda birçok bakteri türü için D-değerleri (verilen sıcaklıkta mikrobik popülasyonu %90 azaltmak için gerekli süre) fosfat solüsyonunda 3 ila 7 dakika, süt ve tavuk suyunda ise 7 ila 13 dakika arasında değişmektedir. *Salmonella enteritidis*, *Escherichia Coli* o 157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojenlerin D-değerlerini 25°C'de 3 dakikanın altında tutmak için ise 480-690 MPa arası bir basınç uygulamak gereklidir (PATTERSON ve ark., 1995). Hidrostatik basınç uygulamasının kesikli bir işlem olması (sürekli işlem yerine) ve yüksek basınç değerlerinde yüksek ekipman maliyeti ve metal yorgunluğuna bağlı olarak dayanıklılık süresinin azalması bu metodun ticari kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca yüksek basınç değerlerinde et gibi bazı gıdaların doğal renk ve yapılarında kabul kalitelerini etkileyen değişikliklerde olabilmektedir. (ELGASIM ve KENNICK). Fakat tüm bu dezavantajlar daha düşük basınç değerlerini daha kısa sürelerde ve göreceli olarak daha yüksek sıcaklıklarda (40-50°C) uygulayarak aşılabilir (MERTENS ve DEPLACE 1993). 345 MPa basınç ve 25°C'de hedef bir mikroorganizmanın popülasyonunu 7 log azaltmak için fosfat solü-

yonunda bile yaklaşık 50 dakikalık basınç uygulaması gerekmektedir ki bu hidrostatik basınç işlemini gıdaların korunumunda ticari amaçlarla kullanmak için çok uzun bir süredir. Göreceli yüksek sıcaklıklarda basınç uygulamasının bakterilerin yaşam kaybını hızlandırdığı sınırlı sayıda çalışmada belirtilmiştir (LUDWIG ve ark., 1992). Bizim bu çalışmadaki amacımız, ortalama hidrostatik basınç (138-345 MPa) ortalama sıcaklık (25-50°C) ve kısa zaman (5-15 dakika) kombinasyonlarında *Listeria innocua* suşunun (patojen olmayan fakat diğer tüm özellikleri patojen *Listeria monocytogenes* ile benzer) yaşam kaybı kinetiğini çalışmak ve hücre canlılığını 7 log azaltmak için gerekli basınç-zaman-sıcaklık kombinasyonlarını bulmaktır. Bu çalışma literatürdeki sıcaklık ve basınç kombinasyonlarının kullanıldığı ilk çalışmayı içermektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Mikrobik Büyüme ve Hücre Süspansiyonu

L. innocua CWD47 (Dr. John Sofos, Kolorado Eyalet Üniversitesi, A.B.D.) Triptikaz Soya Broth'da (Difco, A.B.D.) 37°C'de 16 saat süreyle büyütülmüştür. Büyüyen hücreler sentrifüjlenmiş ve %0,1'lik pepton solüsyonunda son konsantrasyon 10^8 - 10^9 hücre/ml olacak şekilde seyreltikten sonra 2 ml'lik bölümler halinde steril plastik tüplere (Simport Plastic, Kanada) doldurulmuşlardır. Hazırlanan plastik tüpler tek tek plastik torbalara konup vakumlanmış ve basınç işlemine hazır hale getirilmiştir.

Hidrostatik Basınçlama

Bu çalışmada kullanılan hidrostatik basınç ekipmanı, %95 su ve %5 yağ karışımı ile dolu 25x35 cm ölçülerine bir basınçlama tankına sahiptir. (Engineered Pressure Systems, A.B.D.) Tankın etrafındaki ceketli ısıtma sistemiyle tankın içindeki sıvıyı 25-95°C arasında ısıtmak mümkündür. Sistemdeki basınç ve sıcaklık otomatik olarak kontrol edilmekte ve kaydedilmektedir. Hücre süspansiyonlarını içeren plastik tüpler (2'şer adet) her çalışmadan önce basınç tankına konmuş ve ayarlanan sıcaklıkta ısasal dengenin sağlanması için 2-3 dakika tutulmuştur. Tüpler bu sürenin sonunda çalışılan basınç,zaman-sıcaklık kombinasyonunda basınçlanmış ve her basınç işleminin sonunda buzlu suya transfer edilerek mikrobiyolojik sayım için kullanılmışlardır.

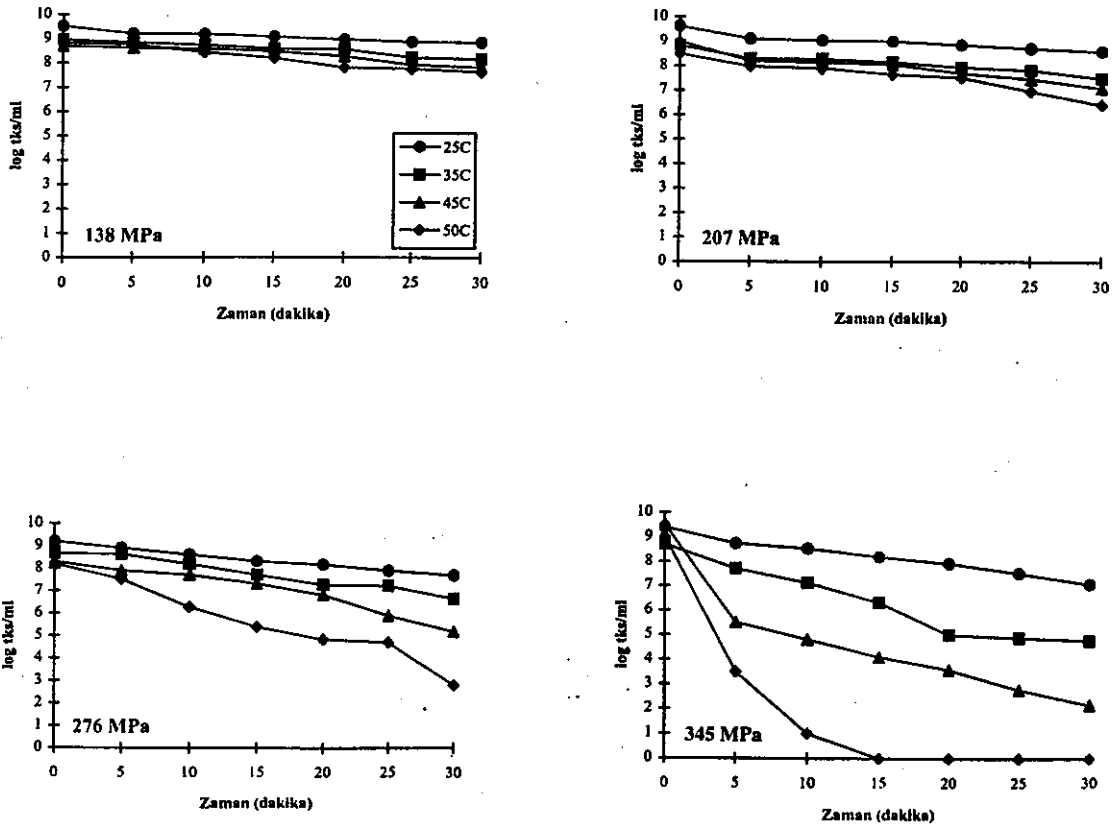
Bakteri Sayımı

Basınçlanan tüplerdeki hücre süspansiyonları %0,1'lik pepton solüsyonunda seyreltilmiş ve her dilüsyon (her tüp için) önceden hazırlanmış Triptikaz Soya Agar (Difco, A.B.D.) içeren iki petriye yüzeye yayma metoduyla ekilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra toplam koloni sayımı (tk) için kullanılmıştır. Sonuçların hesaplanmasında toplam dört sayımın (2 tüp X 2 petri) averajı alınmıştır. Basınç uygulanmamış hücre süspansiyonları ise başlangıç toplam koloni sayılarının (tk/ml) belirlenmesinde kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, 25-50°C sıcaklık, 138-345 MPa basınç ve 5-30 dakika kombinasyonlarında *Listeria innocua* hücrelerinin yaşam kaybı kinetiği çalışılmıştır. Genel olarak basınç, basınç sıcaklığı ve zamanı arttıkça hücre yaşam kaybı da artmıştır. 50°C'de 30 dakikada 138 ve 207 MPa'da basınçlama sonucu toplam koloni sayısında 1 ve 2 logluk bir azalma gözlenmiştir. *L. monocytogenes* suşları içinde 25°C'de 207 MPa'lık basıncın 40 dakika uygulanması sonucunda yaşam kayıplarının benzer şekilde düşük olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (STYLES ve ark., 1991; KALCHAYANAND ve ark., 1994; PATTERSON ve ark., 1995). 276 MPa'da 30 dakikalık basınç sonucu hücre yaşam kayıpları 25°C'de 1,5 log, 35°C'de 2,0 log ve 45°C'de 3,1 log iken 50°C'de 5,4 loga yükselmiştir. Bu veriler, *L. innocua* hücrelerinin 50°C'de basınç 276 MPa'la ulaştığında hassaslıklarının ani olarak arttığını göstermektedir. Bununla beraber elde ettiğimiz verilerden 276 MPa basınçta, basınç sıcaklığı 50°C'nin üstüne çıkmadıkça ve/veya basınç süresi 30 dakikadan fazla tutulmadıkça hücre canlılığında hedeflenen 7 logluk azalmaya ulaşılamayacağı görülmüştür. Basınç 345 MPa'la ulaştığında, 30 dakika ve 45°C kombinasyonu hücre canlılığında 7,3 logluk; 50°C ve 10 dakika kombinasyonu ile ise 8 logluk bir azalma sağlanmıştır.345 MPa'da değişik sıcaklıklarda basınçlama sonucunda elde edilen hücre canlılık kaybı eğrilerinin karşılaştırması, normal koşullarda 50°C sıcaklıkta hassas olmayan *L. innocua* hücrelerinin basınçla beraber 50°C sıcaklığa karşı hassasiyet geliştirdiklerini göstermiştir.

L. innocua suşunun değişik sıcaklıklarda hidrostatik basınçlanması sonucu elde edilen canlılık kaybı Şekil 1'de verilmiştir. Bu sonuçlar bize ayrıca *L. innocua* hücrelerinin normal koşullardaki büyüme sıcaklıklarında ($\leq 40^\circ\text{C}$) bile hidrostatik basınç kullanılarak öldürülebileceklerini göstermektedir (STYLES ve ark., 1991). Şekildeki canlılık kaybı değerlerinden her koşuldaki D-değerleri hesaplanmıştır. D-değerlerini sıcaklığın birer foksiyonunu olarak değerlendirirsek bu çalışmada uygulanan herhangi bir basınç değerinde hücrelerin hassaslıklarının sıcaklık 25°C 'den 35°C 'ye ve ondan sonrada 45°C 'ye yükseldikçe arttığını görürüz. Bunun göstergesi olarak, 138 MPa basınçta D-değerleri 25°C 'de 50,8 dakika iken, 35°C 'de 36 dakikaya düşmüş ve fakat 45°C 'de sadece 34,8 dakika olarak hesaplanmıştır. Diğer basınç değerlerinde de benzer bir trend gözlenmiştir. Buna bağlı olarak çalışılan en düşük basınç değeri olan 138 MPa'da bile sıcaklığın 45°C 'den 50°C 'ye yükselmesi hücrelerin hassaslığını arttırmış ve D-değerleri 45°C 'de 34,8 dakika iken 50°C 'de 22,4 dakikaya düşmüştür.



Şekil 1. Yüksek hidrostatik basınç (YHB) parametrelerinin %0.1'lik pepton solüsyonunda *Listeria innocua* CWD47 hücrelerinin yaşam kaybına etkileri.

L. innocua suşunun basınçla beraber değişik sıcaklıklardaki z-değerleri ise 170-370 MPa arasında değişmektedir. Burada, z-değeri (MPa) verilen sıcaklıktaki D-değerini 10 misli değiştirmek için gerekli basınç olarak tanımlanmıştır (MUSSA ve RAMASWAMY, 1994). Sıcaklık 25°C 'den 50°C 'ye yükseldikçe, 45°C hariç, z-değerinde (MPa) azalma gözlenmiştir. Sıcaklık çalışılan en üst değer olan 50°C 'ye ulaştığında ise z-değeri 301 MPa'dan 170 MPa'a düşmüştür.

Bu çalışmada esas amaç bakteri popülasyonlarında en az 7 log azalma sağlayacak basınç, sıcaklık ve zaman kombinasyonlarının bulunmasıdır. Elde edilen verilerden 50°C 'de 345 MPa basıncın 10 dakika süreyle uygulanmasının bunu sağladığı görülmüştür. Bu koşullarda 1,3 dakikalık D-değeri ve 173.2 MPa'lık z-değeriyle 9,1 dakika içinde *L. innocua* popülasyonunda 7 logluk azalmanın sağlanabileceği bulunmuştur. Benzer koşullarda basınçlama sonucunda 25°C 'de süt ve tavuk suyundaki *L. monocytogenes* suşlarının D-değerlerinin pepton solüsyonuna göre daha yüksek olduğu sınırlı sayıda araştırmacı tarafından belirtilmiştir. (STYLES ve ark., 1991;

PATTERSON ve ark., 1995). Gıda sistemleri içerisinde patojen hücreler basınca karşı göreceli olarak daha fazla dayanıklılık geliştirdikleri için, gıdalar için önemli patojenlerin (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* gibi) 345 MPa ve 50°C kombinasyonlarında D-değerlerinin bulunması çok önemlidir. Basınç, zaman ve sıcaklık üçlü kombinasyonlarına bakteriosin ya da lizozim gibi antibakteriyel koruyucuların eklenmesi ise gıdalar için önemli olan birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin canlılık kayıplarında artış sağlayacaktır (KALCHAYANAND ve ark., 1994). Böyle bir sistem ise hidrostatik basınç işlemini gıdaların korunumunda tek dört parametrelili sistem haline getirecektir.

KAYNAKLAR

- CHEFTEL, J.C. 1992. Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. Colloque INSERM 224: 195-209.
- ELGASIM, E.A., KENNICK, W.H. 1980. Effects of pressurization of prerigor beef muscles on protein quality. J. of Food Sci. 45: 1122-1124.
- HOOVER, D.G., METRICK, C., PAPINEAU, A.P., FARKAS, D.F., KNORR, D. 1989 Biological effects of high-hydrostatic-pressure on food microorganisms. Food Technol. 43(4): 99-107.
- KALCHAYANAND, N., SIKES, T., DUNNE, C.P., RAY, B. 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. Appl. Environ. Microb. 60: 4174-4177.
- LUDWIG, H., BIELLER, C., HALLBAUER, K., SCIGALLA, W. 1992. Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. Colloque INSERM 224: 25-32.
- MERTENS, B., DEPLACE, G. 1993. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. Food Tech. 47(6): 164-170.
- METRICK, C., HOOVER D.G., FARKAS, D.F. 1989. Effect of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat sensitive strains of Salmonella. J. Food Sci. 54: 1547-1549 ve 1564.
- MUSSA, D.M., RAMASWAMY, H.S. 1994. Changes associated with ultra high pressure treatment of milk. NABEC-94 Northeast Agr/Bio-Engineering Conference, American Society of Agricultural Engineers, University of Guelph, Ontario, Canada.
- PATTERSON, M.F., QUINN, M., SIMPSON, R., GILMORE, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. J. Food Prot. 58: 524-529.
- STYLES, M.F., HOOVER, D.G., FARKAS, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. J. Food Sci. 56: 1404-1407.