T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FOSFAT TAMPONU VE VİŞNE SUYUNA İNOKÜLE EDİLEN *Saccharomyces cerevisiae* VE *S. boulardii*'NİN DONMA İLE BİRLİKTE YÜKSEK HİDROSTATİK BASINÇLA İNAKTİVASYONU

Figen İDRİSOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sami BULUT

EDİRNE-2023

Figen İDRİSOĞLU'nun hazırladığı "**FOSFAT TAMPONU VE VİŞNE SUYUNA İNOKÜLE EDİLEN *Saccharomyces cerevisiae* VE *S. boulardii*'NİN DONMA İLE BİRLİKTE YÜKSEK HİDROSTATİK BASINÇLA İNAKTİVASYONU**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ** Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Sami BULUT	……
Dr. Öğr. Üyesi Ufuk BAĞCI	……
Prof. Dr. Sencer BUZRUL	……

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2023

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Sami BULUT
Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

17 / 01 / 2023

Figen İDRİSOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Fosfat tamponu ve vişne suyuna inoküle edilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *S. boulardii*'nin donma ile birlikte yüksek hidrostatik basınçla inaktivasyonu.

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği

ÖZET

Bu çalışmada iki farklı pH'a (3.2 ve 7.1) sahip fosfat tamponu (PBS) ve vişne suyuna (pH 3.2) inoküle edilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii* ile hazırlanan örnekler yüksek hidrostatik basınca (YHB) tabi tutulmuştur. YHB işlemi için sıcaklığın sabit tutulduğu denemelerde uygulanan basınç 150-450 MPa aralığında değişirken, basınçlama süresi olarak 3-9 dk kullanılmıştır. Mikroorganizma kültürleri ile inoküle edilerek hazırlanan örneklerin bir kısmı 4 ℃'de bir kısmı da -20 ℃'de bir gece bekletildikten sonra basınca tabi tutulmuştur. Basınçlamadan önce dondurulan örneklerde (d+) mikrobiyal inaktivasyon, dondurulmadan basınçlanan örneklere (d-) kıyasla daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Düşük basınçlarda (150-250 MPa) 6 dk'lık işlem sonrası d+ örneklerindeki mikrobiyal azalma d- örneklerine kıyasla önemli düzeyde yüksek gerçekleşirken, daha yüksek basınçlarda (300-350 MPa) d+ ve d- örneklerinde gözlemlenen mikrobiyal inaktivasyonlar arasındaki fark azlamıştır. Vişne suyuna inoküle edilen *S. cerevisiae* 350 MPa'da d+ ve d- örnekleri ile 300 MPa'da d+ örneklerinde tamamen inaktive edilirken (minimum 6.46 $\log_{10}$ KOB/mL azalma), 300 MPa'da d- örneğinde 5.92±0.24 $\log_{10}$ KOB/mL azalma kaydedilmiştir. Elde edilen veriler *S. boulardii*'nin basınca *S. cerevisiae*'den daha hassas olduğunu göstermiştir. Vişne suyunda 300 MPa'da 6 dk'lık işlem sonunda *S. boulardii* tamamen inaktive olurken, 250

MPa'da d+ ve d- örneklerinde sırasıyla 4.73±0.19 ve 2.94±0.11 $\log_{10}$ KOB/mL azalma kaydedilmiştir.

Yıl **:** 2023

Sayfa Sayısı **:** 60

Anahtar Kelimeler **:** Yüksek hidrostatik basınç, dondurma, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae,* vişne suyu.

Master Thesis

Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardii* Inoculated in Phosphate-Buffered Saline and Sour Cherry Juice By High Hydrostatic Pressure Combined with Freezing

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

ABSTRACT

In this study, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* were inoculated in phosphate buffered saline (PBS) at two different pH's (3.2 and 7.1) and cherry juice (pH 3.2) before they were subjected to high hydrostatic pressure (HHP). The temperature for HHP was kept constant at 4 ℃, while the applied pressure and pressurization time changed in the range of 150-450 MPa and 3-9 min, respectively. Half of the samples, which were prepared by inoculating with microorganism cultures were kept at 4 ℃, while the other half were kept at -20 ℃ for overnight before they were pressurized. Microbial inactivation was higher in samples that were frozen before pressurization (d+) compared to samples that were pressurized without freezing (d-). After a 6 min treatment at low pressures (150-250 MPa), the microbial reduction in d+ samples was significantly higher compared to d- samples, while the difference in microbial inactivation between d+ and d- samples at higher pressures (300-350 MPa) was supressed. While *S. cerevisiae* inoculated into sour cherry juice was completely inactivated in d+ and d- samples at 350 MPa and in d+ samples at 300 MPa (minimum 6.46 $\log_{10}$CFU/mL reduction), 5.32±0.24 $\log_{10}$CFU/mL decrease was recorded in d- sample at 300 MPa. The data obtained showed that *S. boulardii* was more sensitive to pressure than *S. cerevisiae*. *S. boulardii* was completely inactivated after a 6 min treatment at 300 MPa in sour cherry juice, while a decrease of 4.73±0.19 and 2.94 ±0.11 $\log_{10}$CFU/mL was recorded at 250 MPa in d+ and d- samples, respectively.

Year **:**2023

Number of Pages **:** 60

Keywords **:** high hydrostatic pressure, freezing, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae,* sour cherry juice

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında değerli görüşleriyle beni yönlendiren, ilgisini hiç esirgemeyen, tecrübeleri ile her daim bana destek olan ve sabırlı bir şekilde bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sami BULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, her zaman yanımda olan sevgili annem Seyide İDRİSOĞLU, babam Vedat İDRİSOĞLU ve kardeşim Sezen İDRİSOĞLU'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

SİMGELER DİZİNİ xii

ŞEKİLLER DİZİNİ xv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvii

1 GİRİŞ 1

2 GENEL BİLGİLER 5

2.1 *Saccharomyces cerevisia*e 5

2.2 *Saccharomyces boulardii* 6

2.3 Yüksek Hidrostatik Basınç Teknolojisi 7

2.4 Yüksek Basınç Teknolojisi Düzeneği 7

2.5 Yüksek Hidrostatik Basınç Teknolojisinin Ticari Olarak Kullanımı 9

2.6 YHB'ın mikrobiyal hücreler üzerine etkisi 10

2.7 Düşük Sıcaklıklarda YHB'ın mikrobiyal hücreler üzerine etkisi 13
2.8 Düşük pH'ın Hücrelerin Basınç Hassasiyetine Etkisi 14
3 MATERYAL VE METOT 15
3.1 Test mikroorganizmaları 15
3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* 15
3.1.2 *Saccharomyces boulardi*i 15
3.2 Besiyeri ve kimyasallar 15
3.3 Tampon Çözeltilerin (PBS) hazırlanması 16
3.4 Maya hücrelerinin geliştirilmesi 16
3.5 Örneklerin hazırlanması 16
3.6 pH tayini 17
3.7 Yüksek hidrostatik basınç işlemi 17
3.8 Mikrobiyolojik analizler 18
3.9 İstatistiksel Analiz 18
BÖLÜM 4 20
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 20
4.1 PBS çözeltisinde inoküle edilmiş mayaların YHB ile inaktivasyonu 20
4.1.1 Tepki yüzeyi tasarımı ile yapılan çalışmalar 20
4.1.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan tepki yüzeyi denemeleri 20

4.1.2 Faktöriyel deneme deseni ile yapılan çalışmalar 22

4.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan denemeler 22

4.1.2.1 *Saccharomyces boulardii* ile yapılan denemeler 27

4.2 Vişne suyuna inoküle edilmiş mayaların YHB ile inaktivasyonu..... 30

4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan denemeler 30

4.2.1 *Saccharomyces boulardii* ile yapılan denemeler..... 33

BÖLÜM 5..... 34

5 SONUÇ ve TARTIŞMA..... 34

6 KAYNAKLAR 37

ÖZGEÇMİŞ 42

TEZ SIRASINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN BİLİMSEL FAALİYETLER..... 43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
a_w	Su Aktivitesi Değeri
atm	Atmosfer basıncı
dk	Dakika
g	Gram
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Mono Potasyum Fosfat
KOB	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre

MPa	Megapaskal
Na_2HPO_4	Disodyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
P	Basınç
s	Saniye
spp	Species Pulural (Bir Cinse Ait Tüm Türler)
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
d+	Donmuş
d-	Donmamış
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
HHP	High Hydrostatic Pressure (Yüksek hidrostatik basınç)
PBS	Phosphate-buffered saline (Fosfat tamponu)
PCA	Plate count agar
pH	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
rpm	Revolutions Per Minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez

UHT	Ultra High Temperature (Ultra Yüksek Sıcaklık)
YHB	Yüksek hidrostatik basınç
TSB	Tryptic Soy Broth

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yüksek basınçlı işlemenin şeması 8

Şekil 2.2 Deneylerde kullanılan YHB cihazı 8

Şekil 2.3 Çilek, elma ve yaban mersini reçelleri dünyanın ilk ticari YHB ile işlenmiş gıdalar..... 10

Şekil 2.4 *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri 12

Şekil 2.5 Suyun basınç altında faz diyagramı 13

Şekil 4.1 PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan örneklerin yüksek hidrostatik basınç işlemi sonrası *S. cerevisiae* sayısındaki azalma ile basınç düzeyi ve basınçlama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren tepki yüzeyi 22

Şekil 4.2 PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. 24

Şekil 4.3. PBS (pH 3.2) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar 26

Şekil 4.4. PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar 28

Şekil 4.5. PBS (pH 3.2) çözeltisine inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar 29

Şekil 4.6. Vişne suyuna (pH 3.2) inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. 31

Şekil 4.7. *S. cerevisiae* ile PBS 7.1, PBS 3.2 ve vişne suyunda hazırlanan dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar 32

Şekil 4.8. *S. cerevisiae* ile PBS 7.1, PBS 3.2 ve vişne suyunda hazırlanan dondurulmuş (d+) örneklerin farklı basınçlarda basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar 32

Şekil 4.9. Vişne suyuna (pH 3.2) inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* arasındaki farklar..... 6

Çizelge 4.1. PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan d-örneklerin YHB işlemine tabi tutulması için kullanılan deneme deseni ve basınçlama sonrasında *S. cerevisiae* sayısındaki azalmalar..... 21

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Son yılarda tüketicilerin sağlıklı beslenme alışkanlıkları konusunda bilgilenmesiyle birlikte kimyasal katkı maddeleri içermeyen, minimal işlenmiş doğal ve sağlıklı gıdalara talebin attığı gözlemlenmektedir (Gopal, Kalla, ve Srikanth, 2017). Bu durum mevcut teknolojilerin iyileştirilmesi çalışmalarına ivme kazandırmış ve sürdürülebilir yenilikçi teknolojilerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Goyette, Vigneault, Charles ve Raghavan, 2012). Bu bağlamda ısıl olmayan gıda işleme yöntemlerine olan ilgi son on yıllarda hızla artmaktadır. Yüksek hidrostatik basınç (YHB) bu yöntemlerden biridir (Günel, 2014). YHB'ın gıda bileşenleri ve mikroorganizmalar üzerine olan etkileri çokça çalışılmış ve bu teknoloji ile düşük sıcaklıklarda ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda gıdaların pastörize edilebileceğinin anlaşılmasıyla da bu alandaki araştırmalar hızla artmıştır (Indrawati, Ludikhuyze, Van Loey ve Hendrickx, 2000).

Yenilikçi ve çevreci teknolojilerden birisi olan YHB işlemi ile gıdalar ısıl işleme gerek kalmadan düşük sıcaklıklarda pastörize edilmesine (soğuk pastörizasyon) imkân tanıyan bir teknoloji olup ticari olarak kullanımı dünyada her geçen gün artmakta olan bir işleme yöntemidir. Bu teknoloji ile herhangi bir koruyucu katkı kullanımına gerek kalmaksızın gıdaların raf ömrü artırılırken besin değerleri doğala yakın bir düzeyde korunabilmektedir.

Geleneksel yöntemlerle gıdaların raf ömrünü artırmak amacıyla kullanılan ısıl işlemler (pastörizasyon, sterilizasyon) gıdalarda bulunan vitaminler, antioksidanlar, uçucu aromatik bileşenler gibi gıdaların önemli kalite parametrelerini olumsuz yönde etkilemekte ve gıdaların besin değerlerinde kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca, ısıl işlem görmüş gıdalarda pişmiş tat oluşmakta ve renk değişimleri meydana gelmektedir. Bu nedenle son yıllarda ısıl olmayan işleme yöntemleri ile gıdaların raf ömrünün artırılmasına çalışılmaktadır.

Meyve sularının soğuk pastörizasyonunda başarı ile kullanılan YHB, ticari olarak genellikle oda sıcaklıklarında uygulanmaktadır. Bu amaçla meyve suları yaklaşık 1-5 dakika süre ile 400-600 MPa basınç uygulaması ile pastörize edilmektedir. Bu şekilde pastörize edilen meyve suları doğal özelliklerini korumakta, pişmiş tat oluşmamakta, besin değerinde meydana gelen kayıplar minimize edilebilmekte ve koruyucu kullanılmadan gıdaların raf ömrü uzatılabilmektedir.

YHB teknolojisi ile güvenli ve yüksek kalitede gıda ürünlerinin üretilmesi için çok sayıda bilimsel araştırma yapılmaktadır. YHB teknolojisi ile patojen mikroorganizmaların ve parazitlerin inaktive edilebileceğinin anlaşılması ve ticari boyutta pastörizasyon yapan cihazların üretilmesiyle birlikte, bu teknoloji bazı Avrupa ülkelerinde, Amerika ve Japonya'da et ürünleri, meyve suları, reçel ve marmelatlar, deniz ürünleri, avokado gibi çeşitli gıda ürünlerinin pastörizasyonu için kullanılmaya başlanmıştır (Hugas, Garriga, ve Monfort, 2002.). Ülkemizde ise bu teknoloji ticari olarak henüz kullanılmamaktadır.

İlk yatırım maliyetleri yüksek olmakla birlikte, son zamanlarda yüksek kapasiteli ve sıvı ürünler için yarı sürekli (semi-continuous) sistemlerin üretilmesiyle birim ürün başına düşen maliyetler azalmaya başlamıştır. Bu teknoloji ile ısıtma ve soğutma işlemi olmadığından işlem süresi kısalmakta ve işlemin çevreye verdiği zarar minimum olmaktadır. Bu teknolojinin diğer bir avantajı ise, genellikle ürünler paketledikten sonra pastörize edildiğinden dolayı işlem sırasında ve sonrasında meydana gelebilecek bulaşılar da önlenmiş olmaktadır.

YHB'ın en önemli avantajı gıdaya ısıl işlem uygulamadan düşük sıcaklıklarda pastörizasyon yapılmasını sağlamaktır. Örneğin, YHB ile pastörize edilmiş bir meyve

suyu yüksek sıcaklıklara maruz kalmadığından, bileşimindeki uçucu yağlar gibi aromatik lezzet bileşenleri ve vitaminler korunmakta, pişmiş tat oluşmadığı için de taze sıkılmış meyve suyuna çok yakın bir ürün elde edilebilmektedir.

YHB ile mikroorganizmaların inaktivasyon mekanizması çok sayıda çalışma ile açıklanmaya çalışılmıştır. En çok kabul gören yaklaşımlar arasında hücre membranı ve/veya hücre duvarının basınçtan zarar görmesi gelmektedir (Ananta, Heinz, ve Knorr, 2004; Ananta ve Knorr, 2009; Ritz, Tholozan, Federighi, ve Pilet, 2002). Bunun yanında basınç altında hücre membranının esnekliğini ve akıcılığını (fluidity) kaybetmesi ve hücre membranına bağlı enzimlerin fonksiyonlarını yitirmesi (Kato ve Hayashi, 1999), membran proteinlerinin denatürasyonu, membran lipidlerinde meydana gelen faz değişimleri (Pilavtepe-Celik, Balaban, Alpas, ve Yousef, 2008) gibi birçok faktör de mikrobiyal inaktivasyona neden olan faktörler arasında sayılabilir. YHB ile bakterilerin inaktivasyonu aynı zamanda bakterilerin çeşidine ve suşuna, ortamın su aktivitesine, kullanılan basınç, süre ve sıcaklığa bağlı olarak da değişmektedir (Bulut, 2014; Trujillo vd., 2002). Genel olarak Gram pozitif bakterilerin basınca Gram negatif bakterilerden daha dayanıklı olduğu kabul edilmekle birlikte (Mañas ve Pagán, 2005), bu her zaman geçerli değildir.

Yüksek asitli meyve sularının bozulmasının en önemli nedenlerinden biri maya ve küf gelişimidir. YHB ile maya ve küfler kolayca inaktive edilebildiğinden (Mañas ve Pagán, 2005), bu teknoloji meyve sularının raf ömrünün artırılmasında önemli bir avantaj sunmaktadır. Nitekim Avrupa, Amerika, Japonya ve Avustralya gibi ülkelerde bu teknolojinin en yaygın ve başarılı kullanım alanlarından birisi meyve sularının pastörizasyonudur. YHB uygulanmış birçok meyve suyu (portakal, elma, üzüm, havuç vd.) market raflarındaki yerlerini almıştır.

Gıdaların YHB ile pastörizasyonu konusunda yapılmış literatüre geçen sayısız çalışma bulunmaktadır. Gıdaların oda sıcaklıklarından daha düşük sıcaklıklarda pastörize edilmesi üzerine yapılan araştırmalar ise daha az sayıdadır. Düşük sıcaklıklarda yapılan YHB işleminin mikrobiyal inaktivasyonu artırdığı bilinmektedir. Normal koşullarda sıvı kristal yapı arz eden hücre membranının, düşük sıcaklıklarda esnekliğini kaybederek sert

(rigid) kristal yapıya dönüştüğü ve basınca daha hassas hale geldiği bildirilmiştir (Smelt, 1998; ter Steeg, Hellemons, ve Kok, 1999).

Dondurulmuş gıdaların basınçlanması ile gıdalarda bulunan mikroorganizmaların inaktivasyonu ve bazı kalite parametrelerinin incelendiği literatüre geçmiş az sayıda çalışma vardır. Dondurulmuş gıdaların orta düzeyde bir basınç (300 MPa) uygulamasıyla mikrobiyal inaktivasyonun önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Fosfat tamponu ve portakal suyu (Bulut ve Karatzas, 2021), süt (Bulut, 2014b), kıyma haline getirilmiş et (Bulut, 2014a) ve Nutrient Broth besiyerine (Su vd., 2014) inoküle edilmiş mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmalar, dondurulmuş gıdaların basınçlanması ile sinerjistik bir etkileşimin olabileceğini göstermiştir. Test organizması olarak bakterilerin kullanıldığı bu çalışmalar, özellikle sıvı gıdaların basınçlanmadan önce dondurulması durumunda mikrobiyal inaktivasyonun önemli ölçüde attığını ve yeterli bir steriliteye (5 $\log_{10}$ ve daha fazla mikrobiyal inaktivasyon) ulaşmak için daha düşük basınçların yeterli olabileceğini göstermiştir.

Gıdaların dondurulduktan sonra basınçlanması gibi yaklaşımlarla pastörizasyon için kullanılması gereken basınç şiddetinin azaltılmasının, YHB ekipmanlarının ilk yatırım ve işletme maliyetlerinin düşmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir. Yukarıda açıklandığı üzere, bakterilerin test organizması olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda bu yönde bulgular elde edilmiş olmakla beraber, YHB'ın sıfır altı sıcaklıklarda (dondurulmuş gıdalarda) mayalar üzerindeki etkisini araştıran bilgimiz dâhilinde bir yayın bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile fosfat tamponu (PBS) ve vişne suyuna inoküle edilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii* test organizmaları ile çalışılarak dondurma işlemi ile birlikte uygulanan YHB işleminin maya hücrelerin inaktivasyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulguların, meyve sularının bozulmasını engellemek için inaktive edilmesi gereken *S. cerevisiae ve S. boulardii* gibi mayaların dondurularak basınçlama koşullarının belirlenmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, probiyotik bir mikroorganizma olarak farklı ürün gruplarında bulunması avantaj teşkil edebilecek *S. boulardii*'nin, gerek normal koşullarda (oda sıcaklığında), gerekse dondurulmuş ortamlarda basınca dayanımı ile ilgili elde edilen verilerin, bu mikroorganizmayı içeren gıdaların YHB ile pastörizasyonunun optimize edilmesine katkı sunacağı öngörülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Saccharomyces cerevisiae

Taksonomik olarak maya, genellikle tomurcuklanarak bölünen tek hücreli ökaryotik bir mikroorganizma olarak tanımlanır. Gıda endüstrisinde biyoteknolojik öneme sahip *S. cerevisiae* insanlar tarafından yüzyıllardır kullanmıştır (Mortimer, 2000). Ekmek mayası ya da bira mayası olarak da bilenen *S. cerevisiae,* 5–10 μm çapında küresel bir şekle sahiptir. Hücre; hücre duvarı, stoplazmik zar, sitoplazma, organeller ve çekirdek içerir. Hücre duvarı, hücreyi ozmotik basınca karşı koruma, seçici geçirgen yapısı sayesinde moleküllerin hücreye girişini kontrol etme ve hücreye şeklini verme gibi çeşitli işlevleri sağlayan çok işlevli, beta–glukan ve mannan polisakkaritlerinden oluşan bir organeldir (Katırcıoğlu ve Aksöz, 2003).

Meyve suları, meyvelerin yüzeyinde bulunan mikroflorayı içerir. Aside toleranslı bakteriler, küfler ve mayalar gibi birçok mikroorganizma, meyveyi bir substrat olarak kullanırlar (Tournas, Heeres, ve Burgess, 2006). *S. cerevisia'*da doğal olarak meyve yüzeylerinde bulunan mikroorganizmalardandır (Kocaadam ve Tek, 2016). Bu nedenle *S. cerevisia* meyve sularının bozulmasına neden olan önemli mikroorganizmalardan biridir.

Gıdaların mikrobiyal bozulmasını etkileyen kritik faktörlerin başında pH ve su aktivitesi gelmektedir. Meyve ve meyve sularının pH'sı genellikle düşük olduğundan bakteriyel bozulmadan ziyade, mayalar ve küfler tarafından başlatılan mikrobiyal bozulmalara daha sık rastlanmaktadır. Meyve suları, mikrobiyal büyüme için önemli bir bariyer görevi gören asidik pH'a (<4.5) sahiptir. Ancak mayalar gibi aside dayanıklı mikroorganizmalar meyve sularının asidik ortamında gelişebilir. Başta maya ve küfler olmak üzere, mikrobiyal bozulma ile meyve sularında bulanıklık kaybı, kötü tatların gelişimi, karbon dioksit ve alkol üretimi, renk değişimi, doku ve kıvamda değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bozulmaya neden olan en yaygın mayalar arasında *Saccharomyces* suşları bulunur (Aneja, Dhiman, Aggarwal, Kumar, ve Kaur, 2014a).

2.2 Saccharomyces boulardii

Güneydoğu Asya'daki meyvelerden izole edilen bir maya olan *S. boulardii*, başlangıçta ayrı bir *Saccharomyces* türü olarak sınıflandırılmış olsa da son yayınlar *S. boulardii'*nin genomunun *S. cerevisiae* genomuna yakınlığından dolayı ikisinin de türdeş olarak sınıflandırılabileceği bildirilmiştir. *S. boulardii*, diğer *S. cerevisiae* suşlarına kıyasla probiyotik bir organizmadır**.** Genetik olarak *S. cerevisiae* ile çok benzer olmalarına rağmen aralarında bazı metabolik farklılıklar mevcuttur. *S. cerevisiae*, *S. boulardii*'den farklı olarak, spor üretmekte ve galaktozu kullanabilmektedir. Buna karşın *S. boulardii* daha düşük pH seviyelerine *S. cerevisiae*'ye kıyasla daha dayanıklıdır (Edwards-Ingram vd., 2007). *S. cerevisiae ve S. boulardii* arasındaki farklar Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* arasındaki farklar (Łukaszewicz, 2012).

Saccharomyces cerevisiae	***Saccharomyces boulardii***
Daha düşük optimal büyüme sıcaklığı (~30 °C)	Daha yüksek optimal büyüme sıcaklığı (~37 °C)
Düşük pH'a karşı daha düşük direnç	Düşük pH'a karşı daha yüksek direnç
Galaktoz kullanır	Galaktoz kullanmaz
Spor oluşturur	**S**por oluşturmaz

2.3 Yüksek Hidrostatik Basınç Teknolojisi

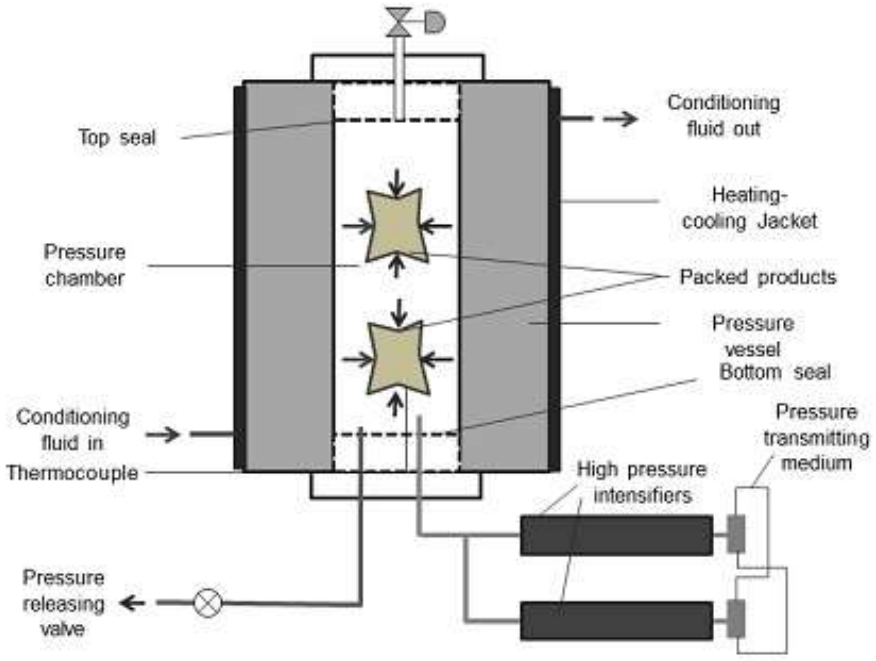
Termal işlemler gıdaların bileşiminde bulunan vitamin, antioksidan, uçucu aromatik bileşenler ve renk maddeleri gibi ısıya duyarlı bileşenlerini olumsuz yönde etkilemektedir. YHB, ısıl işlemin gıdalar üzerindeki bu istenmeyen etkilerini azaltan, ısıl olmayan bir gıda işleme tekniğidir (Günel, 2014).

1990'lı yıllardan sonra YHB'ın gıda bileşenleri ve mikroorganizmalar üzerine olan etkileri çokça çalışılmış ve bu teknoloji ile düşük sıcaklıklarda ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda gıdaların pastörize (soğuk pastörizasyon) edilebileceği anlaşılmış ve endüstriyel uygulamaları başlamıştır. Bilinçli tüketicilerin doğal ve minimal işlenmiş gıdalara yönelmesiyle, YHB gibi termal olmayan gıda işleme yöntemlerine olan ilgi de son yıllarda hızla artmaktadır. YHB uygulaması ile gıda kaynaklı vejetatif patojenleri inaktive etmek için endüstride genellikle 600 MPa uygulanmaktadır (Trujillo vd., 2000; Daryaei vd., 2008). Bu denli yüksek basınçları kullanarak gıdaları pastörize edebilecek ekipmanların üretimi özel malzemeler ve üretim teknolojisi gerektirdiğinden YHB ekipmanlarının ilk yatırım maliyetleri yüksek olmaktadır (Özcan ve Obuz, 2006).

2.4 Yüksek Basınç Teknolojisi Düzeneği

YHB, sıvı veya katı gıda maddelerinin işlenmesi için kullanılan nispeten basit bir işlemdir ve birkaç adımdan oluşur. İşleme başlamadan önce, gıda ürünü uygun esnek ambalajlara (plastik şişeler, poşetler ve vakumlu ambalajlar gibi) paketlenir. İlk adımda, paketlenmiş ürünler, basınç ileten sıvıya (endüstri ortamında genellikle su olan, ancak bazı işlemler için daha uygun diğer bazı sıvılar olabilir) daldırılan sepete yerleştirilir. Önceden ayarlanmış parametrelere dayalı olarak basınçlanır. Sonrasında ürünler kaptan alınır (Karlović, Bosiljkov, Ježek, Nutrizio ve Jambrak, 2021).

Şekil 2.1'de bir YHB düzeneğinin şeması, Şekil 2.2'de bu tez çalışmasında kullanılan laboratuvar tipi YHB cihazı görülmektedir.



Şekil 2.1 Bir YHB cihazının şeması (Chakraborty ve Rao, 2015)



Şekil 2.2 Deneylerde kullanılan YHB cihazı.

2.5 Yüksek Hidrostatik Basınç Teknolojisinin Ticari Olarak Kullanımı

YHB gıdanın doğal özelliklerini olumsuz yönde etkilemeden zararlı mikroorganizmaları etkisiz hale getirebilir ve böylece genel gıda kalitesi korunur. Bu teknoloji Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve ABD Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından onaylanmıştır ve bir gıda muhafaza yöntemi olarak kabul edilmektedir (Barbosa-Cánovas, ve Juliano, 2008). Gıda kaynaklı vejetatif patojenleri inaktive etmek için yapılan çalışmalarda genellikle 300-600 MPa arasında basınçlar kullanılmakla birlikte (Trujillo vd., 2000; Daryaei vd., 2008), ticari uygulamalarda genellikle 600-650 MPa basınç birkaç dakika süreyle uygulanmaktadır. Gıdaların pastörizasyonu için gerekli olan basıncın çok yüksek olması nedeniyle, bu basınçlarda çalışabilen ekipmanlar özel olarak üretilmekte ve ilk yatırım maliyetleri yüksek olmaktadır (Özcan vd., 2006). Termal muhafaza teknolojileriyle karşılaştırıldığında, YHB nispeten pahalı bir teknolojidir. Bu nedenle, fayda-maliyet açısından bakıldığında, ısıdan zarar görebilecek olan fonksiyonel ve besleyici içerikleriyle ön plana çıkan gıdaların pastörize edilmesinde kullanımı verimli olmaktadır (Aganovic vd., 2021).

Ticari olarak kullanılan basınçlarda (600-650 MPa) bakteri sporları inaktive edilemediğinden, elde edilen ürünler steril olmamaktadır. Basınç ile sıcaklığın kombine edildiği spor inaktivasyonunu hedef alan basınç yardımıyla ısıl sterilizasyon uygulamaları bulunmakla birlikte bu çalışmalar araştırma aşamasında olup henüz ticari uygulamaları bulunmamaktadır.

Ticari bir YHB işleminden sonra inaktive olmayan sporların çimlenerek gıda güvenliği sorununa yol açmaması için genellikle pH'sı 4.5'in altında olan gıdalar bu YHB ile işlenmektedir. YHB ile pastörize edilen gıdaların özelliklerine ve belirlenen raf ömrüne bağlı olarak ürünler genellikle soğukta muhafaza ile kombine edilmektedir.

Mayalar genellikle gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkili olmamakla birlikte, özellikle asidik gıdalarda önemli bozulma etmenidirler. Meyve suyu gibi yüksek asitli gıdalarda önemli bir bozulma etmeni olan mayaların basınca nispeten duyarlı olmaları, YHB'ın

meyve sularının raf ömrünü uzatmak için başarılı bir şekilde kullanılmasına imkân tanımaktadır (Patterson, 2005, Manas ve Pagan, 2005).

YHB ile daha kaliteli ve lezzetli, mikrobiyolojik olarak güvenli gıda ürünleri üretilmesi ile YHB yıllar geçtikçe popülerlik kazanmıştır. Basınçla işlenmiş taze meyve suları Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avustralya, Avrupa ve Hindistan, Tayvan, Güney Kore ve Japonya gibi Doğu Asya ülkelerindeki ticari pazarlarda mevcuttur. 2016 yılında YHB gıda pazarı 11,03 milyar ABD doları, YHB ekipman pazarı 0,47 milyar ABD doları değerinde olmuştur (Grumezescu ve Holban, 2018).

Dünyada ilk ticari HHP ile işlenmiş gıdalar, 1990 yılında Japonya'da meyve reçelleri (Şekil 2.3) gibi meyve ürünleridir (Yamamoto, 2017).



Şekil 2.3 Çilek, elma ve yaban mersini reçelleri dünyanın ilk ticari YHB ile işlenmiş gıdaları (Yamamoto, 2017).

2.6 YHB'ın mikrobiyal hücreler üzerine etkisi

YHB ile mikroorganizmaların inaktivasyon mekanizması çok sayıda çalışma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Hücre membranının basınçtan zarar görmesi mikrobiyal inaktivasyonun en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Ananta vd.,

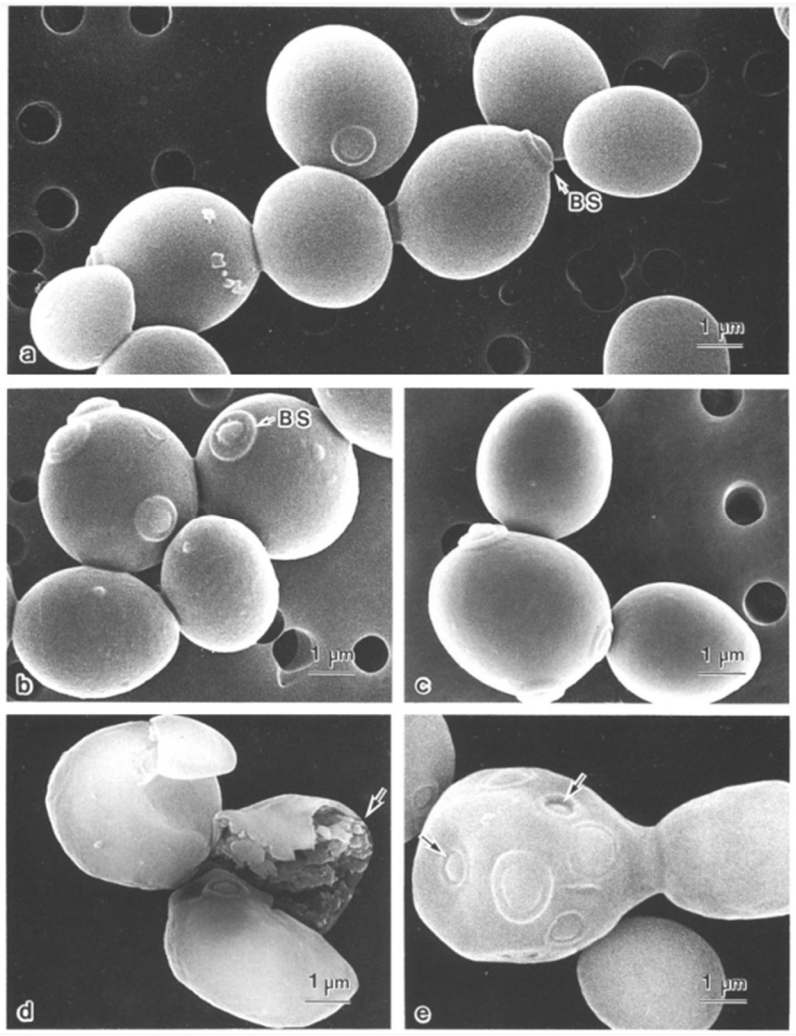
2004; Ananta ve Knorr, 2009; Ritz vd., 2002; Wang vd., 2013). Basınç altında hücre membranının esnekliğini ve akıcılığını (fluidity) kaybetmesi ve hücre membranına bağlı enzimlerin fonksiyonlarını yitirmesi (Kato ve Hayashi, 1999), membran proteinlerinin denatürasyonu, membran lipidlerinde meydana gelen faz değişimleri (Pilavtepe-Celik vd., 2008) gibi faktörlere de basınç nedeni ile mikrobiyal inaktivasyonu açıklamak için literatürde yer verilmiştir.

YHB ile mikroorganizmaların inaktivasyonu, mikroorganizmanın tür ve suşuna ve hangi büyüme evresinde olduğuna bağlıdır. Mayalar ve vejetatif küflerin genel olarak basınca nispeten duyarlı, askosporların ise daha dirençli olduğu bilinmektedir (Buzrul, 2014). Mikroorganizmaya ait bu faktörlerin yanında, mikroorganizmanın içerisinde bulunduğu ortamın özellikleri de basınç altında mikrobiyal inaktivasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Mikroorganizmanın içerisinde bulunduğu gıdanın pH ve su aktivitesi, ortamda lizozim gibi bakteriyosin ve antimikrobiyal maddelerin bulunup bulunmadığı, kullanılan basınç, süre ve sıcaklık da mikrobiyal inaktivasyonu etkileyen önemli faktörler arasındadır (Alpas vd., 2000; Bulut, 2014; Trujillo vd., 2002). Genel olarak Gram pozitif bakterilerin basınca Gram negatif bakterilerden daha dayanıklı olduğu kabul edilmektedir (Mañas ve Pagán, 2005).

Hamada vd., (1992) tarafından yapılan bir çalışmada YHB'ın *S. cerevisiae* hücrelerinde DNA replikasyonuna etki ettiği bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada 100 MPa üzerindeki basınçlarda mayaların membranının etkilendiği ve 400-600 MPa basınçlarda mitokondri ve sitoplazmada hasarların ortaya çıktığı bildirilmiştir (Hamada, Nakatomi ve Shimada, 1992).

Shimada vd., (1993), YHB'ın *S. cerevisiae* hücrelerinin morfolojisi üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda, su veya 0.1 M fosfat tamponu içerisindeki *S. cerevisiae* süspansiyonuna 25℃'de 10 dk süreyle uygulanan 300 MPa basınca kadar hücrenin dış şeklinin neredeyse etkilenmediği (Şekil 2.4; lb ve lc) ve basınç uygulanmayan kontrol örnekleri (Şekil 2.4;1a) ile aynı olduğu, ancak 500 MPa'dan yüksek basınçlarda hücre yapısında bozulmaların oluştuğu (Şekil 2.4; lb, lc ve ld) SEM görüntülerinden tespit edilmiştir. Bununla beraber aynı çalışmada kullanılan TEM ile elde edilen görüntülerden, YHB ile muamele edilen hücrelerin iç yapısının 100 MPa'da bile bozulmaya başladığını

ve özellikle nükleer membranın bütünlüğünü bozan hasarların dikkat çekici olduğu gösterilmiştir.

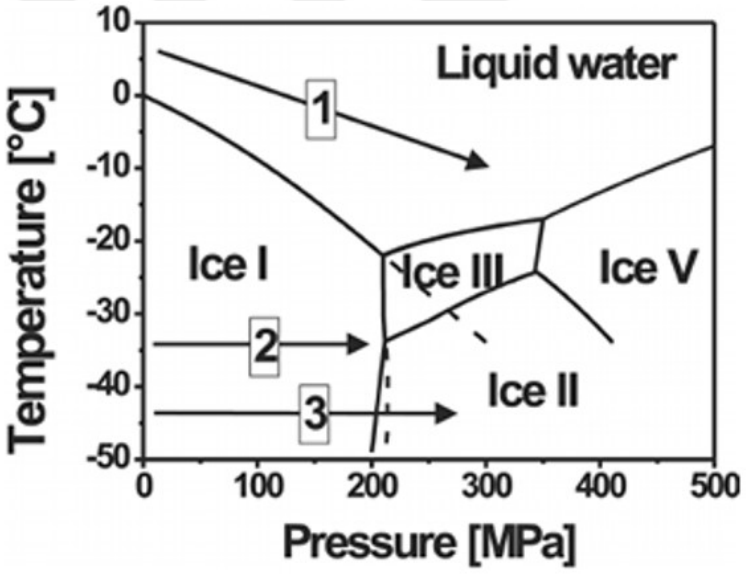


Şekil 2.4 *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri: (a) YHB uygulanmamış, 100 MPa (b), 300 MPa (c), 500 MPa (d) ve 600 MPa (e)'de hidrostatik basınçlarla 25°C'de 10 dk uygulanmıştır. Ok ile BS (Bud scar) gösterilmiştir (Shimada vd, 1993).

2.7 Düşük Sıcaklıklarda YHB'ın mikrobiyal hücreler üzerine etkisi

Gıdaların oda sıcaklıklarından daha düşük sıcaklıklarda pastörize edilmesi üzerine yapılan araştırmalar, düşük sıcaklıklarda yapılan YHB işleminin mikrobiyal inaktivasyonu artırdığını göstermiştir. Normal koşullarda sıvı kristal yapı arz eden hücre membranının, düşük sıcaklıklarda esnekliğini kaybederek sert (rigid) kristal yapıya dönüştüğü ve basınca daha hassas hale geldiği bildirilmiştir (Smelt, 1998; ter Steeg vd., 1999).

Gıdaların yüksek basınç-düşük sıcaklıkta işlenmesinin, hücre zarlarına etkisi, renk, dokusunun ve görsel görünümün üzerine yapılan çalışmalarda değişik parametrelerde farklı etkiler gözlemlenmiştir. Bu durumun basınç altında buz fazları arasında (Buz I, II, III, IV) gerçekleşen geçişlerden kaynaklandığı belirtilmiştir (Luscher vd., 2004).



Şekil 2.5 Suyun basınç altında faz diyagramı (Luscher vd., 2004).

Faz değişikliği sonucunda hücre zarının esnekliğini kaybedip daha kolay parçalanabilir hale geldiği bildirilmiştir (Molina-García vd., 2004). Donma sırasında oluşan kristallerin hücre zarına zarar vermesi nedeniyle dokuda veya hücre zarında

hasarlar meydana gelmekte ve bunlara ek olarak normalde esnek olan hücre zarı, düşük sıcaklıklarda esnekliğini kaybederek sert bir yapıya dönüşürek basınca daha hassas hale gelmektedir (Briones-Labarca vd., 2011).

2.8 Düşük pH'ın Hücrelerin Basınç Hassasiyetine Etkisi

Mikroorganizmaların metabolizmaları pH, sıcaklık, tuzluluk ve ortamdaki besin mevcudiyeti gibi çok çeşitli çevresel değişkenler tarafından kontrol edilmektedir. Mikroorganizmaların bulundukları ortamın pH'ı, mikroorganizma üzerinde rol oynayan en önemli faktörlerdin başında gelmektedir. Mikroorganizmanın geliştiği optimum bir pH aralığı vardır. Bu pH aralıklarında mikroorganizmalar maksimum hızla büyüme göstermektedir. Mikroorganizmaların çoğunluğu pH 5-9 aralığında en iyi şekilde gelişim gösterdiği bilinmektedir (Jin ve Kirk, 2018).

pH, mikrobiyal metabolizmaları farklı şekillerde etkiler. Mikrobiyal büyüme ve hayatta kalma ile ilgili çevresel koşulları etkileyen pH, redoks reaksiyonlarında, mineral çözünmesinde ve çökelmesinde, yüzey kompleksleşmesinde ve diğer biyokimyasal reaksiyonlarda kilit bir oyuncu olan protonların kimyasal aktivitesini belirler. Bazı mikroorganizmaların, sıcaklık, pH veya su aktivitesinde bir azalmadan sonra veya zayıf asit koruyucuların varlığında hücre zarı yağ asidi kompozisyonlarını değiştirebileceği ve bunun sonucunda membran akışkanlığının değişeceği bildirilmiştir(Russell vd., 1995). Hücrenin membranın akışkanlığını kaybetmesi ve azalması durumda hücre yüksek basıncın yarattığı strese karşı daha duyarlı hale gelmektedir (Briones-Labarca vd., 2011).

Alpas vd., (2000) yaptıkları çalışmada sitrik veya laktik asit varlığında basınçlandırma, her iki organik asit işlemi için pH 6.5'ten 4.5'e düştükçe tüm bakteri suşlarının öldürücülüğü arttırdığını tespit etmiştir. Sitrik veya laktik asit varlığında 345 MPa'da her iki asit için pH 4.5'te ek 1.2–3.9 $\log_{10}$ canlılık kaybı gözlemlenmiştir. Düşük pH'ın basınç, zaman ve sıcaklık ile birlikte uygulanması hasarlı hücrelerin sayısının artmasına neden olmuştur. *S. aureus* suşları ve *E. coli* O157:H7 933 hariç, hem sitrik hem de laktik asit çözeltilerinde pH 6.5'te bile tüm suşlar için %100'lük bir yaralanma tespit edilmiştir. Basınç, sıcaklık ve laktik asit ilavesinin aynı anda uygulanmasıyla yaralı hücre yüzdesinin test edilen tüm suşlarda yükseldiği raporlanmıştır (Alpas vd., 2000).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1 Test mikroorganizmaları

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Denemelerde ticari olarak Dr. Oetker markasıyla satılan ve içeriği *S. cerevisiae* olarak bildirilen bir ekmek mayası (%80 kuru madde) lokal bir marketten temin edilmiştir.

3.1.2 *Saccharomyces boulardii*

S. boulardii suşu liyofilize granüller halinde bir eczaneden temin edilmiştir (Reflor marka, CNCM 1-745-BIOCODEX/Fransa).

3.2 Besiyeri ve kimyasallar

S. cerevisiae ve *S. boulardii* hücrelerinin logaritmik faza geçişinde kullanılan Tryptic Soy Broth (TSB, Merck), mikrobiyal sayımlar için Plate Count Agar, (PCA, Merck), besiyerleri kullanılmıştır. Kullanılan Besiyerleri üretici firmaların direktiflerine göre hazırlanmıştır.

3.3 Tampon Çözeltilerin (PBS) hazırlanması

PBS çözeltisi hazırlamak amacıyla (1L); 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1.44 g Na_2HPO_4, 245mg KH_2PO_4 kullanılmış ve distile su ile 1L'ye tamamlanmış ve pH metre ile pH'nın 7.1 olduğu kontrol edildikten sonra deneylerde kullanılmıştır.

PBS çözeltisinin pH'ını 3.2'ye ayarlamak için derişik sitrik asit kullanılmıştır. Derişik sitrik asit, hazırlanan PBS çözeltisine eklenerek pH metre ile pH 3.2 ayarlanmıştır. Analizlerde kullanılan NaCl, KCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4 ve sitrik asit Merck firmasından temin edilmiştir.

3.4 Maya hücrelerinin geliştirilmesi

Maya kültürlerini canlandırmak için yaklaşık 0.5 g granül haldeki maya kültürleri bir erlende sterilize edilerek soğutulmuş 200 mL steril Tryptic soy broth (TSB, Merck) besiyerine inokule edilmiştir. İnokülasyondan sonra *S. boulardii* için 37 °C, *S. cerevisiae* için 35 °C sıcaklıkta bir gece (yaklaşık 18 saat) 120 rpm'e ayarlı çalkalamalı inkübatörde (Shin Saeng, Fine Tech, Kore) inkubasyona bırakılmıştır. Canlandırılmış bu kültürlerden 100 µL alınarak 200 mL Tryptic soy broth (TSB, Merck) besiyerine inokule edilmiştir. *S. boulardii* kültürü 37 °C'de yaklaşık 36 saat, *S. cerevisiae* ise 35 °C'de yaklaşık 18 saat çalkalamalı inkübatörde inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyona sonunda elde edilen kültürler santrifüjlenerek (8000 rpm, 10 dakika 4 °C) supernetant uzaklaştırılıp geri kalan kısmının üzerine steril fosfat tamponu (PBS, pH 7.1) eklenerek stok süspansiyonlar hazırlanmış ve kullanılacağı ana kadar buzdolabında (4 °C) muhafaza edilmiştir.

3.5 Örneklerin hazırlanması

Denemeler için model bir gıda olarak vişne suyu seçilmiş ve bu amaçla steril UHT vişne suyu bir marketten satın alınmıştır. Denemeler için ayrıca vişne suyunun pH'sına (pH 3.2), ve pH 7.1'e ayarlanmış fosfat tamponu (PBS) kullanılmıştır.

Örneklerin hazırlanması amacıyla daha önceden hazırlanan ve soğutucuda (+4 °C) bekletilen stok süspansiyonundan 10 mL kültür alınarak steril bir kapta bulunan100 mL vişne suyu veya uygun pH'a sahip PBS çözeltisine ilave edilerek karıştırılmıştır. Test edilmek üzere hazırlanan bu kültür örneklerinden yaklaşık 10 mL alınarak daha önceden

steril stomacher torbalarından bir ısıl yapıştırıcı (heat sealer) kullanılarak hazırlanmış küçük plastik torbalara ilave edilmiş ve hava kabarcıkları kalmayacak şekilde yine ısıl yapıştırıcı kullanılarak paketlenmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler uygun boyuttaki plastik filmlere (Poliamid / Polietilen, Saran Plastik Ltd., Düzce, Türkiye) konarak ikinci kez bir vakum paketleme makinası (model MV – 20 Lipovak Ltd. Gebze, Türkiye) kullanılarak paketlenmiştir.

Bu şekilde hazırlanan örneklerin yarısı -20 °C'de bir gece bekletilerek dondurulurken, diğer yarısı +4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir. Örnekler dondurulmadan önce mayaların dibe çökülmesini engellemek ve homojen donmasını sağlamak için paketler el ile iyice çalkalanmıştır.

Bu çalışmada dondurulmuş örnekler için d+ ve dondurulmamış örnekler için ise d- kısaltmaları kullanılmıştır.

3.6 pH tayini

Vişne suyu ve PBS çözeltilrinin pH'ı laboratuvarımızda bulunan Mettler-Toledo pH metresi ile ölçülmüştür.

3.7 Yüksek hidrostatik basınç işlemi

Basınçlama denemeleri için 50 mm iç çap ve 0.7 L çalışma hacminde bir basınçlama haznesine sahip olan yüksek basınç cihazı (model MSE-CIP-WB-5500, MSE Teknoloji Ltd., Gebze, Türkiye) kullanılmıştır. Sistemdeki basınç aktarımı %5, (v/v) oranında kesme sıvısı (Tess-San, İstanbul) katılmış saf su ile sağlanmıştır. Basınç çemberi ve içerisindeki sıvının sıcaklığı ise soğutucu sirkülatöre (model RE1050S, Lauda Dr. R. Wobser GmbH ve Co.KG., Almanya) bağlı, basınç kabını çevreleyen bobinler ile sağlanmıştır (Bulut, 2014).

Örnekler basınç çemberine yerleştirildikten sonra basınç istenilen seviyeye (150 MPa-450 MPa) yaklaşık olarak 6 MPa/s hızla yükseltilmiştir. İstenilen süre boyunca basınçlama işlemi uygulandıktan sonra basınç boşaltma vanası açılarak basınç aşamalı olarak düşürülmüştür. Basınçlama işlemi sırasında iç sıcaklık (4 ºC±4) basınç çemberi kapağında bulunan ısıl çift (thermocouple) aracılığıyla gözlemlenmiştir. (Sevinir, 2019)

3.8 Mikrobiyolojik analizler

Mikrobiyal sayımlar Potato Dextrose Agar (PDA) ve Plate Count Agar'a (PCA) kullanılarak paralel sayımlar yapılmış ve her iki besiyeri üzerinde yapılan sayımların paralellik arz ettiği anlaşılmıştır. Bu durum çalışmaların saf kültür ve steril ortamlar kullanılarak yapılması ile açıklanmış ve mikrobiyal sayımlara PCA kullanılarak devam edilmiştir.

Mikrobiyal sayımlar için steril PBS (pH 7.1) kullanılarak örneklerden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve damlatma yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla bir mikro pipet (Eppendorf) ile test örneklerinden 30 µL alınarak her dilüsyon için petri kabının ayrılan bölgesine damlatılmıştır (bir petri 4'e ayrılarak 4 farklı dilüsyon için kullanılmıştır).

Bu şekilde hazırlanan plakalar, *S. cerevisiae* için 30 °C'de 24-96 saat*; S. boulardii* için 35 °C'de yaklaşık 48-120 saat inkübasyona bırakılmıştır. İşlem görmemiş kontrol örnekleri daha erken sayılırken, basınçlanmış örneklerde koloni gelişimi yavaş olduğundan koloniler daha geç oluşmuştur. 5 gün boyunca her gün kontrol edilen plakalarda sayımlar yapılmış ve her bir örnek için elde edilen en yüksek sayımlar hesaplamalarda kullanılmıştır. Bu yaklaşımla basınçlanan örneklerde hasar gördükten sonra toparlanan hücrelerin de sayılması sağlanmıştır.

3.9 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Design Expert V10 Yazılımı (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA) yazılımı kullanılarak döndürülebilir merkezi kompozit (rotatable central composit) tasarımı kullanılmıştır. Oluşturulan bu tasarımlar ile yürütülen denemeler sonucunda elde edilen tepki değişkenleri (response variable) varyans analizine (ANOVA) tabi tutularak ve her bir bağımlı değişken için en iyi tepki yüzeyi modelinin (doğrusal, kuadratik veya iki faktör etkileşimi) belirlenmesi için sum of squares ve lack of fit testleri uygulanmıştır. Varyans analizi sonucuna göre, lack of fit F-Değerinin saf hata değerine (pure error) en yakın, coefficient of determination (R^2) değerinin ise en yüksek olduğu modeller tepki yüzeyini oluşturmak için seçilmiştir. İstatistiksel analizler için anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak seçilecek ve her değişkenin önemi F-testi ile değerlendirilmiştir.

Tepki yüzeyi kullanılmayan (faktöryel) denemelerde ortalama değerler ile birlikte standart sapmalar Microsoft Excel (Microsoft, USA) kullanılarak belirlenmiş ve grafiğe geçirilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 PBS çözeltisinde inoküle edilmiş mayaların YHB ile inaktivasyonu

4.1.1 Tepki yüzeyi tasarımı ile yapılan çalışmalar

4.1.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan tepki yüzeyi denemeleri

En uygun basınçlama koşullarının belirlenmesi amacıyla 4°C sabit sıcaklıkta (basınç sıvısının başlangıç sıcaklığı) farklı basınç (250-450 MPa) ve süre (3-9 dk) aralığında oluşturulan döndürülebilir merkezi kompozit deneme desenine göre denemeler yapılmıştır. Dondurulduktan sonra basınçlanan örneklerin mikrobiyal sayımları sonucunda 350 ve 450 MPa basınçlara 6 dk ve daha yüksek süre maruz kalan örneklerde gelişme gözlemlenememiş (min 6.1 $\log_{10}$ KOB/mL azalma) bu nedenle de istatistiksel olarak anlamlı bir tepki yüzeyi oluşturulamamıştır (model p değeri > 0.5).

Dondurulmamış örneklerle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile istatistiksel olarak anlamlı (model p değeri < 0.0001) quadratik bir tepki yüzeyi oluşturulabilmiştir. Bu örneklere ait deneme deseni Çizelge 4-1'de ve elde edilen veriler ait tepki yüzeyi de

Şekil **4.1**'de verilmiştir.

Çizelge 4-1. PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan d-örneklerin YHB işlemine tabi tutulması için kullanılan deneme deseni ve basınçlama sonrasında *S. cerevisiae* sayısındaki azalmalar. Sıcaklık 4 °C'de (basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı).

Std sıra	Randomize sıra	Basınç (MPa)	Süre (d)	Azalma (log_{10} KOB/mL)
5	1	350	6	3.53
3	2	250	9	1.53
1	3	250	3	0.84
7	4	350	6	2.81
2	5	450	3	3.53
4	6	450	9	4.32
6	7	350	6	3.61
8	8	209	6	0.84
9	9	491	6	4.01
11	10	350	10.2	3.61
13	11	350	6	3.49
14	12	350	6	3.37
12	13	350	6	3.57
10	14	350	1.8	2.34

Beklendiği üzere artan basınç ve basınçlama süresi ile *S. cerevisiae* sayısında gözlemlenen azalma düzeyi de artmıştır. Logaritmik azalma ile basınç ve süre etkileşimlerine bakıldığında; basınç ($p<0.0001$), süre ($p=0.0042$), basıncın karesi ($p=0.0015$) ve sürenin karesinin ($p=0.048$) istatistiksel olarak anlamlı model parametreleri olduğu belirlenmiştir.

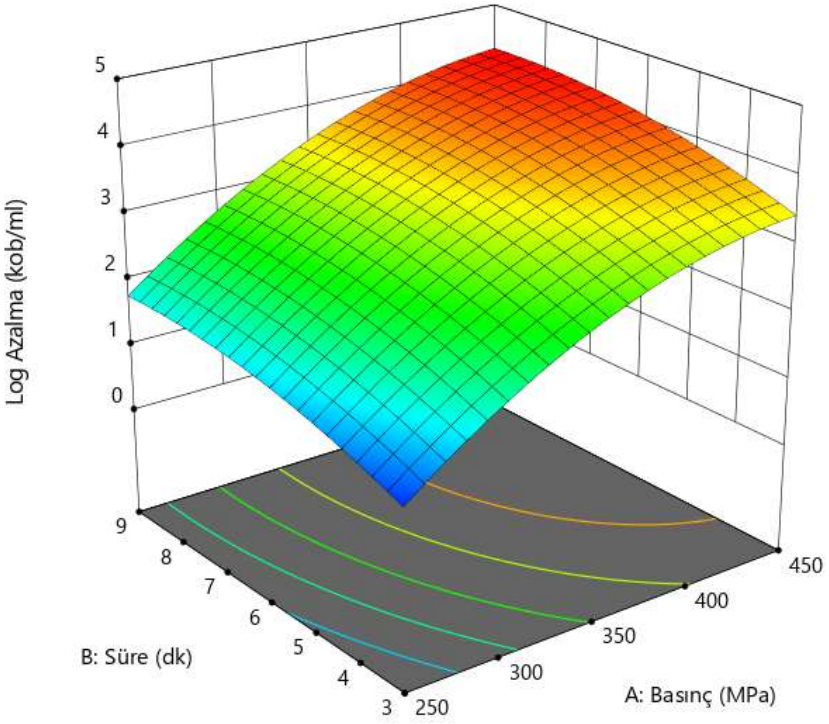
Tepki yüzeyine ait quadratik denklem aşağıda verilmiştir:

$$\textit{Logaritmik azalma}\ (\log_{10}\text{KOB/mL}) = -8.965 + 0.048P + 0.043t + 0.0001P{\cdot}t - 0.0001P^2 - 0.027t^2 \qquad \text{[Eq. 1]}$$

Denklemde, P: basınç (MPa) ve t: süreyi (dk) göstermektedir.

Seçilen basınç ve süre aralıklarında yapılan çalışmalardan dondurulmuş örnekler için tepki yüzeyi oluşturulamadığından denemelere faktöriyel deneme desenleri ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Şekil 4.1'de elde edilen tepki yüzeyi ile birlikte dondurulmuş örneklerden elde edilen veriler değerlendirilerek, denemelerde kullanılan sürenin 6 dk ve sıcaklığın 4°C (basınç sıvısının başlangıç sıcaklığı) olarak sabit tutulmasına ve basıncın 150, 250, 300 ve 350 MPa olarak değiştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.1 PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan d- örneklerin YHB işlemine tabi tutulması sonrasında *S. cerevisiae* sayısındaki azalma ile basınç düzeyi ve basınçlama süresi arasındaki ilişkiyi gösteren tepki yüzeyi. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4 °C.

4.1.2 Faktöriyel deneme deseni ile yapılan çalışmalar

4.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan denemeler

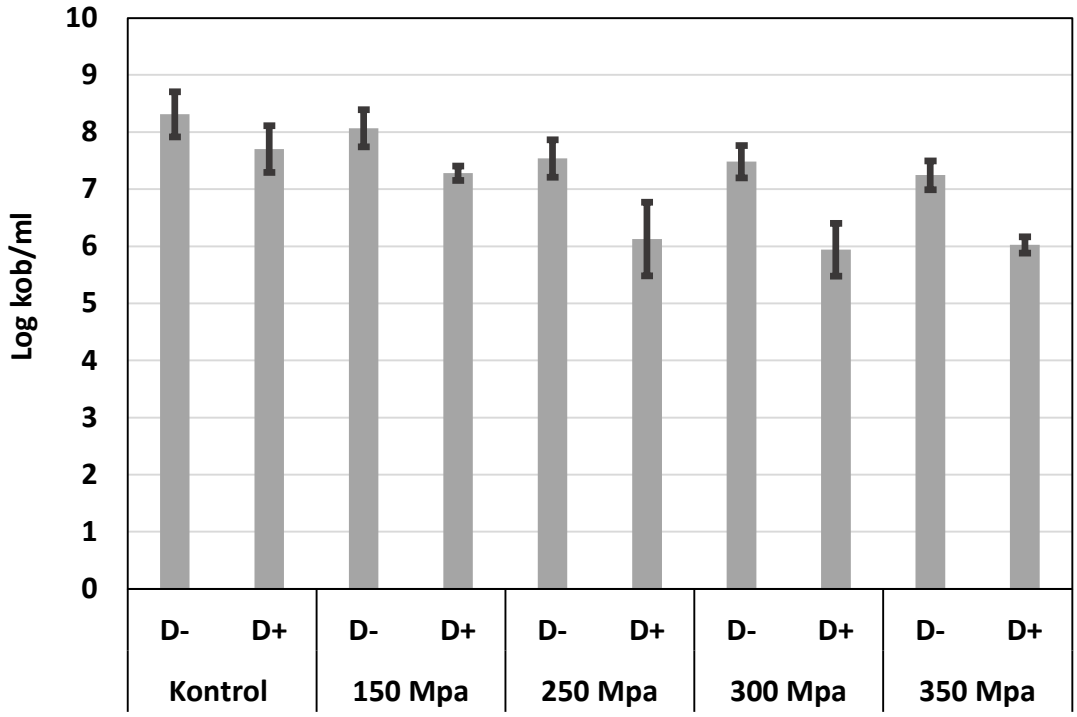
PBS (pH 7.1) çözeltisine *S. cerevisiae* inoküle edilerek hazırlanan ve bir gece 4 ºC'de bekletilen örneklerde (dondurulmamış: d-) *S. cerevisiae* sayısı 8.3±0.39 $\log_{10}$ KOB/mL olarak bulunmuştur. Aynı şekilde hazırlanan ve bir gece -20 ºC'de bekletilen örneklerde (dondurulmuş: d+) yapılan sayımlarda ise *S. cerevisiae* sayısı 7.69±0.40 $\log_{10}$ KOB/mL'ye düşmüştür. Dondurma işleminin bakteriyel hücrelere zarar verdiği ve bu

zararın derecesinin ortam pH'sının nötralden uzaklaşmasıyla arttığı bildirilmiştir (Bulut ve Karatzas, 2021). Mayalarla yapılan bir çalışmada ise dondurularak -18 °C'de depolanan mayalarda canlı hücrelerin miktarında düşüş gözlemlenmiş ve mayadan hücre içi sıvısının sızdığı SDS-PAGE ile tespit edilmiştir. Dondurulmuş mayanın depolama süresi arttıkça canlı maya hücrelerinin azaldığı ve 90 gün sonunda canlı hücre kaybının %52.4'e ulaştığı bildirilmiştir (D.Ribotta, E.León ve CristinaAñón, 2003).

PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin 4 C'de (basınç sıvısının başlangıç sıcaklığı) farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar $\log_{10}$ KOB/mL olarak Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere, dondurulmamış örneklerde mikrobiyal inaktivasyon artan basınçla birlikte kademeli olarak artmaktadır. Minimal inaktivasyonun gerçekleştiği 150 MPa'da *S. cerevisiae* sayısında yaklaşık 0.3±0.32 log azalma kaydedilirken, 250, 300 ve 350 MPa basınçlarda sırasıyla 0.77±0.33 0.83±0.28 ve 1,1±0.25 $\log_{10}$ KOB/mL azalma gerçekleşmiştir. Artan basınçla birlikte maya sayısında meydana gelen inaktivasyonun da arttığı daha önce *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bravim vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada, 50 MPa'lık bir basıncın maya hücrelerini öldürmediğini ve hücre morfolojisini değiştirmediğini ancak 100 MPa'ın üzerindeki basınçlarda hücrede morfolojisinde değişikliklerin meydana geldiğini ve 220 MPa'da ise hücrelerin önemli ölçüde inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Şekil 4.2'de görüleceği üzere dondurulmuş örneklerde basınç 150 MPa'dan 350 MPa'a çıkarıldığında mikrobiyal inaktivasyonun da yaklaşık 1.0±0.13 $\log_{10}$ birimden 2.1±0.14 $\log_{10}$ birime kadar arttığı gözlemlenmiştir.

Literatürde *S. cerevisiae* içeren dondurulmuş örneklerin basınçlanması ile ilgili bir veri bulunamadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak 200 MPa basınç altında -20 °C'ye kadar soğutulan 0.1 M PBS ortamında bulunan *S. cerevisiae* 0-39 suşunun tamamının (10^9 KOB/mL) inaktive olduğu (min tespit sınırı 10 KOB/mL) ve UV soğuran hücre içi sıvısının konsantrasyonunun -20 °C'de basınç altında kalınan süreyle doğru orantılı olarak arttığı rapor edilmiştir (Shimada vd., 1993). Söz konusu çalışmada 200 MPa basınçta -20 °C'ye ulaşıldığında absorbans (A_{280}) değerinin 1.155 olarak kaydedildiği ve 3 saat içerisinde 4.810'e ulaştığı rapor edilmiştir. Bu durumu hücrenin stoplazmik membran ve çekirdek membranının bozulması ile açıklayan araştırmacılar, bu

görüşlerini hücre içi yapısını gösteren TEM görüntüleri ile de desteklemişlerdir. Bu çalışmanın sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurulmamış örneklerle yapıldığı göz önünde bulundurulmalıdır (faz diyagramı gereği, su 210 MPa'da -20 ºC'ye kadar donmamaktadır).



Şekil 4.2 PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4 ºC. Hata çubukları ±1 standart sapmayı göstermektedir (n=3).

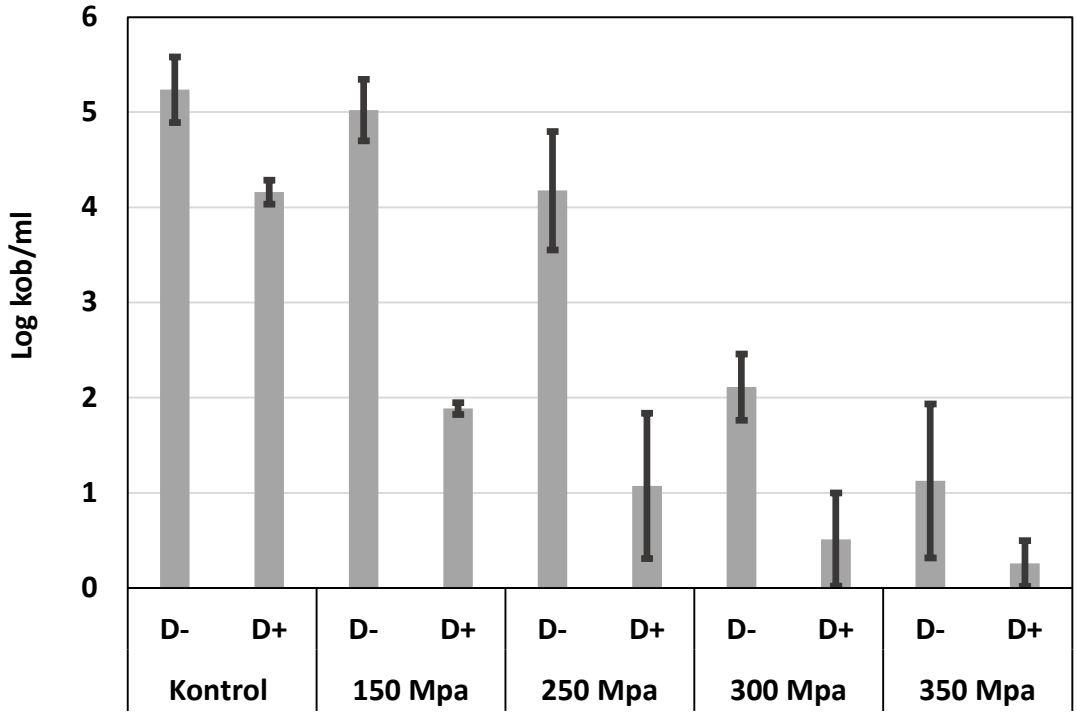
Literatürde bakteriyel hücrelerle yapılan çalışmalarda test mikroorganizmalarının inoküle edildiği örneklerin basınçlanmadan önce dondurulduğu durumlarda, dondurulmadan basınçlanan örneklere kıyasla çok daha yüksek oranda bakteriyel ölümlerin gerçekleştiği bildirilmiştir (Bulut, 2014a, 2014b; Bulut ve Karatzas, 2021; Ekonomou vd., 2020; Luscher vd., 2004; Su vd 2014). Örneğin süt ile yapılan bir çalışmada, 0 ºC'de 5 dk boyunca 300 MPa basınç işlemi soncunda sütteki *Escherichia*

coli ATCC 25922 sayısında 1.8 $\log_{10}$ azalma gözlemlenirken, aynı koşullar altında basınçlandırmadan önce dondurulan örneklerde *E. coli* sayısı 5.2 $\log_{10}$ birim azalmıştır (Bulut, 2014b).

Basınç işleminden önce bakteriyel hücrelerin bulunduğu örneklerin dondurulmasının bir sonucu olarak artan mikrobiyal inaktivasyon, temel olarak basınç altında buz I'in diğer buz polimorflarına katı-katı faz geçişleri sırasında oluşan mekanik stresle ilişkilendirilmiştir (Luscher vd., 2004). Buz-I'in yoğunluğu (0.92 $g \cdot cm^{-3}$), Buz-II (1.16 $g \cdot cm^{-3}$), buz-III (1.16 $g \cdot cm^{-3}$) ve buz-V'nin (1.24 $g \cdot cm^{-3}$) yoğunluğundan daha düşüktür (Chaplin, 2018). Basınç uygulaması sırasında sıcaklık ve basınç değişimine bağlı olarak buz fazları arasında meydana gelen katı-katı faz değişimleri sonucunda buz hacimde artış ve azalışlar meydana gelmektedir. Hacimde oluşan bu artma ve azalmanın ortamda bulunan mikrobiyal hücreler üzerinde mekanik stres oluşturduğu ve bunun sonucunda bakteriyel hücrelerde yüksek düzeyde ölüm gerçekleştiği düşünülmektedir.

YHB'ın mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin ortam pH'ı ile yakından ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle PBS kullanılarak hazırlanan *S. cerevisiae* örneklerinden elde edilen sonuçların, bu tez çalışmasında örnek gıda olarak kullanılan vişne suyundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilmesi için vişne suyunun ölçülen pH değerinde (3.2) hazırlanan PBS kullanılarak da denemeler yapılmıştır.

Şekil 4.3'de PBS (pH 3.2) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin 4 ºC'de (basınç sıvısının başlangıç sıcaklığı) farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar $\log_{10}$ KOB/mL olarak verilmiştir.



Şekil 4.3 PBS (pH 3.2) çözeltisine inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4ºC. Hata çubukları ±1 standart sapmayı göstermektedir (n=3).

150 MPa basınç uygulanan dondurulmamış örneklerde *S. cerevisiae* sayısında önemli bir azalma meydana gelmezken (0.2±0.32 $\log_{10}$ KOB/mL), 250, 300 ve 350 MPa basınçlarda sırasıyla 1.1±0.62, 3.1±0.34 ve 4.1±0.80 $\log_{10}$ KOB/mL azalma gözlemlenmiştir. PBS (pH 7.1) tamponunda elde edilen mikrobiyal azalmalarla kıyaslandığında, PBS pH 3.2 tamponunda elde edilen mikrobiyal azalmalar daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Bu durum, PBS pH 3.2 tamponunun pH'sının ayarlanması için kullanılan sitrik asidin antimikrobiyal etkisinin basınç altında artması ile açıklanabilir. Bilindiği üzere organik asitlerin antimikrobiyal etkisi ayrışmamış organik asit molekülleri üzerinden gerçekleşmekte ve düşük pH'larda ayrışmamış organik asit moleküllerinin konsantrasyonu artmaktadır. Ayrıca basınç altında organik asitlerin antimikrobiyal etkinliği de artmaktadır. Nitekim, Hao vd., (2021) yaptıkları bir çalışmada *E. coli*

O157:H7'nin protokateşik asit varlığında YHB'a tabi tutulduğunda 200 MPa'dan daha yüksek basınçlarda sinerjistik bir bakterisidal etki gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, sitrik veya laktik asit varlığında gıda kaynaklı patojen bakterilerle (*Staphylococcus aureus* 485 ve 765, *Listeria monocytogenes* CA) hazırlanmış örneklere 5 dk boyunca 50 °C'de 345 MPa basınç uygulanmıştır. Sitrik veya laktik asit ile pH'nın nötralden 4.5'e düşürülmesi ile mikrobiyal sayımlarda, pH 7.0 örneklerine kıyasla 1.2–3.9 $\log_{10}$ KOB/mL fazladan azalma kaydedilmiştir (Alpas vd., 2000).

Dondurulduktan sonra 150 MPa'da basınçlanan örneklerde yaklaşık 3.35±0.06 $\log_{10}$ KOB/mL azalma gözlemlenmiş ve artan basınçla birlikte mikrobiyal inaktivasyon da artarak 350 MPa'da 4.43±0.24 $\log_{10}$ KOB/mL'ye ulaşmıştır.

PBS pH 7.1'de elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında, pH'ı 3.2'ye ayarlanmış PBS örnekleri dondurulmadan basınçlandığında *S. cerevisiae* sayısında 300 ve 350 MPa'da basınçlarda önemli azalmaların olduğu Şekil 4.3'den anlaşılmaktadır.

4.1.2.2. *Saccharomyces boulardii* ile yapılan denemeler

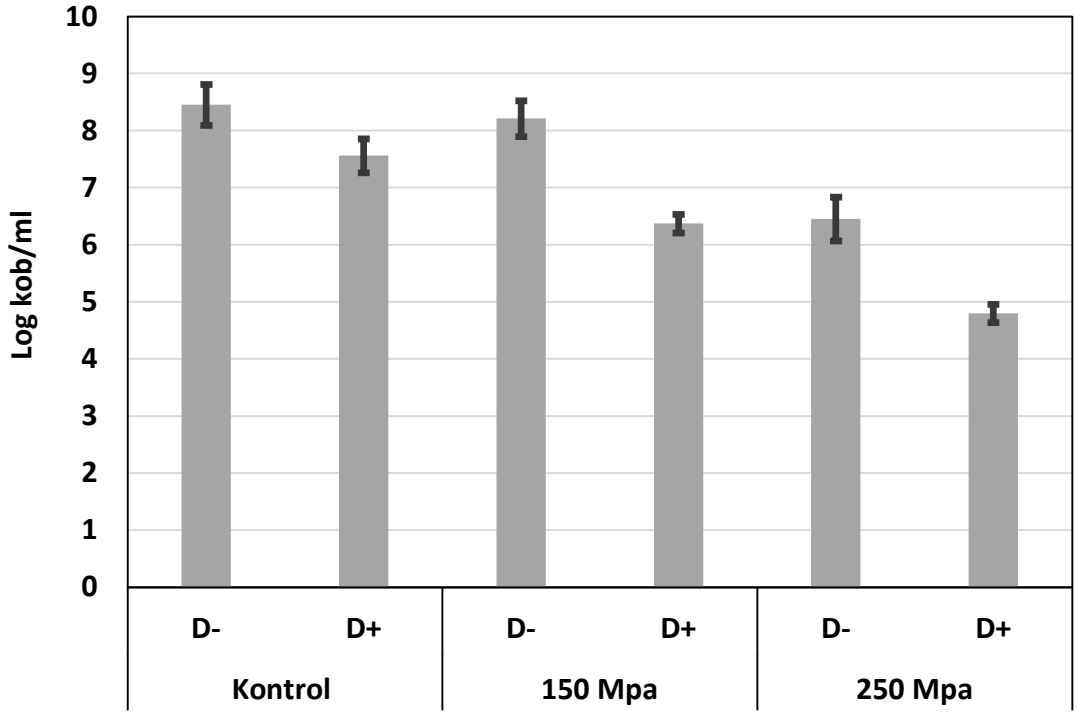
S. cerevisiae için tepki yüzeyi oluşturmak için yapılan denemelerle aynı anda, *S. boulardii* örnekleri de basınçlanmış ancak 350 MPa ve üzeri basınçlarda, dondurulmuş ve dondurulmamış örneklerde üreme olmadığından sayımlar yapılamamış ve tepki yüzeyi oluşturulamamıştır. Bu nedenle *S. boulardii* ile yapılan denemelere daha düşük basınçlar (150 ve 250 MPa) seçilerek devam edilmesine karar verilmiştir.

Şekil 4.4'de PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin 4 C'de (basınç sıvısının başlangıç sıcaklığı) farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar $\log_{10}$ KOB/mL olarak verilmiştir.

Sadece dondurduktan (-20 ºC'de 1 gece) sonra çözündürme işleminin *S. boulardii* hücrelerine zarar verdiği ve bunun sonucunda dondurulup çözündürülen örneklerdeki *S. boulardii* sayısında, 4 ºC'de bekletilen kontrol örneklerine kıyasla 0.89±0.36 $\log_{10}$ KOB/mL azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Sadece dondurma işleminden kaynaklı bu hasarın derecesinin 150 MPa'da 6 dk'lık bir işlem sonucunda elde edilen

mikrobiyal azalmadan (0.25±0.31 log_{10} KOB/mL) daha yüksek olması kayda değer bulunmuştur.

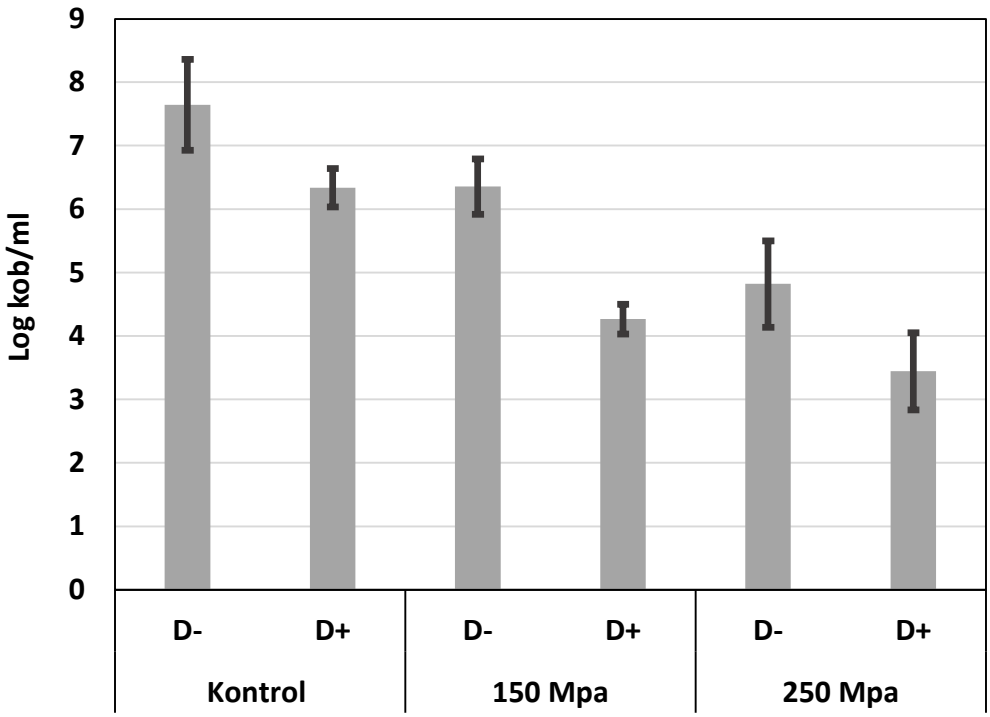
150 MPa'da dondurulmamış ve dondurulmuş örneklerdeki *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar sırasıyla 0.25±0.31 ve 2.08±0.16 log_{10} KOB/mL olarak kaydedilirken, basınç 250 MPa'a çıkarıldığında bu değerler sırasıyla 2.0±0.39 ve 3.65±0.16 log_{10} KOB/mL'e çıkmıştır.



Şekil 4.4 PBS (pH 7.1) çözeltisine inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4 C. Hata çubukları ±1 standart sapmayı göstermektedir (n=3).

S. cerevisiae için yapılan testlerde olduğu gibi sonuçların vişne suyu kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilmesi için PBS pH 3.2 çözeltisi kullanılarak *S. boulardii* ile hazırlanan örnekler de basınçlanmıştır. Şekil 4.5'de görüldüğü üzere sadece dondurma ve çözündürme işlemi sonucunda *S. boulardii* sayısında yaklaşık 1.3±0.30 log log_{10} KOB/mL azalma meydana gelmiştir ki, bu azalma 150 MPa'da 6 dk süreyle

basınçlanan dondurulmamış örneklerde meydana gelen mikrobiyal azalmaya eşittir. Dondurulduktan sonra basınçlanan örneklerde mikrobiyal azalma dondurulmamış örneklere kıyasla daha yüksek düzeyde gerçekleşmiş olup bu fark 150 MPa'da daha belirgin olarak gözlemlenmiştir. 150 MPa basınç uygulamasının ardından dondurulmamış örneklerde 1.29±0.44 log kob/ml azalma meydana gelirken, dondurulmuş örneklerde bu değer 3.37±0.23 $\log_{10}$ KOB/mL'ye yükselmiştir. Basınç 250 MPa'a çıkarıldığında dondurulmamış örneklerde 2.82±0.68 $\log_{10}$ KOB/mL azalma olurken, dondurulmuş örneklerde bu değer 4.20±0.61 $\log_{10}$ KOB/mL'e yükselmiştir.



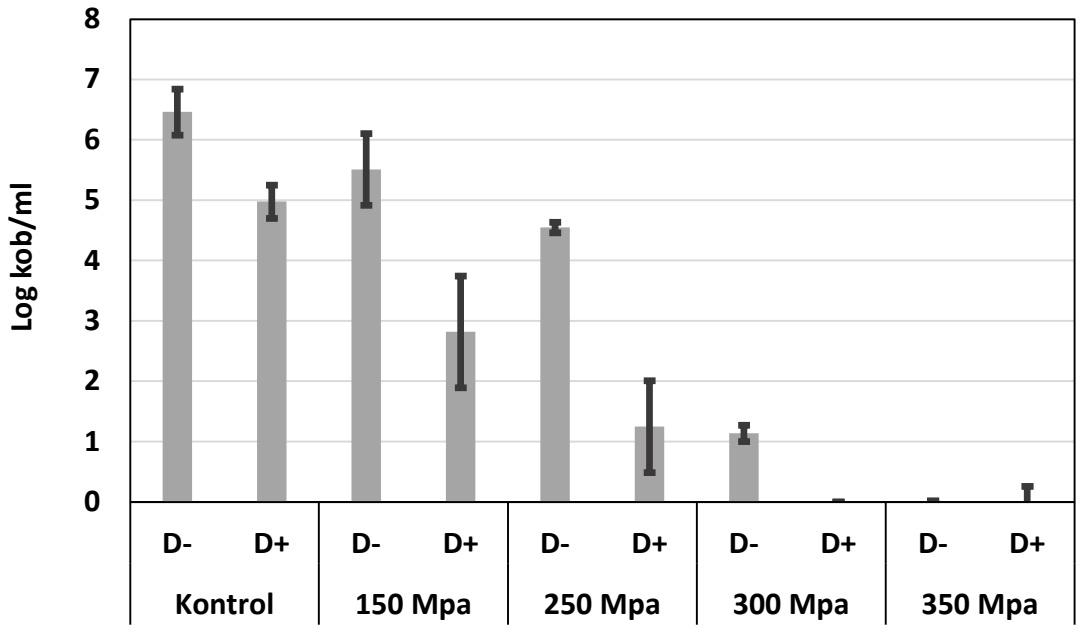
Şekil 4.5 PBS (pH 3.2) çözeltisine inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4 C. Hata çubukları ±1 standart sapmayı göstermektedir (n=3).

4.2 Vişne suyuna inoküle edilmiş mayaların YHB ile inaktivasyonu

4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan denemeler

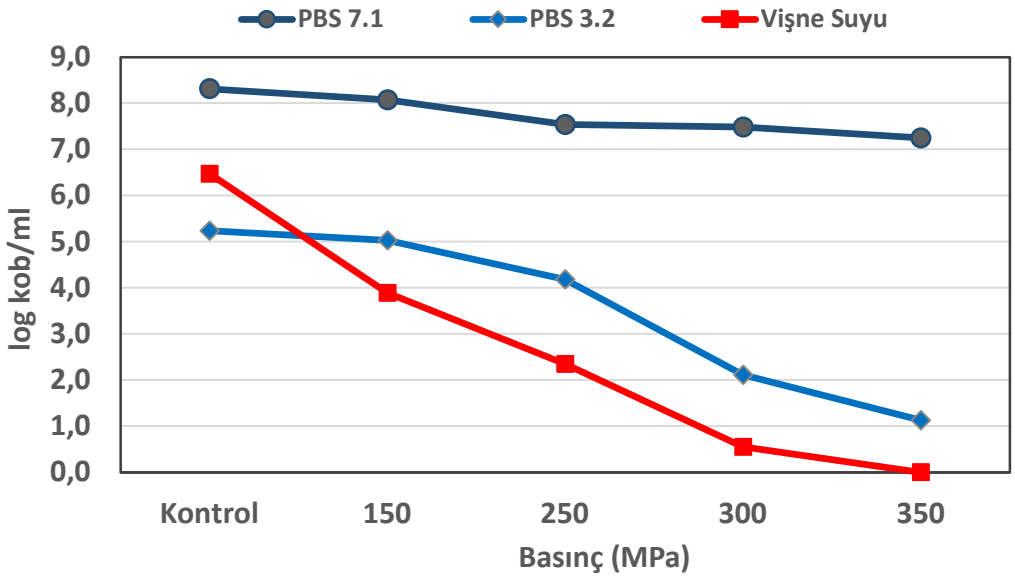
S. cerevisiae vişne suyuna inoküle edilip bir gece 4 ºC'de bekletildikten sonra yapılan sayımlarda *S. cerevisiae* sayısı 6.46±0.47 $\log_{10}$ KOB/mL bulunmuştur (kontrol örneği). Aynı şekilde inoküle edildikten sonra (aynı parti) -20 ºC'de bir gece bekletilip oda koşullarında çözündürülen örneklerde yapılan sayımlarda *S. cerevisiae* sayısı 5.54±0.08 log kob/ml olarak bulunmuştur. Şekil 4.6'da görüleceği üzere, dondurulmamış örneklerde 300 MPa'a kadar artan basınçla birlikte mikrobiyal inaktivasyon artarak 300 MPa'da 5.92±0.24 $\log_{10}$ KOB/mL'ye ulaşmıştır. 350 MPa'da basınçlanan dondurulmamış örneklerde ise mikrobiyal üreme görülmemiştir (min 6.46 $\log_{10}$ KOB/mL azlama).

Dondurulmuş örneklerin basınçlanması ile 150 MPa'da bile *S. cerevisiae* sayısında ciddi bir azalma (4.55 $\log_{10}$ KOB/mL) kaydedilmiştir. 250 MPa'da mikrobiyal yükteki azalmanın düzeyi 5.66±0.68 $\log_{10}$ KOB/mL'ye çıkarken, 300 ve 350 MPa basınca maruz kalan örneklerde üreme gözlemlenememiştir (min 6.46 $\log_{10}$ KOB/mL). Vişne suyu örneklerinden elde edilen bu sonuçlar, PBS pH 3.2 ile hazırlanan ve *S. cerevisiae* içeren dondurulmuş örneklerden elde edilen sonuçlarla (350 MPa'da 4.98 $\log_{10}$ KOB/mL) karşılaştırıldığında, vişne suyunda daha yüksek oranda mikrobiyal inaktivasyonun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Bu durum, vişne suyunda bulunan fenolik bileşenlerin basınç altında antimikrobiyal etkilerinin artması ile açıklanabilir. Nitekim, deneylerde kullanılan tüm basınçlarda tüm vişne suyu örneklerinde, PBS 3.2 çözeltisine kıyasla daha yüksek inaktivasyonlar gözlemlenmiştir. 300 MPa basınçla muamele edilen örneklerde donuk örneklerde ve 350 MPa basınçla basınçlanan her iki örnekte de (d- ve d+) *S. cerevisiae* canlılık gösterememiştir.

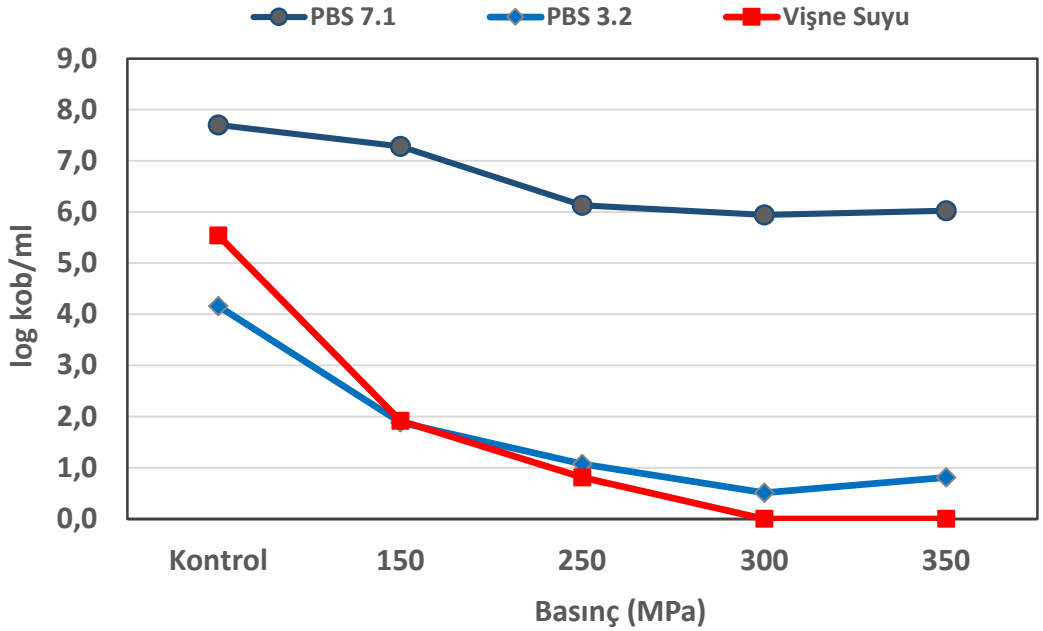


Şekil 4.6 Vişne suyuna (pH 3.2) inoküle edilen *S. cerevisiae* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4 C. Hata çubukları ±1 standart sapmayı göstermektedir (n=3).

Elde edilen verilerin karşılaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla *S. cerevisiae* ile PBS 7.1, PBS 3.2 ve vişne suyunda hazırlanan örneklerin farklı basınçlarda basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar dondurulmamış örnekler için Şekil 4.7.'de ve dondurulmuş örnekler için de şekil 4.8'de verilmiştir.



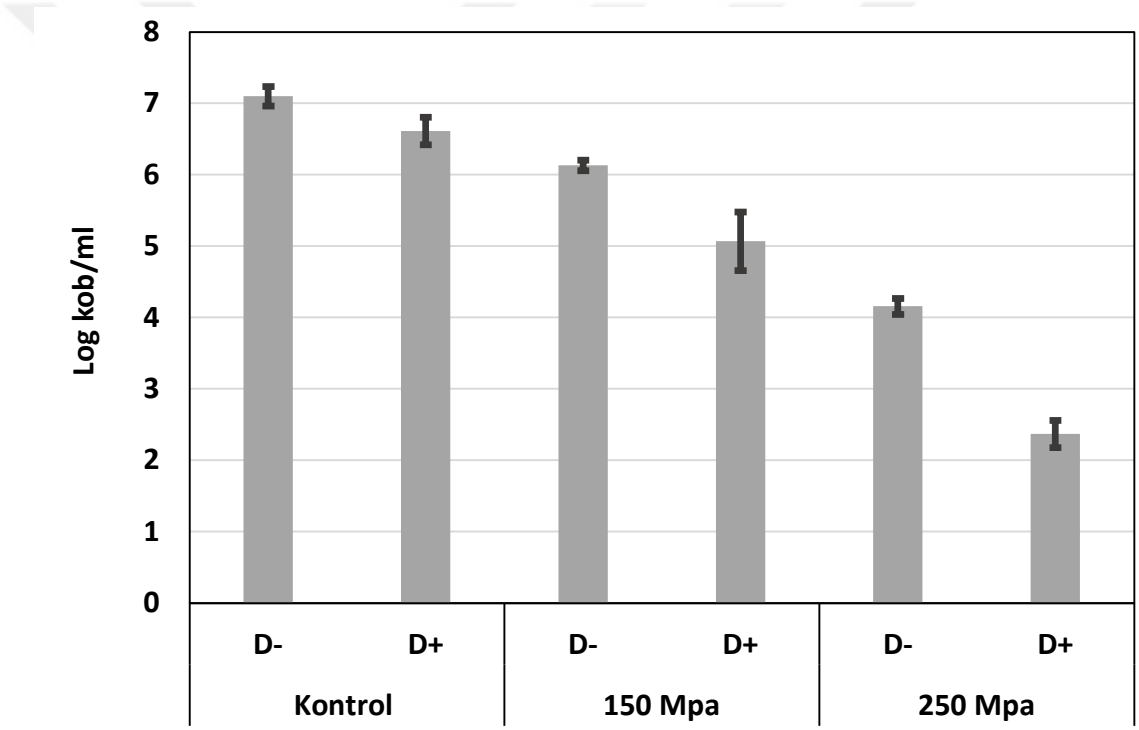
Şekil 4.7 *S. cerevisiae* ile PBS 7.1, PBS 3.2 ve vişne suyunda hazırlanan dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4°C.



Şekil 4.8 *S. cerevisiae* ile PBS 7.1, PBS 3.2 ve vişne suyunda hazırlanan dondurulmuş (d+) örneklerin farklı basınçlarda basınçlanması sonucunda *S. cerevisiae* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4°C.

4.2.2 *Saccharomyces boulardii* ile yapılan denemeler

Vişne suyuna inoküle edilen örneklerde -20 ℃'de bir gece bekletilen kontrol örneklerinde, 4 ℃'de bekletilen kontrol örneklerine kıyasla azalma 0.49±0.14 log_{10} KOB/mL'dir. 150 MPa basınç uygulamasının ardından dondurulmamış örneklerde azalma 0.97±0.07 log kob/ml iken donuk örneklerde bu sayı 2.03±0.41 log_{10} KOB/mL'ye yükselmiştir. Basınç 250 MPa'a çıkarıldığında dondurulmamış örneklerde azalma 2.94±0.11 iken log_{10} KOB/mL olurken dondurulmuş örneklerde bu değer 4.73±0.19 log_{10} KOB/mL'ye yükselmiştir.



Şekil 4.9. Vişne suyuna (pH 3.2) inoküle edilen *S. boulardii* ile hazırlanan dondurulmuş (d+) ve dondurulmamış (d-) örneklerin farklı basınçlarda 6 dk süreyle basınçlanması sonucunda *S. boulardii* sayısında meydana gelen azalmalar. Basınçlama sıvısının başlangıç sıcaklığı 4 C. Hata çubukları ±1 standart sapmayı göstermektedir (n=3).

BÖLÜM 5

SONUÇ VE TARTIŞMA

Nötral pH'a yakın PBS çözeltileri (pH 7.1) ile yapılan çalışmalarda *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* ile hazırlanan örneklerin dondurulmadan ve dondurulduktan sonra basınçlanması ile meydana gelen mikrobiyal ölümlerin beklendiği gibi basınç ve basınçlama süresinin artmasıyla arttığı gözlemlenmiştir. Her iki mikroorganizma için de kullanılan tüm basınçlarda dondurulmuş örneklerde gözlemlenen mikrobiyal inaktivasyon dondurulmamış örneklere kıyasla yaklaşık 0.4±1.1 $\log_{10}$ KOB/mL daha fazla gerçekleşmiştir.

Dondurulmuş ortamlarda basıncın mikrobiyal inaktivasyonu önemli derecede artırmasının temel nedeninin katı-katı faz geçişleri sonucunda hacim değişikliğinin ortaya çıkması olarak açıklanmaktadır (Luscher vd., 2004). Katı ortamda buz kristalleri arasında bulunan mikroorganizmalara uygulanan bir basıncın, sıvı ortamda bulunan mikroorganizmalara uygulanan bir basınç gibi her taraftan eşit olarak mikroorganizmaya etki etmeyeceği ve bunun sonucunda mikroorganizmaların mekanik (shear) kuvvetlere maruz kalabileceği düşünülebilir. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda hücre membalarının sıvı kristal yapıdan rijid kristal yapıya dönüşmesi ile basınca daha hassas hale gelmesinin de mikrobiyal inaktivasyonun artmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Deneylerde kullanılan vişne suyu pH'sına (3.2) ayarlı PBS çözeltileri ile hazırlanan *S. cerevisiae* ve *S. boulardii* örnekleri ile yapılan çalışmalarda, düşük basınçlarda (150 ve 250 MPa) dondurulmuş ve dondurulmamış örneklerde meydana gelen mikrobiyal azalmalar arasında büyük farklar gözlemlenmiştir. Orta düzeydeki basınçlarda (300 ve 350 MPa) işlem gören örneklerde mikrobiyal inaktivasyon artmış ancak dondurulmuş ve dondurulmamış örnekler arasındaki mikrobiyal inaktivasyon farkı azalmıştır.

Vişne suyu ile yapılan testlerde, *S. cerevisiae* sayısında 5 log azalma sağlamak için 300 MPa basıncın yeterli olduğu ve basınçlanmadan önce örneklerin dondurulmuş olup olmadığının önemsiz olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen veriler, meyve ve sebze ve ürünlerinde önemli bozulma etmeni olarak karşılaşılabilen mayaların YHB ile düşük ve orta düzeyde basınçlar kullanılarak inaktive edilebileceğini göstermektedir. Vişne suyu gibi düşük pH'ya sahip ürünlerde herhangi bir teknolojik neden veya kısıttan dolayı 250 MPa veya altında bir işlem uygulanma zorunluğu olmadıkça, basınçlanmadan önce dondurma işleminin bir avantaj sağlamadığı anlaşılmaktadır.

PBS pH 7.1 ile yapılan denemelerde yüksek pH'ya sahip düşük asitli gıdalarda basınçlamadan önce yapılacak bir dondurma işleminin tüm basınçlarda (150-350MPa) önemli bir avantaj sağladığı anlaşılmıştır.

S. boulardii'nin test edilen tüm ortamlarda basınca *S. cerevisiae'*dan daha hassas olduğu gözlemlenmiştir. Bu bilgiden hareketle, *S. boulardii*'nin kullanılmasıyla üretilen fermente ürünlerin (örneğin boza) veya bu mikroorganizmanın doğrudan katılmasıyla elde edilen probiyotik özellik kazandırılmış ürünlerin YHB ile pastörize edilmeye uygun olmadığı sonucu çıkarılabilir.

YHB ve dondurma işleminin birlikte kullanılmasıyla mikrobiyal inaktivasyonun artırılması üzerine yapılan çalışmalar az sayıda olup, bu konuda farklı test mikroorganizmaları ve farklı test ortamları ile daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, SEM ve TEM gibi görüntüleme teknikleri ile biyo-moleküler tekniklerin kullanılmasıyla basınç ve dondurma işlemlerinin birlikte kullanımı ile elde edilen sinerjistik etkinin mekanizmasının anlaşılması üzerine

yoğunlaştırılabilir. Elde edilen sonuçlar farklı meyve suları için optimize edilerek raf ömrü çalışmaları yapılabilir.

Bu tez konusu paralelinde yapılacak olan benzer çalışmalar sonucunda dondurulmuş meyve ve sebze sularının 250-350 MPa gibi düşük basınçlarda güvenli bir şekilde pastörize edilebileceğinin anlaşılması ile YHB teknolojisinin ilk yatırım ve işletme maliyetleri düşürülebilir. Bu tez çalışması ile bu konuya katkı sunulduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aganovic, K., Hertel, C., Vogel, R., Johne, F. R., Schlüter, O., Schwarzenbolz, U., Jäger, H., Holzhauser, T., Bergmair, J., Roth, A., Sevenich, R., Bandick, N., Kulling, S. E., Knorr, D., Engel, K. H. ve Volker, H. (2021). Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(4), 3225-3266.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B., (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. I*nternational Journal of Food Microbiology* 60, 33-42.

Ananta, E., Heinz, V., Knorr, D., (2004). Assessment of high pressure induced damage on Lactobacillus rhamnosus GG by flow cytometry. *Food Microbiology 21*, 567-577.

Ananta, E., Knorr, D., (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiology* 26, 542-546.

Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V., ve Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International journal of food science*, *2014*.

Barbosa-Cánovas, G. V., ve Juliano, P. (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. In *Food engineering: Integrated approaches* (pp. 9-46). Springer, New York, NY.

Bravim, F., de Freitas, J. M., Fernandes, A. A. R., ve Fernandes, P. M. (2010). High hydrostatic pressure and the cell membrane: stress response of *S. cerevisiae*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1189*(1), 127-132.

Bulut, S., (2014). High Pressure Processing of Chicken Meat: Change in Total Aerobic Counts after Pressure Treatment and During Chilled Storage. *British Microbiology Research Journal 4*, 540-549.

Bulut, S., (2014)a. The Effects of High-Pressure Processing at Low and Subzero Temperatures on Inactivation of Microorganisms in Frozen and Unfrozen Beef Mince Inoculated with Escherichia coli Strain ATCC 25922. *Food and Bioprocess Technology 7*, 3033-3044.

Bulut, S., (2014)b. Inactivation of Escherichia coli in milk by high pressure processing at low and subzero temperatures. *High Pressure Research 34*, 439-446.

Bulut, S., Karatzas, K.A.G., (2021). Inactivation of Escherichia coli K12 in phosphate buffer saline and orange juice by high hydrostatic pressure processing combined with freezing. *LWT 136*, 110313.

Buzrul, S. (2014). Multi-pulsed high hydrostatic pressure inactivation of microorganisms: A review. *Innovative Food Science ve Emerging Technologies*, *26*, 1-11.

Chakraborty, S., ve Rao, P. S. (2015). Impact of HPP on antioxidant capacity of fruit beverages.

Chaplin, M., (2018). Water Phase Diagram, UK.

D.Ribotta, P., E.León, A., ve CristinaAñón, M. (2003). Effects of Yeast Freezing in Frozen Dough. *Cereal Chemistry Journal*. https://doi.org/10.1094/cchem.2003.80.4.454

Daryaei, H., Coventry, M. J., Versteeg, C., ve Sherkat, F. (2008). Effect of high pressure treatment on starter bacteria and spoilage yeasts in fresh lactic curd cheese of bovine milk. *Innovative Food Science ve Emerging Technologies*, *9*(2), 201-205.

Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S.G., ve Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of Saccharomyces boulardii, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology, 73(8), 2458-2467.

Ekonomou, S.I., Bulut, S., Karatzas, K.A.G., Boziaris, I.S., (2020). Inactivation of Listeria monocytogenes in raw and hot smoked trout fillets by high hydrostatic pressure processing combined with liquid smoke and freezing. I*nnovative Food Science ve Emerging Technologies 64*, 102427.

Gopal, K. R., Kalla, A. M., ve Srikanth, K. (2017). High pressure processing of fruits and vegetable products: A review. *Int. J. Pure App. Biosci, 5*(5), 680-692.

Günel, E. (2014). *Salmonella surveillance on fresh produce and inactivation by high hydrostatic pressure* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Orta Doğu Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Goyette, B., Vigneault, C., Charles, M.T. and Raghavan, V.G.S., (2012). Effect of hyperbaric treatments on the quality attributes of tomato. *Can. J. Plant Sci., 92*(3): 541-551.

Grumezescu, A. M., ve Holban, A. M. (2018). Preface for Volume 18: Food Processing for Increased Quality and Consumption. In *Food Processing for Increased Quality and Consumption* (pp. xxiii-xxvi). Academic Press.

Hamada, K., Nakatomi, Y., Shimada, S., (1992). Direct induction of tetraploids or homozygous diploids in the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* by hydrostatic pressure. *Curr Genet 22*, 371-376.

Hao, J., Lei, Y., Gan, Z., Zhao, W., Shi, J., Jia, C., ve Sun, A. (2021). Synergetic Inactivation Mechanism of Protocatechuic Acid and High Hydrostatic Pressure against Escherichia coli O157: H7. *Foods*, *10*(12), 3053.

Hogan, E., Kelly, A. L., ve Sun, D. W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. *Emerging technologies for food processing*, 3-32.

Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J.M., (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science 62*, 359-371.

Indrawati, I., Ludikhuyze, L. R., Van Loey, A. M., ve Hendrickx, M. E. (2000). Lipoxygenase inactivation in green beans (Phaseolus v ulgaris L.) due to high pressure treatment at Subzero and elevated temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*(5), 1850-1859.

Jin, Q., ve Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, *6*, 21.

Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Nutrizio, M., ve Jambrak, A. R. (2021). Innovative Technologies in Sustainable Food Production: High Pressure Processing. In *Sustainable Production Technology in Food* (pp. 145-153). Academic Press.

Katırcıoğlu, H., ve Aksöz, N. (2003). Tek hücre proteini. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, *1*(08), 34-49.

Kato, M., Hayashi, R., (1999). Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Biosci Biotechnol Biochem 63*, 1321-1328.

Kocaadam, B., ve Tek, N. A. (2016). Ekmek, bira, şarap ve yoğurdun orijinleri ve tarihsel süreçleri. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, *44*(3), 272-279.

Łukaszewicz, M. (2012). *S. cerevisiae* var. boulardii–Probiotic Yeast. In *Probiotics*. IntechOpen.

Luscher, C., Balasa, A., Fröhling, A., Ananta, E., Knorr, D., (2004). Effect of High-Pressure-Induced Ice I-to-Ice III Phase Transitions on Inactivation of Listeria innocua in Frozen Suspension. *Applied and Environmental Microbiology 70*, 4021-4029.

Manas, P., Pagan, R., (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology 98*, 1387-1399.

Marechal PA, Martinez De Marnanon I, Poirier I, Gervais P. (1999). The importanceof the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorgan-isms: significance for minimal food processing. *Trends Food Sci Tech 10(1),* 15–20

Mortimer, R. K. (2000). Evolution and variation of the yeast (Saccharomyces) genome. *Genome research*, *10*(4), 403-409.

Özcan, D., ve Obuz, E. (2006). Yüksek basınç uygulamasının gıda endüstrisinde kullanımı. *Türkiye*, *9*, 24-26.

Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of applied microbiology*, *98*(6), 1400-1409.

Pilavtepe-Celik, M., Balaban, M.O., Alpas, H., Yousef, A.E., (2008). Image analysis based quantification of bacterial volume change with high hydrostatic pressure. *J Food Sci 73*, M423-429.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., ve Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *8*(3), 157-180.

Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M., Pilet, M.F., (2002). Physiological damages of Listeria monocytogenes treated by high hydrostatic pressure. I*nternational Journal of Food Microbiology* 79, 47-53.

Russell NJ, Evans RI, terSteeg PF, Hellemons J, Verheul A, Abee T. (1995). Membranesas a target for stress adaption. *Int J Food Microbiol* 28:255–61.

Sevinir Bakla, N. (2019). Yüksek hidrostatik basınç ile geleneksel badem ezmesinin raf ömrünün uzatılması (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Shimada, S., Andou, M., Naito, N., Yamada, N., Osumi, M., Hayashi, R., (1993). Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol 40*, 123-131.

Smelt, J.P.P.M., (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science ve Technology* 9, 152-158.

Su, G., Yu, Y., Ramaswamy, H.S., Hu, F., Xu, M., Zhu, S.,(2014). Kinetics of Escherichia coli inactivation in frozen aqueous suspensions by high pressure and its application to frozen chicken meat. *Journal of Food Engineering* 142, 23-30.

ter Steeg, P.F., Hellemons, J.C., Kok, A.E., (1999). Synergistic Actions of Nisin, Sublethal Ultrahigh Pressure, and Reduced Temperature on Bacteria and Yeast. A*pplied and Environmental Microbiology 65*, 4148-4154.

Tournas, V. H., Heeres, J., ve Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food microbiology, 23(7), 684-688.*

Trujillo, A. J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., Sendra, E., Saldoa, J., Ferraguta, V.ve Guamis, B. (2000). Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research International*, *33*(3-4), 311-316.

Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R.n., Guamis, B., (2002). Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science ve Emerging Technologies 3*, 295-307.

Yamamoto, K. (2017). Food processing by high hydrostatic pressure. *Biosci Biotechnol Biochem*. 81: 672- 679.

Wang, C.-Y., Hsu, C.-P., Huang, H.-W., Yang, B.B., (2013). The relationship between inactivation and morphological damage of Salmonella enterica treated by high hydrostatic pressure. *Food Research International 54*, 1482-1487.

ÖZGEÇMİŞ

Çorlu Vehbi Günaştı İlköğretim okulunda ilköğrenimimi tamamladım. 2015 yılında Çorlu Mehmet Akif Ersoy Lisesinden mezun oldum. 2015 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi gıda mühendisliği bölümünü kazandım. 2019 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi gıda mühendisliği bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda mühendisliği Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek Lisans eğitimim sırasında Erasmus+ programı ile West Pomeranian University of Technology Food Science Bölümünde Şubat 2021-Temmuz 2021 tarihleri arasında bir dönem öğrenim gördüm.

TEZ SIRASINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN BİLİMSEL FAALİYETLER

Konferans Bildirisi

1. Idrisoğlu F., Bulut S.,"Inactivation of *S. boulardii* inoculated in Phosphate-buffered saline and sour cherry juice by high hydrostatic pressure combined with freezing." IV. BALKAN AGRICULTURAL CONGRESS 31 August- 2 September 2022, Edirne, Turkey (Sözlü Bildiri) (Eylül 2022).