

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİLEŞİKLERİN *SALMONELLA*
ENTERITIDIS, *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN TAZE TAVUK ETİ SİSTEMİNDE İNCELENMESİ**

**Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği
Programı : Gıda Mühendisliği**

**DOKTORA TEZİ
Harika ÇANKAYA**

MART 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİLEŞİKLERİN *SALMONELLA ENTERITIDIS*,
ESCHERICHIA COLI O157:H7 VE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN TAZE TAVUK ETİ SİSTEMİNDE İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ
Harika ÇANKAYA
(506992100)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 Kasım 2008
Tezin Savunulduğu Tarih : 16 Mart 2009**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necla ARAN (İTÜ)
Eş Danışman : Doç. Dr. Gürbüz GÜNEŞ (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Kamil BOSTAN (İÜ)
Prof Dr. Harun AKSU (İÜ)
Doç.Dr. Meral KILIÇ (İTÜ)
Doç. Dr. Beraat ÖZÇELİK (İTÜ)
Doç. Dr. Murat ÖZDEMİR (GYTE)**

MART 2009

ÖNSÖZ

Günümüzde organik tarım uygulamalarına ve gıda endüstrisinde minimum işlenmiş, doğala en yakın gıdaların üretimi ve tüketimine ilgide büyük artış vardır. Bu çalışmada da doğal olarak kabul edilen katkı maddeleri ile taze et gibi patojen bakteri bulunma/çoğalma olasılığı yüksek olan ürün grubunda bakteri gelişmesinin kontrol altına alınması amaçlanmıştır. Tezde doğal antimikrobiyal kullanımı yanında farklı sıcaklık şartlarında modifiye atmosfer paketlemenin etkisi de incelenmiştir.

Doktora tezimin tüm aşamalarında, çalışmalarımı yürütmemdeki her türlü katkılarından, desteklerinden, doğru yönlendirmelerinden dolayı değerli danışman Hocalarım Prof. Dr. Necla ARAN'a ve Doç. Dr. Gürbüz GÜNEŞ'e yürekten teşekkür ederim, sizlere minnettarım.

İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği önceki Bölüm Başkanları Prof. Dr. Artemis KARAALİ ve Prof. Dr. Dilek BOYACIOĞLU'na ve İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanı Prof. Dr. Y. Onur DEVRES'e bana sağladıkları çalışma ortamı için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerinden dolayı Dr. H. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER'e, Erdem AKMAN'a, Neriman YILMAZ'a, Volkan Kalender KÖSEOĞLU'na da içten teşekkürü borç bilirim.

Et denemelerim için piliç eti sağlayan Emre Piliç'e (Emre Tavuk Gıda San.ve Ltd. Şti., Gebze, Kocaeli) teşekkür ederim. *S. enteritidis* liyofilize kültürü temininde İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ'ye çok teşekkür ederim.

Lisanüstü eğitimimi destekleyen ve bana İ.T.Ü.'de doktora imkanı tanıyan Y.Ö.K. Başkanlığı ve Harran Üniversitesi yönetimine teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca her türlü fedakarlık yapan aileme çok teşekkür ederim.

Ekim 2008

Harika ÇANKAYA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY.....	xvii
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Et ve Ürünlerinde Rastlanan Patojenik Bakteriler	5
2.2 Patojen Bakteriler, Gelişme Şartları ve Neden Oldukları Sağlık Sorunları	6
2.2.1 Salmonella	6
2.2.2 <i>E. coli</i> O157:H7	8
2.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.3 Doğal Antimikrobiyal Maddeler ve Patojen Bakterilere Karşı Taze Et Ürünlerinde Kullanımı	10
2.3.1 Nisin	10
2.3.2 Nisinin et ve ürünlerinin muhafazasında kullanım olanakları	13
2.3.3 Sodyum laktat	16
2.3.4 Laktatların et ürünleri muhafazasında kullanım olanakları	17
2.3.5 Greyfurt çekirdeği ekstraktı'nın antimikrobiyal etkisi	21
2.4 Kanatlı Et Ürünleri Muhafazasında Modifiye Atmosfer Paketleme (MAP) Uygulamaları ve Avantajları	22
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1 Bakteri Kültürleri	25
3.2 Antimikrobiyal Maddeler	25
3.3 Et ve Ambalaj Materyali	26
3.4 İn-vitro İnhibisyon Denemelerine Hazırlık Prosedürü	26
3.5 İn-vitro Test Tüplerinde Bakteri Sayısının Standardizasyonu.....	27
3.6 İnokulasyon, İnkübasyon Şartları ve Mikrobiyolojik Sayım.....	27
3.7 Kıyma Ortamına Antimikrobiyal, İngredient (NaCl, Sarımsak tozu) İlavesi, İnokulasyon, Depolama Şartları ve Mikrobiyolojik Sayım	28
3.8 Paket Atmosfer Bileşimi Ölçümü:	30
3.9 İstatistik Analizler	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1 İn-Vitro Deneme Bulguları.....	33
4.1.1 Nisinin patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri.....	33
4.1.1.1 Nisinin <i>S. enteritidis</i> üzerinde antimikrobiyal etkisi	33
4.1.1.2 Nisinin <i>E. coli</i> O157:H7 üzerinde antimikrobiyal etkisi.....	35
4.1.1.3 Nisinin <i>L. monocytogenes</i> üzerinde antimikrobiyal etkisi.....	37

4.1.2 Sodyum laktat (NaL)’ın patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri	40
4.1.3 Greyfurt çekirdek ekstraktı (Grapefruit Seed Extract:GFSE) kullanımının patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri.....	42
4.1.3.1 GFSE (Citril - 200)’nin <i>S. enteritidis</i> üzerinde antimikrobiyal etkileri	43
4.1.3.2 GFSE (Citril - 200)’nin <i>E. coli</i> O157:H7 üzerinde antimikrobiyal etkileri	44
4.1.3.3 GFSE (Citril - 200)’nin <i>L. monocytogenes</i> 4b üzerinde antimikrobiyal etkileri	44
4.2 Tavuk Kıymasında Patojenlere Karşı Antimikrobiyal ve Ambalaj Uygulamaları	46
4.2.1 GFSE (Citril - 200)’nin etkisi	46
4.2.2 GFSE (Citril - 200)’nin yüksek sıcaklıkta (10°C) Modifiye Atmosferde Paketleme ile etkisi :	49
4.2.3 Tavuk Kıymasının Farklı Formülasyonlarında GFSE ve Modifiye Atmosferde Paketlemenin Patojenler Üzerine Etkisi	55
4.2.4 GFSE’nin Düşük Sıcaklıkta Modifiye Atmosfer Ortamında Etkisi	60
4.2.5 Nisin’in (Valisin) Düşük Sıcaklıkta Modifiye Atmosfer Ortamında <i>L. monocytogenes</i> Üzerine Antimikrobiyal Etkisi	64
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	73
EKLER	79

KISALTMALAR

ANOVA	: Analysis of Variance
ATP	: Adenozin Three Phosphate
AU	: Activity Unit
CFU	: Colony Forming Unit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
GFSE	: Grapefruit Seed Extract
GRAS	: Generally Recognized As Safe
IU	: International Unit
LDPE	: Low Density Polyethylene
MAP	: Modifiye Atmosfer Paketleme
MOX	: Modified Oxford
N	: Normal (��zelti)
NaL	: Natrium lactate (sodyum laktat)
SMAC-CT	: Sorbitol McConkey-Cefixime-Tellurite
TAL	: Thin Agar Layer
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
TSBYE	: Tryptic Soy Broth Yeast Extract
XLD	: Xylose Lysine Deoxycholate
WHO	: World Health Organization

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge.3.1: İn vitro deney desenleri, faktörler ve seviyeleri ile ölçülen parametreler.	30
Çizelge.3.2: Tavuk kıyması ve formulasyonlarında deney desenleri, faktörler ve seviyeleri ile ölçülen parametreler.	31
Çizelge 4.1: <i>S. enteritidis</i> 'in nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	34
Çizelge.4.2: <i>S. enteritidis</i> 'in nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası regresyon katsayıları ve P değerleri.	34
Çizelge 4.3: <i>E. coli</i> O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	36
Çizelge.4.4: <i>E. coli</i> O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası regresyon katsayıları ve P değerleri.	36
Çizelge 4.5: <i>L. monocytogenes</i> 'in nisinle inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	38
Çizelge 4.6: <i>L. monocytogenes</i> 'in nisinle inhibisyon denemesine ait regresyon katsayıları ve P değerleri.	39
Çizelge 4.7: Farklı GFSE konsantrasyonlarında, farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında (stomacher torbası içerisinde) toplam bakteri ve test organizma sayıları ve standard sapmaları.	47
Çizelge 4.8: Tavuk kıyması formulasyonlarının 10°C'de depolanması sonucu 2 paket atmosferi bileşiminde meydana gelen değişimler (ortalama).	59
Çizelge 4.9: Tavuk kıymasına GFSE (0-6000 ppm) ilavesi ile 4°C'de depolanması ile 2 paket atmosferi bileşiminde meydana gelen değişimler (ortalama).	63
Çizelge 4.10: Kıymaya valisin (nisin) ilavesi ile 4°C'de depolanması sonucu 2 paket atmosferi bileşiminde meydana gelen değişimler (ortalama).	68
Çizelge A.1: Farklı pH ve nisin konsantrasyonlarında, 20 mM EDTA varlığında <i>S. enteritidis</i> sayılarındaki değişimler.	79
Çizelge A.2: <i>S. enteritidis</i> 'in nisinle inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	79
Çizelge A.3: <i>S. enteritidis</i> 'in nisinle inhibisyon denemesine ait regresyon katsayıları ve P değerleri.	79
Çizelge A.4: Farklı pH ve nisin konsantrasyonlarında, 20 mM EDTA varlığında <i>E. coli</i> O157: H7 sayılarındaki değişimler.	80
Çizelge A.5: <i>E. coli</i> O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	80
Çizelge A.6: <i>E. coli</i> O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait regresyon katsayıları ve P değerleri.	80
Çizelge A.7: Farklı pH ve nisin konsantrasyonlarında <i>L. monocytogenes</i> sayılarında değişim.	81

Çizelge A.8: Farklı NaL konsantrasyonunda 24 saat sonunda patojen bakteri sayıları.	81
Çizelge A.9: <i>S. enteritidis</i> 'in sodyum laktatla inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	81
Çizelge A.10: <i>E. coli</i> O157:H7'nin sodyum laktatla inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	81
Çizelge A.11: <i>L. monocytogenes</i> 'in sodyum laktatla inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	82
Çizelge A.12: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 1 saat içinde farklı sürelerde <i>S. enteritidis</i> sayıları.	82
Çizelge A.13: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 24 saat sonunda <i>S. enteritidis</i> sayıları.	82
Çizelge A.14: <i>S. enteritidis</i> 'in GFSE ile 1 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	83
Çizelge A.15: <i>S. enteritidis</i> 'in GFSE ile 24 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	83
Çizelge A.16: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 1 saat içinde farklı sürelerde <i>E. coli</i> O157:H7 sayıları.	83
Çizelge A.17: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 24 saat sonunda <i>E. coli</i> O157:H7 sayıları.	84
Çizelge A.18: <i>E. coli</i> O157:H7'nin GFSE ile 1 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	84
Çizelge A.19: <i>E. coli</i> O157:H7'nin GFSE ile 24 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	84
Çizelge A.20: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 1 saat içinde farklı sürelerde <i>L. monocytogenes</i> sayıları.	85
Çizelge A.21: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 24 saat sonunda <i>L. monocytogenes</i> sayıları.	85
Çizelge A.22: <i>L. monocytogenes</i> 'in GFSE ile 1 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	86
Çizelge A.23: <i>L. monocytogenes</i> 'in GFSE ile 24 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	86
Çizelge A.24: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	86
Çizelge A.25: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında <i>S. enteritidis</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	86
Çizelge A.26: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında <i>E. coli</i> O157:H7 sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	87
Çizelge A.27: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında <i>L. monocytogenes</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	87
Çizelge A.28: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde 10°C'de tavuk kıymasında toplam bakteri ve patojen organizma sayıları.	87
Çizelge A.29: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C'de tavuk kıymasında toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	88

Çizelge A.30: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında <i>S. enteritidis</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	88
Çizelge A.31: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında <i>E. coli</i> O157:H7 sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	88
Çizelge A.32: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında <i>L. monocytogenes</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	89
Çizelge A.33: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesinin iki farklı ortam atmosferinde 10°C’de test organizmaları üzerine etkisi.	89
Çizelge A.34: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesinin iki farklı ortam atmosferinde 10°C’de test organizmaları üzerine etkisi (2.tekrar bulguları).	90
Çizelge A.35: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesi ile 10°C’de depolanması ile <i>S. enteritidis</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	91
Çizelge A.36: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesi ile 10°C’de depolanması ile <i>E. coli</i> O157:H7 sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	91
Çizelge A.37: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesi ile 10°C’de depolanması ile <i>L. monocytogenes</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	92
Çizelge A.38: Tavuk kıymasında GFSE’nin 4°C’de iki paket tipi ile kullanımının test organizmaları üzerinde etkileri.	92
Çizelge A.39: Tavuk kıymasında GFSE’nin 4°C’de iki paket tipi ile kullanımı ile <i>S. enteritidis</i> sayılarına ait varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	93
Çizelge A.40: Tavuk kıymasında GFSE’nin 4°C’de iki paket tipi ile kullanımı ile <i>E. coli</i> O157:H7 sayılarına ait varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	93
Çizelge A.41: Tavuk kıymasında GFSE’nin 4°C’de iki paket tipi ile kullanımı ile <i>L. monocytogenes</i> sayılarına ait varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	93
Çizelge A.42: Kıymaya valisin (nisin) ilavesinin 4°C’de iki paket tipinde <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisi.	94
Çizelge A.43: Kıymaya valisin (nisin) ilavesi ile 4°C’de iki paket tipinde <i>L. monocytogenes</i> sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.	94

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1: Aerobik ve MAP paketlenmiş valisin ilaveli kıyma örnekleri.....	29
Şekil 3.2: İnce agar tabakası (TAL) uygulamasının şematik gösterimi	29
Şekil 4.1: EDTA (20 mM) varlığında nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda <i>S. enteritidis</i> gelişimi üzerine etkisi.	34
Şekil 4.2: EDTA (20 mM) varlığında nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda <i>E. coli</i> O157:H7 gelişimi üzerine etkisi.	35
Şekil 4.3: Nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda <i>L. monocytogenes</i> gelişimi üzerine etkisi.	38
Şekil 4.4: Farklı sodyum laktat (NaL) konsantrasyonlarında 35°C'de 24 saat sonunda test organizmaları sayılarında değişim.....	40
Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında farklı sürelerde <i>S. enteritidis</i> sayısında değişim (pH: 6,0).	43
Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında farklı sürelerde <i>E. coli</i> O157: H7 sayısında değişim (pH: 6,0).	44
Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında farklı sürelerde <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> sayısında değişim (pH: 6,0).	45
Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 35°C'de 24 saat sonunda test organizmaları sayılarındaki değişimler (pH : 6,0).	46
Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında toplam aerobik mezofilik bakteri sayıları.....	50
Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında <i>S. enteritidis</i> sayıları.....	51
Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında <i>E. coli</i> O157:H7 sayıları.....	53
Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C'de depolanan tavuk kıymasında <i>L. monocytogenes</i> sayıları.....	54
Şekil 4.13: GFSE'nin sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının aerobik ve MAP paketlenmiş tavuk kıymasında 10°C'de <i>S. enteritidis</i> gelişimine etkisi.....	56
Şekil 4.14: GFSE'nin sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının aerobik ve MAP paketlenmiş tavuk kıymasında 10°C'de <i>E. coli</i> O157:H7 gelişimine etkisi.....	57
Şekil 4.15: GFSE'nin sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının aerobik ve MAP paketlenmiş tavuk kıymasında 10°C'de <i>L. monocytogenes</i> gelişimine etkisi.....	58
Şekil 4.16: GFSE'nin (6000 ppm) aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında <i>S. enteritidis</i> sayılarına etkisi (4°C).	61

Şekil 4.17: GFSE'nin (6000 ppm) aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında <i>E. coli</i> O157:H7 sayılarına etkisi (4°C).....	62
Şekil 4.18: GFSE'nin (6000 ppm) aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında <i>L. monocytogenes</i> sayılarına etkisi (4°C).	64
Şekil 4.19: Farklı konsantrasyonlarda nisin ilavesinin tavuk kıymasında <i>L. monocytogenes</i> canlılığına etkisi (4°C).	65

BAZI DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİLEŞİKLERİN *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN TAZE TAVUK ETİ SİSTEMİNDE İNCELENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada ilk aşamada *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* 4b patojen bakterileri (5 log₁₀ kob/ml) üzerinde doğal antimikrobiyal maddelerin [nisin (0-500 ppm) ve/veya 20 mM EDTA, sodyum laktat (NaL) (% 2,0 ve 4,0), greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE) (0-300 ppm)] etkinliği Tryptic Soy Broth'da (TSB) incelenmiştir. İn vitro deneyler her bakteri için ayrı setlerde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında tavuk kıymasına ilave edilen GFSE, nisin, sarımsak tozu ve NaCl'ün, farklı atmosfer (aerobik ve modifiye atmosfer) koşullarında paketlenme ve farklı sıcaklıklarda (4 ve 10°C) depolamanın test edilen patojen bakteriler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deneme bulguları Minitab 12 bilgisayar programı kullanılarak ANOVA varyans analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Kültür ortamında nisin 20 mM EDTA ile birlikte *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 üzerinde önemli inhibisyon etkisi göstermezken (p>0,05), 73-500 ppm nisin tek başına 3,44-5,22 pH aralığında *L. monocytogenes* üzerinde kuvvetli bakterisit etki göstermiştir (p<0,05). Sıvı besiyerinde GFSE'nin (60-300 ppm ; pH : 6,0) 1. saatte ve 24 saat inkübasyon sonunda tüm patojenlere karşı bakterisit etki gösterdiği saptanmıştır. NaL'ın patojen bakteriler üzerinde önemli bir etkisi belirlenmemiştir (p>0,05).

Tavuk kıymasına 2000 ppm GFSE ilavesi, 4°C'de 6 gün depolama sonunda *S. enteritidis* sayısında kontrole göre 0,5 log₁₀, *L. monocytogenes*'de ise 1 log₁₀ azalma sağlamıştır. GFSE'nin kıymaya 3000 ve 6000 ppm ilave edildiği modifiye atmosfer (%70 CO₂ + %30 N₂) ve aerobik (%21 O₂ + %79 N₂) paketlenmiş örneklerde 10°C'de 6 günlük depolama sırasında *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'nin gelişimi üzerinde her bir faktörün (GFSE, süre, paket tipi) etkisi önemli bulunmuştur (p<0,05). Her iki bakteri için GFSE'nin iki düzeyinin indirgenme üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak farklı olduğu gözlenmiştir (p<0,05). *S. enteritidis* ve *E.coli*'nin inhibisyonunda 6000 ppm daha etkilidir. Modifiye atmosfer paketlenme (MAP) ile bu patojen bakterilerin gelişimi önemli düzeyde inhibe olmuştur. Ortama 6000 ppm GFSE ilavesi ile başlangıç *L. monocytogenes* sayısı (3 log₁₀) ise tespit limitinin altına (<2 log₁₀ kob/g) düşmüştür. *L. monocytogenes* inhibisyonunda konsantrasyonlar arasındaki fark önemli değilken, aerobik ve modifiye atmosfer paketler arasındaki fark önemli (p<0,05) bulunmuştur. Depolamanın 6. gününde aerobik-kontrol pakette *L. monocytogenes* sayısı 8 log₁₀'a ulaşmışken MAP-6000 ppm GFSE'de 2,5 log₁₀ düzeyindeydi.

Formulasyon çalışmasında, GFSE'nin (6000 ppm) sarımsak tozu (%2) ve NaCl (%2) ile sekiz farklı kombinasyonunun aerobik ve modifiye atmosferde paketlenmiş örneklerde 10°C'de 6 gün depolamada patojen bakteriler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçta *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'nin 10°C gibi nisbeten yüksek sıcaklıkta gelişiminde GFSE, NaCl, süre ve paket tipi önemlidir. *L. monocytogenes* için bu faktörlere ilaveten sarımsak önemli ($p=0,018$) (inhibitör) etkide bulunmuştur. Ortama GFSE'nin ilavesi ilk 3 günlük depolamada *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'de kontrole göre ortalama 2 log₁₀ kadar indirgenme sağlarken 6. gün sonunda bu etkinlik kaybolmuştur. Depolamanın 6. günü sonunda modifiye atmosferde paketlenmiş örneklerde aerobik paketlenmişlere göre *S. enteritidis* sayısında ortalama 1 log₁₀, *E. coli* O157:H7'de ise ortalama 2 log₁₀ fazla indirgenme sağlanmıştır. GFSE ile ilk 3 günlük depolama sırasında *L. monocytogenes* gelişimi kontrol altına alınmıştır. 6 gün sonunda ise sayı kontrole göre ortalama 2,5 log₁₀ düşük bulunmuştur. Modifiye atmosferde paketlenme *L. monocytogenes*'de aerobik paketlenmeye göre ortalama 1 log₁₀'luk inhibisyon sağlamıştır.

Soğuk depolamada (4°C) 6000 ppm GFSE içeren aerobik koşullarda paketlenmiş örneklerde *S. enteritidis* sayısı bir gün sonra yaklaşık 2 log₁₀ düşmüştür. Bu şartlarda modifiye atmosferde paketlenme *S. enteritidis*'in inhibisyonunda bir avantaj sağlamamıştır. *E. coli* O157:H7 için paket tipinin etkisi önemsiz bulunmuştur ($p=0,279$). *L. monocytogenes*'in kontrol altına alınmasında GFSE, süre ve modifiye atmosferde paketlenme önemli ($p<0,05$) etki göstermiştir. GFSE ve modifiye atmosfer, *L. monocytogenes* bakterisinin 4°C'de kontrolünde olumlu etkide (3 log₁₀ indirgenme) bulunmuştur.

Nisin et ortamında da *L. monocytogenes* üzerinde önemli inhibitör etki ($p<0,05$) göstermiştir (4°C). Kullanılan iki düzeyin (73 ve 250 ppm) etkisi istatistiksel olarak birbirlerinden farklı ($p<0,05$) bulunmuştur. Nisin 250 ppm düzeyinde ve MAP'la birlikte kullanıldığında 6 gün sonunda aerobik-kontrole göre 2,5 log₁₀ fazla inhibisyona neden olmuştur. Elde edilen bulgulara göre, nisin MAP ile kombinasyonu soğuk depolamada ette *L. monocytogenes* kontrolünde faydalı olacaktır.

THE INVESTIGATION OF SOME NATURAL ANTIMICROBIAL COMPOUNDS ON ACTIVITIES OF *SALMONELLA ENTERITIDIS*, *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FRESH CHICKEN MEAT SYSTEMS

SUMMARY

In the first part of this study, the effectiveness of natural antimicrobial substances [nisin (0-500 ppm) and/or EDTA (20 mM), sodium lactate (NaL) (%2.0 and 4.0), grapefruit seed extract (GFSE) (0-300 ppm)] on the growth of pathogenic bacteria (*S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 4b) were investigated in Tryptic Soy Broth (TSB). These experiments were conducted separately for each pathogen.

In the second part of the study, the effects of addition of grapefruit seed extract, nisin, garlic powder and NaCl on the pathogenic bacteria tested were investigated in minced chicken meat samples under different temperature storage (4 or 10°C) and packaging (aerobic and modified atmosphere) conditions. The data were analyzed with Analysis of Variance (ANOVA) using Minitab 12 statistical software.

The results indicated that nisin in combination with 20 mM EDTA did not exhibit an inhibition effect on *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 ($p>0.05$), whereas 73-500 ppm nisin alone in the pH range of 3.44-5.22 showed strong bactericidal effect ($p<0.05$) on *L. monocytogenes* in culture media. It was also observed that 20 mM EDTA itself at pH 5.22 had a bacteriostatic effect on *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7. Grapefruit seed extract (60-300 ppm) was found to have a bactericidal effect at pH 6.0 against all pathogenic microorganisms in the first hour and at the end of the 24-hour incubation period ($p>0.05$) in TSB. Sodium lactate did not show a significant effect on test organisms ($p>0.05$).

S. enteritidis and *L. monocytogenes* counts in minced chicken meat samples treated with 2000 ppm GFSE were found to be 0.5 log₁₀ and 1 log₁₀ CFU/g less respectively than in control at 4°C over the 6-day storage period. It was found that all factors (GFSE, period and packaging type) had a significant effect on the growth of *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 over the 6-day storage period in minced chicken meat samples which were treated with 3000 and 6000 ppm of GFSE and packaged under aerobic (%21 O₂+%79 N₂) and modified atmosphere packaging-MAP (%70 CO₂+% 30N₂) conditions at 10°C ($p<0.05$). A statistically significant difference was found between the inhibition effects of 2 different concentrations of GFSE ($p<0.05$) for two bacteria. High concentration level of GFSE (6000 ppm) was more effective to inhibit *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7. The growth of these pathogenic bacteria was also prohibited significantly using modified atmosphere packaging ($p<0.05$). Addition of 6000 ppm GFSE decreased *L. monocytogenes* from an initial level of 3 log₁₀/g to under the detection limit (< 2 log₁₀ CFU/g) on the first day of incubation. A statistically significant difference was found between packaging methods for *L. monocytogenes*, whereas no statistically significant difference was found between the

inhibition effects of 3000 and 6000 ppm GFSE. On the 6th day of storage, *L. monocytogenes* counts in the aerobic control samples were reached to 8 log₁₀, whereas *Listeria* counts in MAP-6000 ppm GFSE treated samples were only 2.5 log₁₀.

In the formulation study, the effects of eight different combinations of GFSE (6000 ppm) with garlic powder (% 2 w/w) and NaCl (% 2 w/w) on the pathogenic microorganisms were investigated under aerobic and modified atmosphere packaging conditions at 10°C during 6-day storage period. The results showed that growths of *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 were significantly influenced by GFSE, NaCl, period and packaging method at 10°C, relatively high temperature. In addition to these factors, garlic powder had a significant (inhibitory) effect on *L. monocytogenes* growth ($p=0.018$). It was observed that addition of GFSE resulted in a reduction 2 log₁₀ mean for *S. enteritidis* and *E. coli* O157:H7 counts compared to controls over the first 3-day storage period. However, no further reduction activity was observed at the end of the 6-day storage period. MAP packaging resulted in 1 log₁₀ mean reduction for *S. enteritidis* and 2 log₁₀ mean reduction for *E. coli* O157:H7 compared to aerobic packaging over the 6-day storage period. During the first 3 days of storage the growth of *L. monocytogenes* was controlled with GFSE. At the end of 6-day storage, the number of *L. monocytogenes* was lowered by 2.5 log₁₀ mean compared to controls with the addition of GFSE. MAP packaging led to a reduction of 1 log₁₀ mean for *L. monocytogenes* compared to aerobic packaging.

The addition of GFSE (6000 ppm) resulted in ~2 log₁₀ reduction of *S. enteritidis* after 24 h at 4°C in aerobic packages. MAP packaging did not provide any advantage in the reduction of *S. enteritidis*. It was also found that packaging method did not have a significant effect on *E. coli* O157:H7 ($p=0.279$). GFSE, period and packaging method significantly influenced the growth of *L. monocytogenes* ($p<0.05$). GFSE and MAP packaging was found to be effective (3 log₁₀ reduction) in controlling Listerial growth at 4°C.

It was found that nisin had a significant inhibitory ($p<0.05$) effect on *L. monocytogenes* growth in minced chicken meat at 4°C. There was a statistically significant difference between the effects of two concentrations of nisin (73 and 250 ppm). At the end of 6 days, the use of 250 ppm nisin with modified atmosphere packaging lowered *Listeria* counts by mean 2.5 log₁₀ compared to aerobic-controls. Our findings suggest that the combined use of modified atmosphere packaging and nisin is beneficial in controlling *L. monocytogenes* under chilled storage conditions.

1.GİRİŞ

Birçok ülkede gıda kaynaklı hastalıklar önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam ettiği için gıda güvenliği ve gıda kontrolü yıllardır ülkelerin önemli meselelerden birisidir. Güvenli gıda üretim ve kontrol alanındaki önemli inisiyatiflerin birçoğu, en gelişmiş ülkelerde gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde etkinliği hissedilen sistemleri desteklemiştir. Bugün, gıda güvenliği Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) öncelikli 11 konusundan biridir ve örgüt, gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalık riskinin önemli oranda düşürülmesinde daha sistematik ve agresif adımların atılması için çağrıda bulunmuştur (Schludt, 2002).

Gıda kaynaklı hastalıklar sadece halkın sağlığını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda bireylere, aile ve topluluklara, iş hayatına ve ülkelere ekonomik külfetler de getirir (Schludt, 2002). Amerika Birleşik Devletleri'nde, yıllık 76 milyon hastalık vakasının 323000 kadarı hastane tedavisi ve 5000'i de ölüm ile sonuçlanmıştır (Tauxe, 2002). Yine Amerika'da yaklaşık 250 milyon kişinin verimlilik kayıpları ve tıbbi maliyetleri 6,6-37,1 milyar dolar olarak tahminlenmiştir (Schludt, 2002).

Geniş spektrumdaki gıda patojenleri çeşitli enterik bakterileri, aerob ve anaerobları, viral patojenleri ve parazitleri, deniz dinoflagellatlarını, balık ve kabuklularda biotoksin üreten bakterileri ve bazı prionları kapsar. Mikrobiyal patojenler gıda ve su kaynaklarına bulaşarak kendilerinin veya ürettikleri toksinin vücuda alınmasıyla hastalığa sebep olurlar (Tauxe, 2002).

Salmonellozis, dünyada en sık rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklardan birisidir. İnsan hastalıklarında WHO tarafından toplanan verilere göre *Salmonella* serotip dağılımında son 20-30 yılda *S. enteritidis*'de çarpıcı bir nisbi artış olduğu belirtilmektedir. *S. enteritidis* 1980'lerde eşzamanlı olarak dünyanın her yerinde ortaya çıkmıştır (Schludt, 2002).

E. coli O157:H7 enfeksiyonunun ortaya çıkmasında et, özellikle de sığır eti başlıca riskli gıda grubudur. Et, deri veya bağırsaklardan fekal patojenlerin taşınması yoluyla kesim işlemi sırasında kontamine olur. Hastalık etmeni olduğu bilinen *E. coli*, son yıllarda verositotoksin üreten *E. coli* (VTEC) nin hastalık ve ölüme neden olduğu

önemli vakalar nedeniyle yeniden ilgi odağı olmuştur (Bell ve Kyriakides, 2002). Vakaların çoğu pişmemiş veya işlenmemiş gıdaların tüketimi ile ortaya çıkmıştır (Bacon ve Sofos, 2003). Sığır kıyması Amerika’da görülen EHEC (Enterohemorrajik *E. coli*) vakalarında en sık rastlanan gıdadır. Batı Amerika’da 1992-1993’deki önemli vakalarda 500 birey etkilenmiştir. Rapor edilen en büyük *E. coli* O157:H7 vakası Japonya’da binlerce kişinin hastalanmasına neden olan vakadır. *E. coli* O157:H7 gıda zehirlenmesi vakalarında düşük enfeksiyon dozu (2-2000 hücre) organizmanın asit toleransı ile ilişkilendirilmiştir. (Buchanan ve Doyle, 1997). Temizlik ve hijyen prosedürlerine uygun üretim ve çeşitli proseslerle *E. coli* O157:H7’nin kontrolü sağlanabilmektedir (Bell ve Kyriakides, 2002).

Et ve et ürünlerinin sıklıkla *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir ve bu nedenle bu gıdalar hassas tüketici grupları, özellikle hamile kadınlar ve bağışıklık sistemi zayıf bireyler için potansiyel risk oluşturabilirler. Günümüzde et ürünlerinde *Listeria*’nın kontrol altına alınması amacıyla uygulanan başlıca teknikler bakteriosinlerin ve organik asitlerin ilavesi ve modifiye atmosfer paketleme (MAP) yönteminin kullanımıdır (Lopez-Mendoza ve diğ., 2007).

Gıdanın güvenliği ve kalitesi üzerinde çeşitli faktörlerin (engellerin) tekli veya birlikte etkileri vardır. Gıda muhafazasında engellerin optimum kombinasyonu, mikrobiyal stabiliteyi olduğu kadar gıdanın duyuşal, besinsel, toksikolojik ve ekonomik niteliklerini de olumlu yönde etkilemektedir (Leistner, 1992).

Gıda endüstrisinde kullanılan doğal antimikrobiyal maddeler bitkisel (esansiyel yağlar, ekstraktlar gibi) hayvansal (lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz sistem) ya da mikrobiyal kaynaklı bakteriosinler (kolisinler, nisin, subtilin ve pediosinler, laktisin, kolistin) olabilmektedir.

Modifiye atmosfer paketleme (MAP) son 20 yılda, taze ve minimal işlenmiş gıdalar ile et ve et ürünlerinin muhafazasında yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu yöntemle ortama gaz karışımı verilerek gıdayı çevreleyen paket atmosferinin bileşimi değiştirilmektedir (Skandamis ve Nychas, 2002).

Gram negatif bakteriler genellikle bakteriosinlere duyarlı olmadıkları için MAP ve bakteriosinler iki tamamlayıcı engel olarak gıda bozulmalarında ve/veya patojen kontrolünde avantaj sağlayabilirler (Galvez ve diğ., 2007).

Bu araştırmanın amacı, doğal antimikrobiyal sistemlerin taze et ürünlerinde risk oluşturabilecek patojen mikroorganizmalar (*S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* 4b) ve diğer mikrofloraya karşı inhibisyon etkilerinin incelenmesidir. Çalışmada doğal antimikrobiyal maddelerden nisin (nisaplin) tek veya EDTA ile kombine edilerek, sodyum laktat (NaL) ve greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE; Citril-200)nın antimikrobiyal etkinliği in-vitro ortamda, GFSE, sarımsak tozu, NaCl ve nisin (valisin) etkinliği beyaz et (tavuk kıyması) matriksinde aerobik ve modifiye paket atmosferinde düşük (4°C) ve/veya yüksek sıcaklık (10°C) şartlarında araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Et ve Ürünlerinde Rastlanan Patojenik Bakteriler

Et ve et ürünlerinde bulunan ve bunların tüketimi sonucu insanlarda gıda enfeksiyonları ve zehirlenmelerine neden olan patojen mikroorganizmalardan en önemlileri; *Salmonella* türleri, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringens*'dir. Bunların dışında *Yersinia enterocolitica* ve özellikle et konservelerinde *Clostridium botulinum* sayılabilir. Ette indikatör olarak Enterobacteriaceae, toplam koliform, fekal koliform, ve *Escherichia* sayıları önemlidir (Acar ve diğ., 1998). Çiğ sütte olduğu gibi, çiğ et prosesleri sırasında enterik organizmalarla kontaminasyonu önlemek mümkün değildir ve karkas etinin hijyenik durumunun takibi çok önemlidir (Bell ve Kyriakides, 2002). *Campylobacter* cinsi bakteriler ile *Bacillus cereus* et kaynaklı patojen bakterilerdendir.

Kanatlı etlerinin buzlu su havuzunda soğutulması sırasında soğutma suyu arzu edilmeyen mikroorganizmalarla kontamine olur. *Salmonellalar*, *Proteus* türleri, *E. coli* ve pek çok soğuk toleraslı Enterobacteriaceae, *Campylobacter*, *S. aureus*, ve *C. perfringens* sıklıkla bulunur ve karkasların aynı havuza daldırılması çapraz kontaminasyona yol açar. Suyun belli bir kısmı karkas tarafından absorbe edilir ve bağlanır ve bu da eti kontamine ederek soğuk depolama sırasında bozulmayı hızlandırır (Bem ve Hechelmann, 1995).

2.2 Patojen Bakteriler, Gelişme Şartları ve Neden Oldukları Sağlık Sorunları

2.2.1 Salmonella

Salmonella, Enterobacteriaceae familyasına ait, Gram(-), sporsuz, fakültatif anaerob, mezofilik, çubuk (1 - 4 µm) şeklinde, genellikle hareketli (hareketsiz-flagellalı türleri ; *S. gallinarum*, *S. pullorum*) bir bakteridir. *Salmonella*'nın 2000'den fazla serotipi vardır ve hepsi insan patojeni olarak kabul edilir. İnsan, hayvanlar, kuşlar ve böceklerin bağırsak içeriğinde mevcuttur (Ray, 1996). *S. enterica* serotipleri *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* "insan salmonellozisi"nin en yaygın sebepleri olarak rapor edilmişlerdir. *Salmonella* spp. enfeksiyon yoluyla hastalığa neden olur. İnce bağırsaklarda çoğalarak kolonize olur ve enterotoksin üreterek iltihaplı reaksiyona ve ishale neden olur. Organizmalar, kan dolaşımına ve/veya lenf sistemine girerek daha ciddi hastalığa (septisemi) neden olabilir (Bell ve Kyriakides, 2002).

Salmonella, 5,2 - 46,2°C'ler arasında gelişebilmesine rağmen 35 - 43°C'yi tercih eder. Serotiplerin çoğu <7°C'de gelişmez. Bakteriler pH:3,8 ile 9,5 arasında gelişebilir fakat 6,5 - 7,5 optimumudur. İlâveten, *Salmonella* 0,93'ün üstündeki su aktivitesine ihtiyaç duyar ve ideal şartlar altında % 4 gibi yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilir (Anon., 1996).

Birçok hayvansal orijinli gıda maddesi salmonellozisin ortaya çıkmasına aracı olabilir. Bunlardan etler, özellikle kanatlı etleri, yumurta, süt ve su önemlidir. Nadiren de olsa, *Salmonella* kaynaklı hasta hayvan etlerinde bulunabilir, fakat karkasların en yaygın kontaminasyonu kesim sırasında iç organ içeriğinin ya da dışkı ile kirlenmiş deri ve ayakların teması sonucu oluşmaktadır. Bakteriler karkastan karkasa ve karkastan aletlere, çalışılan yüzeylere, et işleyen kişilerin ellerine kolaylıkla bulaşabilirler. Sığır, domuz ve kanatlı hayvan etleri salmonellozis vakalarının yaygın aracı olarak tanımlanmışlardır ve bu etlerin yetersiz olarak pişirilmesi başlıca sebep olarak gösterilmiştir. *Salmonella* yaygın olarak kanatlı hayvan karkaslarından izole edilmektedir. Kanatlı kesiminde çapraz kontaminasyon önemli bir problemdir ve haşlama, tüylerin yolunması, iç organların çıkarılması ve soğutma kritik aşamalardır. Daha sonraki aşamalarda ise işçilerin ellerinden, kullanılan alet - ekipmandan (bıçak, et doğrama tahtası, satır vb.), diğer çiğ gıdalardan bulaşma söz konusu olmaktadır. (Anon., 1996).

Salmonellozis enterik enfeksiyon türü olup iki farklı klinik tablo şeklinde meydana çıkar. Tifo (enterik humma) ve paratifo hastalıklarına neden olan *S. typhi* ve *S. paratyphi* grubunun konakçısı insan olup bu iki tür yalnızca insanda hastalık yapar. Bakteriler, fekal kontaminasyona maruz kalmış su, çiğ süt ve gıdalar aracılığı ile oral yoldan alınır. İnce bağırsaklara yerleşen hücreler epitel dokudan geçerek lenf dokusuna yerleşir ve kan sistemine geçerek (septisemi) vücudun değişik bölgelerine yerleşir. Vücut ısı yükselir, baş ağrısı görülür. Gastrointestinal belirtiler (kabızlık ve takiben kanlı ishal) daha geç dönemde çıkar. Hastalık kontamine su veya gıdanın tüketiminden 1 - 8 hafta sonra ortaya çıkar ve 1 - 8 hafta sürer. Tanısı kan, dışkı ve idrarda patojen tespiti yoluyla yapılır.

Bu *Salmonella* türleri dışındaki serotipler ise yaygın salmonellozis etmeni olan türler olup septisemiye yol açmadan gastroenteritise (gıda zehirlenmesi) neden olurlar. Tipik gıda zehirlenmesi olan bu tür *Salmonella* enfeksiyonlarının klinik belirtileri karın ağrısı, ateş, baş ağrısı, bulantı, kusma ve ishaldir. Belirtiler kontamine gıdanın alımından 5 - 72 (12 - 36 saat) saat sonra ortaya çıkar ve hasta 1 - 7 gün içerisinde kendiliğinden iyileşebilir. Patojen, dışkı ve kusmuktan izole edilebilir ve sayısı 10^6 - 10^9 /g arasındadır. Enfektif doz, serotipe, gıdanın çeşidine, tüketicinin yaşına ve fizyolojik şartlarına bağlı olarak değişir. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de klinik belirtilerin ortaya çıkması için 10^8 - 10^9 hücrenin vücuda alınması gerektiği belirtilse de bir çok vakada enfektif dozun bu sayının altında olduğu belirlenmiştir. Enfektif doz 'hücre sayısı/g. gıda' olarak verilebileceği gibi, hastalık belirtilerinin ortaya çıkması için vücuda alınması gereken hücre sayısı olarak da verilebilmektedir.

S. typhimurium, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. Saint - paul*, *S. agona*, *S. derby*, *S. panama*, *S. weltevreden*, *S. virchow* türleri insan ve hayvanlarda en yaygın rastlanan salmonellozis etkeni türlerdir. Bu türler içerisinde *S. typhimurium* ve *S. enteritidis* dünyanın hemen her bölgesinden izole edilirken, diğer serotipler belirli bölgelerden sıklıkla izole edilirler. Kümes hayvanları insan gıda zincirinde asemptomatik *Salmonella* kaynağı olarak en önemli yeri tutarlar (Acar ve diğ., 1998).

Salmonella vücuda alındıktan sonra mide ve bağırsağa geçer. Burada bağırsak duvarına tutunur ve bazı özel proteinler vasıtasıyla bariyere nüfuz eder. *Salmonella*

vücuda bir kez girdiği zaman karaciğere veya dalağa alınır. Diğer birçok bakteri için bu ölümle sonuçlanırken, *Salmonella* immun sistemin etkin çalışmasını engelleyen mekanizma geliştirmiştir. Karaciğerde *Salmonella* tekrar gelişebilir ve bağırsağa geri salınabilir. Tabii ki *Salmonellaların* hepsi bağırsak duvarını geçmez, çoğu ishalde bağırsaktan atılır. Zayıf sanitasyon bölgelerinde bu bakteriler toprak veya nehirlerde canlı kalarak su ve gıda kaynaklarının kontaminasyonu ile biraradaki insan, inek, tavukları enfekte edebilir (Url-2, 2006).

2.2.2 *E. coli* O157:H7

Diyarejenik veya enterovirulent *E. coli*, Enterobacteriaceae familyasına ait, Gram(-), fakültatif anaerob spor oluşturmeyen ve çoğunlukla hareketli bakterilerdir. Diyarejenik *E. coli* 4 ana gruba ya da kategoriye ayrılır. Birinci grup, Shiga toksini üreten *E. coli*'yi (STEC) ve enterohemorrajik *E. coli* (EHEC) suşlarını (112 kadar serotip tanımlanmıştır) içerir. STEC, Shiga-benzeri toksinler, veya verositotoksinler üretir ve Kuzey Amerika ve Avrupa'da diyarejenik *E. coli* bireylerinden izole edilen en yaygın serotipler O157:H7 ve hareketsiz O157'dir (Bacon ve Sofos, 2003) İkinci kategori, enterotoksijenik *E. coli*'dir (ETEC) ve yaklaşık olarak 32 serotipi tanımlanmıştır. ETEC sıcaklıkla bozunur enterotoksin ve/veya sıcaklığa dayanıklı enterotoksin üretebilir. Diyarejenik *E. coli*'nin üçüncü kategorisi ise enteropatojenik *E. coli*'dir (EPEC) ve invaziv (yayılmacı) olmayan ve shiga - benzeri toksin veya enterotoksin üretmeyen yaklaşık 23 adet tanımlanmış serotipi kapsar. Dördüncü kategori, enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) dir ve yaklaşık 14 tanımlanmış hareketsiz serotipi içerir, konakçı periferik dokularını sararak bağırsakta lumenden çıkabilir. İlave olarak, başka diyarejenik veya enterovirulent *E. coli* kategori veya grupları da, enteroagregatif *E. coli* (EAEC), nüfuz ederek bağlanan *E. coli* (DAEC), nekrotoksik veya hücre-koparıcı (NTEC veya CDEC) ve sitoletal şişirici toksin (CLDT veya CDT)-üreten *E. coli* olup bunların klinik alanı veya gıda kaynaklı önemi halen açıklanmamıştır (Bacon ve Sofos, 2003).

Diyarejenik *E. coli* 7 - 8°C gibi düşük ve 44 - 46°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmekle birlikte 35 - 40°C'yi tercih eder. pH : 6,0 - 7,0 arasında en iyi gelişmesine rağmen 4,4 - 9,0 arasında da gelişebilir. Gelişebileceği en düşük su aktivitesi 0,95 olup, gıda kaynaklı çoğu patojenin aksine asidik çevreye toleranslıdır. Örneğin % 1,5 gibi yüksek uygulanan asetik, sitrik ve laktik asit konsantrasyonuna direnç gösterdiği belirlenmiştir (Anon., 1996).

Enterohemorrajik *E. coli*, *E. coli* O157:H7 1982'den beri insan patojeni olarak tanımlanmıştır. EHEC'in neden olduğu hastalığın görülme sıklığı düşük olmakla birlikte, küçük çocuklarda ve yaşlılarda enfeksiyonun hayatı tehdit eden komplikasyonları ciddi sorun olabilmektedir (Schluntd, 2002). Pişmemiş sığır eti ve süt ürünlerinin tüketimi ile *E. coli* O157:H7 enfeksiyonunun meydana geldiği rapor edilmiştir (Zhang ve Mustapha, 1999).

Diyarejenik *E. coli* memelilerin gastrointestinal sisteminde bulunur ve neredeyse tüm çevremizde bolca bulunur. Bunlar hayvansal veya bitkisel kaynaklı gıdalardan, sudan veya kontamine ellerden fekal - oral yolla geçişle insanda hastalık oluşturur. STEC serotiplerinin (örn. O157:H7, O157:NM, O111:H8, O111:NM ve O26:H11) alımından ($>10^1$ hücre) ve 3 - 9 gün inkübasyon periyodundan sonra hafif ishal, ciddi kanlı ishal (hemorrajik kolit) veya, bazı durumlarda hemolitik üremik sendrom (HUS) olup mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopenia, ve akut böbrek yetmezliği ile karakterize edilir. STEC serotipi O157 ile infekte olan bireylerin yaklaşık % 6'sı HUS geliştirir. Kuzey Amerika'daki HUS vakalarının % 80'inin etiyolojik ajanının O157 olduğu düşünülmektedir (Bacon ve Sofos, 2003).

2.2.3 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes, spor oluşturmeyen, psikrotrofik, aerobik, mikroaerofilik veya fakültatif anaerobik, Gram(+), çubuk şeklinde ve 5'e kadar sayıda olabilen tüylü flagellaları vasıtasıyla hareketli bakterilerdir. Tüketime hazır kanatlı etlerinde % 60 a varan oranda, çiğ veya işlenmiş kanatlı etlerinde ise % 80-90 oranında *L. monocytogenes* varlığı rapor edilmiştir (Bacon ve Sofos, 2003).

L. monocytogenes - 4°C gibi düşük ve 45°C gibi yüksek sıcaklıkta gelişir ve 30 - 37°C optimumdur. Gelişmesi pH'sı 4,39 - 9,40 olan ortamda olur ama pH 7,0'yi tercih eder. *L. monocytogenes* 0,92'nin üstündeki su aktivitesine ihtiyaç duyar ve yüksek tuza dayanıklıdır, % 30 tuzda ve gıdalar için uygun nitrit düzeylerinde canlılığını korumuştur (Anon., 1996 Bacon ve Sofos, 2003).

L. monocytogenes, toplumun spesifik yüksek risk gruplarını etkileyen gıda kaynaklı patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Fırsatçı bir bakteri olan *L. monocytogenes* yaşlı, immun sistemi zayıf bireyler için ve fetusda ise septisemi, menenjit ve fetusun kaybına neden olarak ciddi hastalık sebebidir ve teşhis konan enfeksiyonların % 25'i ölümle sonuçlanır. Bu enfeksiyonlar sıklıkla pastörize

edilmeyen süt ürünlerinden ve fabrikada tekrar kontamine olan tüketime hazır et ürünlerinden kaynaklanır. *Listeria* mikroorganizmaları, 10^9 hücre/g gibi yüksek bir dozda alınması ile sağlıklı konakçıda ise sadece febrile gastroenteritise yol açmaktadır (Tauxe, 2002).

Çevrede bolca bulunduğu için insanlar *L. monocytogenes* ile sık sık karşılaşırlar. İnsan listeriozisinin ilk tanımlandığı 1929'dan beri listeriozis, nadir görülen fakat ölümcül bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Nadir görülen bir insan hastalığı olmakla birlikte gıda kaynaklı patojenlerden kaynaklanan ölüm vakalarının başlıca sebebi olarak bilinir. Listeriozis hastalığı, invaziv ve invaziv olmayan olmak üzere iki temel sendromla karakterize edilir. İnvaziv hastalık menenjit, septisemi, birincil bakteremi, endokardit, menenjit olmayan merkezi sinir sistem enfeksiyonu, konjunktivit ve grip benzeri hastalıkla (ateş, bitkinlik, kırıklık, bulantı, kramplar, kusma ve ishal) karakterize edilir. İnvaziv hastalıkta ortalama inkübasyon devresi semptomların başlamasından önce yaklaşık 30 gündür. Gastrointestinal semptomlar kayıtlı listeriozis vakalarının üçte birinde gözlenmiştir. Ateşli gastroenteritisle sonuçlanan listeriozisin invaziv olmayan formu birkaç salgında belgelenmiştir. Listeriozisin invaziv olmayan formunda ortalama inkübasyon süresi kısadır, tipik olarak 18 - 20 saattir. Ateşli gastroenteritisin semptomlarına neden olacak infekte edici doz miktarı bilinmemektedir. Ancak hastalığın invaziv formundakinden daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Donnelly, 2001).

2.3 Doğal Antimikrobiyal Maddeler ve Patojen Bakterilere Karşı Taze Et rnlerinde Kullanımı

2.3.1 Nisin

Laktik asit bakterilerince üretilen bakteriosinlerden olan Nisin A *Lactococcus lactis*'in bazı suşları tarafından üretilen 34 - kalıntı antimikrobiyal peptidten oluşur ve geniş aralıktaki Gram (+) bakterileri kuvvetle inhibe eder. Peptid, serin ve treonin kalıntılarından kaynaklanan dehidre kalıntılar olan dehidroalanin ve dehidrobtirini ve 5 intramoleküler tiyoeter köprüsünü oluşturan lantionin ve β -metil lantionini ve birkaç nadir özelliği gösterir. Gram (+) bakterilerde nisin enerji veren membran keseleri üzerinde aktivite göstererek proton hareket gücünü tahrir eder, amino asit alımını inhibe eder ve akümüle olan amino asitlerin salınımına sebep olur. Doğal bir nisin çeşiti olan nisin Z'ye maruz kalan *L. monocytogenes*'de hücresel potasyum

iyonlarının ani kaybı, sitoplazmik membranda depolarizasyon, hücre ATP'nin hidrolizi ve kısmi akışı gerçekleşir.

Nisin aktivitesinin esas hedefi, bakteriyel hücrenin sitoplazmik membranıdır. Bu lantibiyotik, enerji vermeyen lipozomlarla ilişkili görünmektedir ve en büyük interaksiyon da negatif yüklü fosfolipidlerle gözlenmiştir. Bu ise pozitif yüklü peptidlerin membranla başlangıçtaki etkileşiminin kısmen yüke bağlı olduğunu da göstermiştir. Bir trans-membran oryantasyonu, yaklaşık olarak 80 - 100 mV membran potansiyeli (içerisi negatif) mevcut değilse gerçekleşmez. Eşik potansiyeli membran fosfolipid kompozisyonu ve pH gibi çeşitli parametrelerden etkilenebilir. Nisin A ve Z asidik pH değerlerinde artan aktivite göstermiştir ve çok düşük hatta hiç olmayan membran potansiyellerinde membranı geçebilmiştir. Nisin A, trans-negatif potansiyeller oluştuğunda lipid membranlarda 0,2 - 1,2 nm çapta çoklu hal gösteren geçici delikler oluşturabilir. Bu porlar 0,5 kDa'a (kilodalton) kadar moleküler kütle içeren hidrofilik çözümlülerin geçişine izin verebilir. Aslında nisin A ve Z'nin hedef hücreden ATP sızıntısına neden olduğu gösterilmiştir. Böylece lantibiyotiklerin sitolitik por oluşturan proteinler grubuna dahil olduğu öne sürülmüştür. Driessen ve arkadaşları ise membran fosfolipid kompozisyonu tarafından belirlenen bir nisin etki modeli öne sürmüşlerdir. Fosfatidilkolinden oluşan lipozomlarda, nisinin proton hareket gücü (PMF) yokluğunda bile anyon-seçici taşıyıcı olarak aktivite gösterdiği öne sürülmüştür. Nisinin fosfatidilgliserol gibi anyonik fosfolipidleri içeren membranlara karşı aktivitesi, çift tabakalı yapının lokal düzensizliği ve nisinin membran içerisine girişini kapsar. Bu model ayrıca nisin molekülleri ve fosfolipidler arasındaki elektrostatik interaksiyonların lipid baş gruplarını por içine getirebildiğini de ileri sürmüştür (Abee ve diğ., 1995).

Nisin çok geniş spektrumdaki Gram (+) bakterilere karşı etkilidir. Nisinin antimikrobiyal aktivitesi pH'ya bağımlıdır ve düşük pH sistemleri nötral ya da alkali sistemlerden daha etkindir. pH düştükçe nisinin çözünürlüğü ve stabilitesi artar. Artan çözünürlük ise nisini bakteriye karşı daha etkin hale getirir. (Delves-Broughton, 1987 ; Lopez - Mendoza ve diğ., 2007).

Taze ve işlenmiş et ürünlerinde rastlanan bozulma etkeni ve patojen birçok bakterinin inaktivasyonu amacıyla, "chrisin", "nisaplin", "valisin" vb. isimlerde ticari preparatları bulunan nisin, lizozim ve doğal olarak kabul edilen çok sayıda

maddenin laboratuvar koşullarında inhibisyon dozlarının belirlenmesine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Kür edilmiş etlerde kalite ve sağlık sorunları yaratan önemli bakterilere karşı lizozim, “chrisin” (nisin), EDTA, diasetil ve tripolifosfatın minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MIC) belirlendiği in-vitro çalışmada (24°C’de 60 saat inkübasyon) *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* için MIC değerleri lizozim ve chrisin’de >500 ppm (12,5 ppm nisin), EDTA’da sırasıyla >2000 ve 1000 ppm olarak belirlenmiştir. Bu araştırmada chrisin, lizozim, EDTA, NaCl ve NaNO₂ gibi antimikrobiyallerin inhibisyonu artırıcı interaksiyonuna da bakılmış, istatistiksel analiz sonucunda Gram(+)’lerde nisinin EDTA ile kombinasyonunun inhibitör etkiyi güçlendirdiği gözlenmiştir (Gill ve Holley, 2003).

Stevens ve diğ. (1992) tarafından nisin ve bazı çelatlayıcıların altı farklı *Salmonella* türü üzerindeki inhibitör etkisinin incelendiği çalışmada en etkin uygulamanın 50-100 µg/ml nisin 20 mM EDTA veya sitrik asit ile birlikte ve 30 - 42°C’de kullanımı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada *Salmonella enteritidis* Puerto Rico No.1 suşu için 100 ppm nisin 20 mM EDTA ile kullanımının kontrol grubuna göre önemli (5 log₁₀) düşüş sağladığı belirlenmiştir.

Konu ile ilgili olarak *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella typhimurium* ile yapılan diğer bir çalışmada *Salmonella* sayısında da en fazla azalmayı (4,53 log₁₀ kob/ml) nisin EDTA ile kombinasyonunun (50 ppm nisin + 50 mM EDTA) meydana getirdiği gözlenmiştir. Laktat ve sitrat tek başına bakteri popülasyonlarını çok az düşürmüşlerdir (Cutter ve Siragusa, 1995).

Carneiro de Melo ve diğ.(1998) trisodium fosfat (TSP) muamelesinin, Gram(-) bakterilerin lizozim (10 ppm) ve/veya nisin’e (1 µM) hassasiyetini önemli biçimde artırdığını belirlemişlerdir. Piliç derisi üzerinde gerçekleştirilen çalışmada ise 37 °C’de 10 dak. 10 mM TSP’nin ardından 30 µM nisin veya 100 ppm lizozim ile 37 °C’de 30 dak. muamelenin, mevcut *S. enteritidis* hücrelerinin % 95 kadarını tahrip ettiği belirlenmiştir.

Boziaris ve Adams (1999) nisin ve çelatlayıcıların Gram(-) bakteriler üzerindeki etkisini incelemiş, 100 IU/ml gibi düşük konsantrasyondaki nisin ilavesinin *E. coli*’yi tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sıvı besiyerinde nisinle birlikte sadece EDTA ve pyrofosfatlar *E. coli*’de kabul edilebilir bir inhibisyon sağlamıştır.

Olasupo ve diğ. (2003), *E. coli* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı çeşitli doğal organik bileşikler tek başına veya nisinle kombine kullanmış, 5 doğal bileşiğin MIC değerlerini saptamışlardır. Sonuçta nisin tek başına bu bakterilere etkisiz bulunmuş, timol en düşük MIC değerleri ile en etkili olmuştur. Timol, karvakrol, öjenol, sinamik asit, diasetil bu iki Gram(-) bakteriye karşı tekli olarak inhibitör aktivite gösterirken, nisinle birlikte kullanımları antimikrobiyal aktiviteyi geliştirmemiştir. Araştırmacılar, doğal organik bileşiklerin bu iki bakterinin kontrolünde kullanım potansiyeli olabileceğini vurgulamıştır.

2.3.2 Nisinin et ve ürünlerinin muhafazasında kullanım olanakları

Bakteriosinler, bazı bakteriler tarafından üretilen ve benzer hücresel yapıda (hücre duvarı) bakteri gruplarının gelişmesini önleyen veya onları öldüren antibakteriyel özellikte proteinlerdir. Birçok laktik asit bakterisi tarafından farklı özelliklere sahip bakteriosinler üretilir. Bakteriosinlerin hassas mikroorganizmalara karşı aktivitesi, büyük ölçüde pH, hücre konsantrasyonu, lipid içeriği, proteolitik enzimler ve sıvı / katı sistem gibi faktörlerle etkilenir. Ayrıca ortam sıcaklığı ve bakteriosinlere direnç önemlidir (Abee ve diğ., 1995).

Nisin, antimikrobiyal madde olarak günümüzde kullanılan tek bakteriosindir (Cleveland ve diğ., 2001). Nisin antimikrobiyal olarak en çok laktik asit bakterilerine ve *Clostridia* türlerine karşı etkilidir ve hücre membranı geçirgenliğini etkileyerek düşük molekül ağırlıklı sitoplazmik bileşenlerin hücre dışına çıkmasına neden olmaktadır (Gill ve Holley, 2000). Nisaplin, % 2,5 saf madde içeren, nisinin standardize edilmiş ticari preparasyonudur. *Lactococcus lactis* kültürlerinden izole edilir.

Sodyum tripolifosfat ve EDTA gibi çelatlayıcılar, bakterilerin hücre membranlarını, lipopolisakkaritler gibi membran makromolekülleri arasında tuz köprüleri gibi iş gören divalent katyonlarla kompleks oluşturarak bozarlar (Gill ve Holley, 2003). EDTA'nın nisinle birlikte kullanımının da bakteriosinin sitoplazmik membrana etkisini artırdığı düşünülmektedir (Cutter ve Siragusa, 1995).

Nitratlar et ürünlerinde *Clostridium botulinum*'un gelişmesini engellemek için yaygın olarak kullanılırlar. Fakat gıdada nitrit varlığının tartışmalı olması nedeniyle alternatif yöntemlerin bulunması ve kullanım miktarının azaltılması konusu gündeme

gelmiştir. Nisinin ve düşük düzeyde nitratla kombinasyonunun *Clostridium* gelişmesini engellediği belirlenmiştir. Ancak bazı araştırmacılar et uygulamaları için nisinin, ette yüksek pH, homojen dağılım problemi ve fosfolipidler, proteinazlar, glutathion gibi et bileşenlerinin interaksyonu gibi nedenlerle dezavantajlarını dile getirmiştir. Nisin, sosis gibi kür edilmiş vakum ambalajlı et ürünlerinde bozulma etkeni laktik asit bakterileri olduğu için ve bakteriosinlerle de inhibe edildiği için yaygın bir deneme alanı bulmuştur (Cleveland ve diğ., 2001).

Rozbeh ve diğ. (1993), vakum paketli sığır etlerinin raf ömrünü artırmak için yaptıkları bir çalışmada, bakterisit olarak nisaplin (nisin, 500 IU/g et), mikrogard (antimikrobiyal metabolitler içeren ticari fermente süt ürünü, % 2), sodyum laktat (% 60 sodyum laktat içeren ticari preparat, % 2), pediosin AcH (*P. acidilactici* H'nin ürettiği bakteriosin) ve nisinin değişik konsantrasyonlarını kullanmış, pediosin ve nisaplinin bu ürünlerde bozulma etkeni olan *Leuconostoclar* üzerine doğrudan etkili [bu iki preparasyonun özellikle Gram(+) bakterilere, diğer ikisinin de Gram(-)'lere etkili] olduğunu belirlemiştir. Uygulamaların tümünde 3°C'de 8 haftalık sürede bakteri sayıları kabul edilebilir seviyede kalmıştır.

Sığır karkasının dekontaminasyonu amacıyla yapılan bir çalışmada, laktik asit (% 1,5), nisin (500 IU/ml) ve laktik asit-nisin karışımı sprey yıkamada kullanılmış, toplam bakteri, toplam koliform ve *E. coli* sayılarında kontrole kıyasla en fazla düşüş (2 log₁₀'a kadar) laktik asit-nisin kombinasyonu ile elde edilmiştir (Barboza ve diğ., 2002).

Tuzlanarak pişirilmiş ve soğutulmuş ördek etlerinin raf ömrü ile ilgili bir çalışmada, nisin, sodyum laktat ve mikrodalganın etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, 400 mg/kg nisin + % 3,5 sodyum laktat solüsyonuna vakum paketleme öncesi 1 dak. daldırma ve 915 MHz, 400 W mikrodalga uygulaması ile pişmiş ördek etlerinin oda sıcaklığında 20 günden fazla dayandığı mikrobiyolojik ve duyuusal testlerle gösterilmiştir (Xu ve diğ., 2000).

Manda etine (kıyma) 400, 800 veya 1200 IU/g nisinin % 2 NaCl ile kombine edilerek ilavesiyle, 4°C'de 16 günlük depolama sırasında *L. monocytogenes* gelişimi kontrol altına alınmıştır (Pawar ve diğ., 2000).

Lactococ bakteriosinleri ile yapılan bir çalışmada, et (sığır kıyması) 3 log₁₀ kob/g *L. monocytogenes* ATCC 15313 ile inoküle edilmiş, 100 AU/g lacticin NK24 veya nisin ilavesinden sonra 4°C’de 21 gün ve -18°C’de 70 günlük depolama süresi boyunca kontrole kıyasla bakteri sayılarındaki azalma izlenmiştir. Soğutulmuş örneklerde bakteriosinler *L. monocytogenes* gelişmesini 7, 14 ve 21. günlerde sırasıyla 1, 1,4 ve 1,7 log₁₀ düzeyinde düşürmüşlerdir. Dondurulmuş örneklerde ise 7, 14 ve 28. günlerde sırasıyla 1, 1,4 ve 2,1 log₁₀ birimlik indirgenme belirlenmiştir. Bu bakteriosinlerin kıymadaki *L. monocytogenes* kontaminasyonunu elimine edebileceği veya indirgeyebileceği belirtilmiştir (Hye ve diğ., 2001).

*L. monocytogenes*in sığır etine tutunmasını inaktive etmek amacıyla kp şeklindeki sığır etleri laktik asit (% 2), nisin (4x10⁴ IU/ml) veya “pediocin” PO₂ solusyonuna daldırılmış ve 2 *Listeria monocytogenes* suşu ile inokule edilerek 4°C’de 48 saat depolanmıştır. Depolama sırasında antimikrobiyal ajanlar *Listeria* sayılarını sırası ile 1,7, 1,1 ve 0,6 log₁₀ kob/6 cm² dşrmştir (El Khateib ve diğ., 1993).

Vignolo ve diğ. (2000), laktik asit bakterilerinin ürettiği 3 bakteriosinin, 2 *Listeria* türüne antilisterial etkilerini hem sıvı besiyeri hem de ette incelemiş, 3 bakteriosinin (lactocin 705, enterocin CRL35 ve nisin karışımı : 17 000 AU/ml + 17 000 AU/ml + 2000 IU/ml) kullanıldığında sıvı besiyerinde 24 saattan sonra canlı mikroorganizma bulunmamıştır. Benzer sonuç et sisteminde de elde edilmiştir.

Kr edilmiş bazı et ürünlerinde (ham ve bologna tipi sosisler) lizozim, nisin ve EDTA’nın antimikrobiyal etkilerinin incelendiği bir araştırmada, sosisler 500 ppm lizozim, nisin (1 : 3) ve 500 ppm EDTA ilavesiyle hazırlanmış ve patojenik veya bozulma etkeni bakterilerle inoküle edilmiştir. Vakum paketlenerek 8°C’de 4 hafta depolanmıştır. Bologna tipi sosislerde *L. mesenteroides* ve *L. monocytogenes* 2 haftada kontrole göre zayıf bir gelişme göstermiştir. Ham tipi sosislerde ise antimikrobiyal ilavesi *E. coli* O157:H7’nin gelişmesini 4 haftada dşrmştir. *S. typhimurium*’un gelişmesi 3 haftadan itibaren artmıştır (Gill ve Holley, 2000).

Llorca ve Sheldon (1995) domuz eti örneklerini nalidiksik aside dirençli bir *S. typhimurium* suşu ile inoküle etmiş, 30 dak. süreyle 25 ml nisin içeren çözeltiye (100 g/ml nisin, 5 mM EDTA ve % 0,5 Tween 20) daldırmışlar, daha sonra kontrol (30

dak. distile suya daldırılan) ve muamele örnekleri 5 ml su ve nisin bazlı solüsyonla paketlenerek 96 saat 4°C’de depolanmıştır. Nisin muamelesi ette *S. typhimurium* sayısında 24 saat içinde 2,1 - 3,4 ve 96 saat sonra 2,5 - 3,7 log₁₀ luk azalmalar sağlamıştır.

Nisinin piliç etlerinde önemli bir risk oluşturan *Salmonella* cinsi ve diğer Gram(-) bakterilere karşı etkisinin incelendiği bir araştırmada, nisin ‘food grade’ çelatlama ajanlarıyla kombine edilmiştir. Nisin preparatlarına daldırılan bagetlerde *S. typhimurium* NAR populasyonunda azalma belirlenmiştir. 30 dak.lık uygulama, soğutulan bagetlerin raf ömründe 1,5 - 3 gün artış sağlamıştır (Shefet ve diğ., 1995).

Hayvansal kaynaklı doğal bir enzim olan lizozimin tek başına ve nisinle kombine edilerek bakterisit etkisinin incelendiği bir çalışmada, mikrotiter sistem (in-vitro) ve *S. enteritidis* veya *typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşları içeren sosis ve hamburgerler denemeye alınmıştır. *L. monocytogenes*’e karşı in-vitro denemede lizozim 9,27 mg/ml, nisin 212,8 µg/ml konsantrasyonda bakterisit etki göstermiştir. Sosislerde nisin ve lizozim sinerjistik etki göstermiş, *L. monocytogenes* sayısını MOX Agar’da 1.gün 3 log₁₀, 2.gün 3 log₁₀ ve 3.gün 2 log₁₀ düzeyinde düşürmüştür. Sosislerde *S. aureus* sayısının indirgenmesinde de benzer sonuç alınmıştır (Proctor ve Cunningham,1993).

2.3.3 Sodyum laktat

Sodyum laktat, organik bir asit olan laktik asitin sodyum tuzudur. Sodyum laktata dair çeşitli inhibisyon mekanizmaları ileri sürülmüştür. Maas ve diğ. (1989), iki muhtemel mekanizma önermiştir. İlki, yüksek seviyelerde laktat iyonu, hücrenin termodinamik eşdeğerliği ile ilgili olan pirüvatın laktata indirgenmesini değiştirebilir ki, gelişme için esansiyel olan anaerobik enerji yolunu inhibe eder. İkincisi, bakteriyel hücreden laktat akışı hücre membranları içinde proton transferiyle üretilen ATP ile bağlanabilir. Yüksek hücre dışı laktat bu mekanizmayı inhibe edebilir.

Wit ve Rombouts (1990) ise laktat akümülyasyonunun taşıyıcı vasıtalı akışla karşılanacağını, bunun ise enerji gerektireceğini ve sentez ile gelişme için kullanılamayan enerjinin kaybının mikroorganizmaların lag fazını uzatacağını ileri sürmüşlerdir.

Mikrobiyal inhibisyonda esas önemli olan dissosiyeye olmamış (protonize) asit konsantrasyonudur ve bu pH'dan etkilenir. pH değeri yükselince daha fazla asit molekülü dissosiyeye olacaktır. Öte yandan aynı pH değerinde farklı asitler pKa değerleri düşük ise daha fazla dissosiyeye olacaklardır. Bu karakteristikler mikrobiostazis ve mikrobisidal potansiyelde önem taşır. Fermente olmayan gıdalarda pH nötrale yakındır ve dissosiyeye ve dissosiyeye olmamış formlar arasındaki oran belirgin olarak ikincisi lehinedir. Ayrıca, laktik asit tuzları için inhibisyon olgusu asitin dissosiasyonuna ve sonrasında protonların üretimine bağlanamaz çünkü bu bileşikler sulu fazda tamamen dissosiyeye olur. Kalsiyum laktat üzerine çalışmalar bu tuzun bakteriostatik aktivitesi olduğunu göstermiştir, ancak bu katyondan olmayabilir, çünkü katyon, Na/K transmembran eşdeğerlik balansını etkilemez (Bogaert ve Naidu, 2000).

2.3.4 Laktatların et ürünleri muhafazasında kullanım olanakları

Laktik asitin sodyum tuzu olan sodyum laktat, GRAS statüsünde olup et ve tavuk ürünlerinde nem çekici, aroma artırıcı, ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle kullanım alanı bulmuştur. Ürünün pişme verimi ve su tutma kapasitesini artırarak duyuşal niteliklerine katkıda bulunur. Sodyum laktat (NaL) ve potasyum laktat (KL) ette aerobik ve anaerobik bakterilerin kontrolünde genel olarak aynı etkiyi göstermektedir. Laktatların son ürün ağırlığının % 2'si kadar ilavesi tavsiye edilmektedir. NaCl ile kombinasyonları laktat tuzunun etkin dozunu düşürmektedir. Laktat anyonunun antibotulinal ve antilisterial etkileri çeşitli ürünlerde gösterilmiştir (Shelef, 1994).

Laktatlar (sodyum, potasyum ve kalsiyum laktat) soğutulmuş ve işlenmiş etlerde, özellikle soğutulmuş et ürünlerinde bozulma etkeni ve patojenik bakterileri kontrol altına alabilmektedir. Et ve et ürünlerinin raf ömrü ile ilgili araştırmalarda laktik asit tuzları tek veya diğer organik asit tuzları ile kombine edilerek kullanılmaktadır.

Sodyum laktat'ın da dahil olduğu 7 doğal antimikrobiyal maddenin, model sistem asitlendirilmiş piliç etine inoküle edilen aerobik mezofilik bakteriler olan *E. coli*, *Brochotrix thermosphacta* ve *Lactobacillus alimentarius*'a karşı antibakteriyel etkisi incelenmiştir. İnoküle et modeli (mekaniksel olarak ayrılmış piliç etinden yapılan sosis hamuru) 22°C'de 2 haftalık depolama öncesi iç sıcaklığı 55°C'ye kadar, her

bakterinin son hücre konsantrasyonu 3 - 4 log₁₀ kob/g'a ulaşacak kadar pişirilmiştir. *E. coli* sayısı depolama sırasında düzenli bir azalma göstermiş, kontrol de dahil, tüm uygulamalarda depolama sonunda <1 log₁₀ kob/g (tespit seviyesinin altında) veya buna yakın çıkmıştır. *B. thermosphacta* sayısında en fazla düşüşü sodyum laktat sağlamıştır; bakteri sayısı 14 gün sonra kontrolden 4 log₁₀ daha düşük çıkmıştır (Lemay ve diğ., 2002).

Glass ve diğ. (2002) *L. monocytogenes*'in sodyum laktat ve sodyum diasetat ile inhibisyonunu, domuz eti, hindi eti ve sığır eti içeren et ürünlerinde ("wiener") ve sığır ve domuz eti içeren pişmiş et ürünlerinde ("bratwurst") değerlendirmişlerdir. Sodyum laktat ve sodyum diasetat ilave edilmiş ürünler, *L. monocytogenes* ile 10⁵ kob/paket düzeyinde yüzey inokülasyonuna tabi tutulmuşlardır. Normal ve vakum altında paketlenmişlerdir. "Wiener" tipi et ürünlerinde 60 gün süreyle 4,5°C'de, "bratwurst"lar 3 ve 7°C'de 84 gün depolanmıştır. "Wiener"leri ≤ % 6 laktata ve ≤ % 3 diasetata 5 sn daldırma işlemi patojen gelişimini kontrole göre geciktirmemiştir. Bu araştırmada, antimikrobiyallerin ürün formülasyonuna dahil edilmesi ile gösterdikleri antilisterial aktivite de değerlendirilmiştir. ≥ % 3 sodyum laktat seviyeleri ve ≥ % 1 laktat + ≥ % 0,1 diasetat kombinasyonları 4,5°C'de 60 gün depolanan wiener'lerde listerial gelişmeyi önlemiştir. Özetle, sodyum laktat ve sodyum diasetat'ın kür edilmiş ve tütsülenmiş bu ürünlerin formülasyonlarına ilave edilmeleri ve 7°C veya daha düşük sıcaklıkta depolanması *L. monocytogenes*'i inhibe ederek ilave bir güvenlik sağlamıştır.

Kuo ve Shu (2002) düşük yağlı Çin tipi sosis formülasyonuna ilave ettikleri trisodyum fosfat ve sodyum laktatın ürünün raf ömrü ve fizikokimyasal özelliklerine etkisini araştırmıştır. Bu amaçla sosisler % 0,2 potasyum sorbat (KS), % 3 sodyum laktat (NaL), % 0,2 trisodyum fosfat (TSP) ve kontrolü içerecek şekilde üretilmişlerdir. Kuru ve vakum paketli sosislerin 4°C'de 12 haftalık depolama periyodunda her 3 haftada bir örnekleme yapılarak pH, uçucu azot ve mikroorganizma yükleri gibi özellikleri izlenmiştir. TSP'li örnekler depolama sırasında en yüksek pH, uçucu azot ve mikrobiyal sayı gösterirken, NaL'li örnekler genelde en düşük bakteriyel sayılar (bakteriostatik etki) ve en düşük uçucu azot değerleri göstermiştir.

Mbandi ve Shelef (2001), 5 ve 10°C’de depolanacak steril kıymaya inoküle edilen 2 gıda patojeninin (*L. monocytogenes* ve *S. enteritidis*) sodyum laktat (NaL), sodyum asetat (NaA) ve sodyum diasetat (NaDA) veya bunların kombinasyonları ile inhibe edilmesini incelemişlerdir. Kıymaya % 1,8 NaL ilavesi her iki patojenin gelişme hızını düşürmüştür. NaL ve NaDA kombinasyonları arasında sinerji gözlenmiştir. % 2,5 NaL ve % 0,2 NaDA kombinasyonu 10°C’de 20 gün sonra *L. monocytogenes* için bakteriostatik, *S. enteritidis* için bakterisit etki göstermiştir. Listeriostatik etki 5°C’de % 1,8 NaL + % 0,1 NaDA ile meydana getirilirken, *S. enteritidis* sayıları 30 günlük soğutma sonrası < 10 hücre/g olmuştur. Bu çalışmada % 2,5 NaL ve % 0,2 NaDA kombinasyonunun soğutulan ve sıcaklığı yükselen tüketime hazır etlerin güvenliğine büyük katkı sağlayacağı beklentisi vurgulanmıştır.

Hollanda piyasasından 1996 ve 1997 yıllarında elde edilen 294 adet taze ve işlenmiş et ürününün % 3,5’unda verotoksin üreten *E. coli* O157:H7 tespit edilmiştir. “Tartaar” (% 10 yağlı sığır kıyması) ve mayonez soslu “tartaar” ile yapılan canlılık deneylerinde -20, 0, 5 ve 7°C’de 3 gün depolamada bu ürünlerde O157 VTEC suşunun canlılığı test edilmiştir. Buna göre, O157 VTEC düzeyleri 7 ve 15°C’de 5 gün sonra değişmeden kalmıştır. Soslu tartaar’a asetik asit (pH : 4’e kadar), % 1 ve 2 sodyum laktat ve laktoperoksidad - tiyosiyanat - H₂O₂ sistemi bileşenlerinin ilavesi, 7 ve 15°C’lik depolamada canlı *E. coli* O157:H7 sayılarında indirgenme ile sonuçlanmamıştır. Bundan hareketle, *E. coli* O157:H7 VTEC ile kontamine çiğ etin soğukta veya donmuş muhafazada bile tehlikeli olabileceği belirtilmiştir (Heuvelink ve diğ., 1999).

Hamburger yapımında kullanılan sığır kıymasına sodyum laktat ve starter kültür ilavesinin raf ömrüne etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, % 3 sodyum laktat ilavesinin 4°C’de 9 günlük depolamada Laktobasilleri artırırken, TBA sayısını düşürdüğü ve bakteriyel gelişmeyi inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. % 3 NaL içeren hamburgerler soğuk depolamanın 4 gününde en düşük pişme kaybı ve en iyi duyuşal özellikler göstermiştir (Walczyccka ve diğ., 1998).

Maca ve diğ. (1999) sodyum laktatın (NaL) pişmiş sığır budlarının mikrobiyolojik kalitesi, renk, koku gibi duyuşal özelliklerine etkisini incelemişlerdir. Tıraşlanan 1 / 4 budlar % 20 ağırlık kazancına kadar, son üründe ise % 0,5 NaCl, % 0,3 sodyum

tripolifosfat ve % 0, 2, 3 ve 4 NaL içerecek şekilde injekte edilmişlerdir. Vakumlu gevrekleştirme (tumbling) işlemi sonrasında budlar kendi salamuralarında 4°C'de 36 saat salamuraya yatırılmış, tekrar tumbling yapılarak pişirilmiş, soğutulmuş ve 0 - 16 °C'de 21 gün vakum paketlerde depolanmıştır. NaL, yüksek sıcaklık şartlarında bile pişmiş sığır etinin raf ömrü kalitesini artırarak üründe bakteriostatik, renk stabilize edici ve antioksidant fonksiyonu görmüştür. % 3 NaL seviyesinin optimum kullanım seviyesi olduğu düşünülmüştür.

Miller ve Acuff'un (1994) çalışmasında da % 1, 2, 3, 4 oranlarında NaL içeren pişirilmiş ¼ budlar dilimlenerek patojen bakterilerle aşılانmıştır. İnoküle et dilimleri 10°C'de 0, 7, 14, 21, 28 gün gibi sürelerde depolanmıştır. Genel olarak % 3 ve 4 NaL'lı örnekler kontrol ve % 2 NaL'lı rostolara göre daha sınırlı düzeyde *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 çoğalması göstermiştir.

Egbert ve diğ. (1992) ise düşük yağlı karragenan bazlı et köftelerinde potasyum laktat kullanımının (% 1 - 4) etkilerini incelemiştir. Karragenan bazlı köfteler katkısızlara göre daha iyi duyuşal özellikler (sululuk, yumuşaklık, yenebilirlik, ve et aroması) göstermiş, bakteriyel gelişme duyuşal özellikler etkilenmeden % 2 ve 3 potasyum laktat kullanımıyla düşürölmüştür.

Brewer ve diğ. (1995), % 15 yağlı domuz eti kıymasını tuz (% 0 - 3) ve/veya sodyum laktat (% 0-3) ile formöle ederek düşük ve yüksek başlangıç mikroorganizma yükü ile PVC ile kaplayarak 4°C'de 21 gün aerobik olarak depolamışlardır. Düşük başlangıç aerobik bakteri sayılı örnekler, renk ölçümünde kırmızılık için önemli bir tuz x sodyum laktat interaksyonu göstermiştir. Kırmızı renk % 2 ve 3 sodyum laktatlı örneklerde en iyi şekilde korunmuştur. Başlangıç pH'ları yüksek sodyum laktatlı ve düşük mikrobiyal yüklü örneklerde en iyi şekilde korunmuştur. % 3 sodyum laktatlı örnekler, en düşük aerobik bakteri yükünü göstermişlerdir.

Tan ve Shelef'in 2002'deki araştırmasında, yine taze domuz eti kıymasının soğuk (2°C'de 15 gün) ve donmuş (- 20°C'de 70 gün) muhafaza altında geçirdiğı kimyasal ve mikrobiyolojik değişimlere tuz (% 1 ve 2) ve laktatların (% 2) etkisi incelenmiştir. Soğutulmuş etin mikrobiyal stabilitesi laktatlarla artmış ve tuzla kombinasyonları da bozulmanın geciktirilmesinde laktatların tek başına kullanımından daha etkin

bulunmuştur. Laktat muamelesi yağın stabilitesini de artırmış ve TBARS (Tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri) değerleri kontrol ile benzer çıkmıştır. Tuz ise yağ oksidasyonunu artırmıştır. Etin kırmızı renk ölçüm değerleri kontrol dahil tüm muamelelerde 2°C’de 4 gün sonra hızla düşmüş ve 8 gün sonra da başlangıçtan % 50 - 70 daha düşük çıkmıştır. Sodyum ve potasyum laktat soğutulmuş domuz etinin mikrobiyal kalitesini renk ve yağ stabilitesini etkilemeksizin artırmıştır.

2.3.5 Greyfurt çekirdeği ekstraktı’nın antimikrobiyal etkisi

Greyfurt çekirdeği ekstraktı (GFSE: “Grapefruit Seed Extract”), greyfurt meyvesinin çekirdek ve pulpundan elde edilir. GFSE, doğal bir antimikrobiyal olup sıvı ve toz formda bulunur. Tıbbi ve diğer amaçlar yanında meyve - sebze ve etlerin dezenfeksiyonunda kullanım alanı bulmuştur. GFSE geniş spektrumlu bakterisit, fungusit, antiviral ve antiparazitik bileşiktir. İn vitro kullanımında GFSE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Legionella pneumoniae*, *Clostridium tetani*, *Diplococcus pneumoniae*, *Listeria*, *Cholera* gibi bir çok bakteri ve *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Candida* gibi patojenik küf tipi ve mayaları kuvvetle inhibe etmiştir. Herpes Simplex I, Influenza A, kızamık ve diğer hayvansal virüslere ve *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* ve *Chlamydia* gibi parazitlere etkindir (Url-3, Url-4, 2006).

GFSE bioflavonoidler ve polifenolik bileşiklerin bir kombinasyonundan oluşup, antimikrobiyal özelliklerinden sorumlu olan aktif quaternary amonyum bileşiğinin, bir “difenol hidroksibenzen kompleksi” olduğu ve aktivitesini de mikroorganizmaların sitoplazmik membranında gösterdiği düşünülmektedir. Sitoplazmik membranın bozulması ile aminoasitlerin alımı engellenir. Aynı zamanda düşük molekül ağırlıklı hücresel bileşenler sitoplazmik membrandan sızarlar. Çalışmalar, GFSE’nin hücresel solunumu da inhibe ettiğini göstermiştir. Sıvı GFSE, A.B.D.’de % 60 greyfurt ekstrakt materyali ve % 40 da bitkisel gliserin ile standardize edilmiştir (Url-3, Url-4, 2006).

Ticari olarak “citriI”, “citricidal”, “citromic” gibi ticari adları ile de bilinen GFSE, A.B.D. Federal Kod sisteminde “GRAS” statüsündedir. Su, alkol ve organik çözücülerde çözünür. Sıcaklık ve pH değişimlerinden etkilenmez. Citril - 200, % 60 GFSE içeren ticari bir üründür (Url-1, 2005).

GFSE ile yapılan araştırmalara bakacak olursak, bitkisel ürünlerin hasat sonrası kalite kayıplarının (küflenme, çürüme, kararma, çimlenme gibi) önlenmesine yönelik çalışmalara sıklıkla rastlanır. Bitkisel ürünleri hasat sonrası GFSE'nin sulu solüsyonlarına daldırma, sprey dezenfeksiyon veya antimikrobiyal paketleme uygulamaları gibi kullanım şekilleri vardır.

Yapılan bir çalışmada ticari GFSE solventle (kloroform) ekstrakte edilmiş, solvent daha sonra uçurularak kalan katı kısım HPLC, elektrosprey iyonizasyon MS, NMR spektroskopisi ve elemental analiz (proton kaynaklı X - ışınları emisyonu analizi) ile analiz edilmiştir. Ana bileşen, kozmetikte ve diğer güncel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan sentetik bir antimikrobiyal ajan olan “benzethonium chloride” olarak tanımlanmıştır. Bu bileşik, sıvı GFSE örneğinin % 8,03'üne karşılık gelirken, toz haldeki GFSE örneklerinde daha yüksek “benzethonium chloride” bulunmuştur (Takeoka ve diğ., 2001). Başka bir çalışmada yine ticari GFSE'nin ve greyfurt çekirdeğinin etanol ekstraktının bileşenleri HPLC ve LC/MS ile analiz edilmiş, ticari ürün kromatogramı 3 ana pik vermiş ve bunlardan ikisi “metil-p-hidroksibenzoat” ve “triclosan” olarak tanımlanmıştır (Sakamoto ve diğ., 1996).

Xu ve diğ.'nin (2007) çalışmasında GFSE'nin gıda kaynaklı patojen bakterilere etkisi in-vitro ve minimal işlenmiş sebzelerde test edilmiş, sonuçta *Salmonella* için MIC değeri 15 ppm iken *L. monocytogenes* için MIC değeri 64 ppm bulunmuştur.

2.4 Kanatlı Et Ürünleri Muhafazasında Modifiye Atmosfer Paketleme (MAP) Uygulamaları ve Avantajları

Gıdaların birçoğu nem kaybı veya alımı, oksijenle reaksiyon, bakteriler ve küfler gibi aerobik mikroorganizmaların gelişimi gibi nedenlerle açık havada hızla bozulur. Mikrobiyal gelişme gıdanın tekstür, renk, aroma ve besin değerinde değişimlerle sonuçlanır. Bu değişimler ise gıdayı lezzetsiz ve tüketimini de riskli hale getirir. Bu nedenlerle gıdaların modifiye atmosferde paketlenmesi, kalitelerini korurken kimyasal ve biyokimyasal bozulma reaksiyonlarını yavaşlatarak ve kimi zaman bozulma etmeni organizmaları engelleyerek raf ömrünü uzatabilir. Ancak MAP gıdaların kalite avantajları ve uzun raf ömrünü sağlamak için bozulabilir gıdaların soğuk zincir boyunca sıcaklık kontrolüne ve iyi hijyen uygulamalarına ihtiyaçları vardır.

Çiğ kanatlı etlerinde mikrobiyal gelişme (özellikle *Pseudomonas* ve *Achromobacter* türleri) raf ömrünü sınırlayan esas etkindir. Bu Gram(-) aerobik bozulma etmeni bakteriler CO₂ ile etkin olarak inhibe edilirler. Bu nedenle MAP’da % 20’yi aşan CO₂’nin dahil edilmesi ile çiğ kanatlılarda raf ömrü önemli oranda uzatılabilir. Kanatlı eti CO₂ tarafından inhibe edilmeyenlerin de dahil olduğu patojenik mikroorganizmaların gelişimi için iyi bir ortam sunduğundan önerilen soğutma sıcaklıkları, tedarik boyunca iyi hijyen ve işleme pratikleri kritik önem taşır ve tüketim öncesinde bu ürünlerin iyice pişirilmesi gerekir (Url-5, 2008).

Paket atmosferinin optimizasyonu gıda ürününe ait bazı iç faktörlerle (pH, su aktivitesi, yağ oranı, yağ tipi) ve seçilen paket tipinde gaz/ürün hacim oranı ile belirlenir. Gram-negatif bakteriler ve mayaların gelişmesi nedeniyle mikrobiyal bozulmaya hassas gıdalar, bu mikroorganizmaların gelişimleri CO₂ ile yavaşlatıldığı için CO₂ ile zenginleştirilen atmosfer ile paketlenmektedir (Devlieghere ve diğ., 2004).

Taze tavuk eti ve balık etinde *Salmonella enteritidis*’in canlılığı ve gelişmesi üzerinde vakum ve modifiye atmosferde ambalajlamanın etkisinin incelendiği bir çalışmada 3°C’de *Salmonella* canlı kalmakla birlikte gelişme göstermemiştir. 10°C’deki depolamada ise vakum paketlerde ve %100 N₂ ve %20 CO₂+%80 O₂ kombinasyonlu paketlerde *Salmonella* hızlı bir çoğalma göstermiştir. Atmosfer %100 CO₂ olduğunda da gelişme belirgin olarak görülmüştür (Nychas ve Tassou, 1996).

Nisin, laktik asit ve MAP paketlemenin kombine ve tekli antilisterial etkisinin incelendiği bir çalışmada aerobik örnekler 7, MAP örnekler 21 gün süreyle depolanmıştır. Aerobik örneklerde 500 ppm nisinin % 2 laktik asitle kombinasyonu ile *Listeria monocytogenes* inaktivasyonuna ulaşılmışken, MAP örneklerde laktik asit ilavesi ile popülasyonda 3,45 log₁₀ düzeyinde, nisinle kombinasyonunda ise bundan 0,5 log₁₀ fazla indirgenme sağlanmıştır (Lopez-Mendoza ve diğ., 2007).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Bakteri Kùltürleri

Kanatlı etlerinden sıklıkla izole edilen bir patojen bakteri olan *S. enteritidis* KUKEN 369 (SZH ; Nationalen Salmonella - Zentrale, Higienisches Institut, Almanya), *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *L. monocytogenes* SLCC 2375 4b TSA (Tryptic Soy Agar) yatık agarda 4°C’de, Mikrobank®’da (bakteri kùltürü depolama sistemi) ve gliserolde -18°C’de muhafaza edilmiştir. Bakteriler in-vitro deneme öncesinde TSA yatık agardan iki kez üst üste olmak üzere 35°C’de 18 saatlik süre ile TSA yatık agara tazeleme yapılarak kullanılmıştır.

Et deneylerinde gliserolde muhafaza edilen bakteriler deneme öncesinde steril 5 ml TSB-YE (Tryptic Soy Broth - Yeast Extract) a 50 µl ilave edilerek üst üste iki kez 35°C’de 18 saat tazelenmiştir. *Salmonella* ve *E. coli* için 18 saatlik kùltürler peptonlu suda 10⁷/ml ye kadar seyreltilerek, daha zayıf üreme gözlenen *Listeria*’da ise steril TSB-YE ile 1:1 veya 1:2 gibi seyreltilerek inokulum olarak kullanılmıştır. İnokulumun bakteri sayısı, TSA besiyeri ve dökme plak yöntemi ile 35°C’de 24 saat inkübasyon sonunda sayım yapılarak belirlenmiştir.

3.2 Antimikrobiyal Maddeler

İn-vitro denemelerde antimikrobiyal madde olarak Nisaplin (% 2,5 nisin, 10⁶ IU/g ; Danisco, Danimarka), Valisin (% 2,5 nisin, 10⁶ IU/g, Mayasan, İstanbul) % 50’lik sodyum laktat solusyonu(d:1,28 g/ml) (Merck, Almanya), greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE; Citril-200) (edible gliserin içinde % 60 saflıkta, Peyma-Chr.Hansen’s, İtalya), çelatlama ajanı di sodyum EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetikasit ; Merck, Almanya) temin edilerek nisin ve GFSE soğutucuda 4°C’de muhafaza edilmiştir. Konsantrasyon hesaplamalarında etken antimikrobiyal maddenin ticari ürün içerisindeki saflığı dikkate alınarak konsantrasyon hesaplaması yapılmıştır. Et denemelerinde tuz (NaCl) olarak sofr tuzu ve ışınl sterilize edilmiş sarımsak tozu (Arifoğlu Baharat ve Gıda San. Ltd. Şti., İstanbul) iç piyasadan temin edilerek

kullanılmıştır. Literatürde GFSE kimi zaman GSE olarak da geçmektedir fakat Grape Seed Extract (GSE)’tan ayırt edilmesi için GFSE de denmektedir.

3.3 Et ve Ambalaj Materyali

Modern yöntemlerle kesim yapan işletmeden alınan taze (kesim sonrası ilk 24 saat) piliç göğüs etleri aseptik - izolasyonlu ve soğuk şartlar altında bölümümüze getirilerek analize kadar geçen sürede 1,5 - 2,0 kg lık paketler halinde ambalajlanarak derin dondurucuda (-18°C) muhafaza edilmiştir. Analiz öncesinde soğutucuda 4°C’de çözündürülmüştür. Parçaları önceden deterjanlı su ile yıkayıp durulandıktan sonra sodyum hipokloritli (% 5’lik) su (15 ml/L ile 5 dak. + durulama) ile dezenfekte edilen ve kurutulan kıyma makinasında (Moulinex-Model HV8, Fransa) kıyma çekilmiştir (ayna delik çapı : 5 mm). Kıyma çekilmeden önce göğüs parça etlerin üzerlerine etil alkol püskürtülerek alevden geçirilmiştir. “Stomacher” torbası veya dezenfekte edilmiş (15 ml/L hipokloritli su ile 10 dak. + durulama) uygun boyutta (17cmx18cm) paketler içerisine 25 g lık birimler halinde tartılmış, muamele edilmek üzere hemen buzdolabına yerleştirilmiştir. Bu şekilde elde edilen tavuk kıymasının mikrobiyal yükünün $\sim 2 \log_{10}/g$ düzeyinde olduğu TSA’da sayım yapılarak belirlenmiştir.

Aerobik paketlemede ambalaj materyali olarak LDPE (kalınlık: 50 μm , oksijen geçirgenliği: 3800 cc/m².gün.atm, test koşulu: 23°C % 0 bağıl nem), MAP paketlemede ise PET/PE – EVOH - PE lamine film (kalınlık: 60 μm , oksijen geçirgenliği: 1,2 cc/m².gün.atm, test koşulu: 23°C % 0 bağıl nem) kullanılmıştır. Paketleme materyalleri Koroza Ambalaj San. ve Tic. A.Ş.(İstanbul)’den temin edilmiştir.

3.4 İn-vitro İnhibisyon Denemelerine Hazırlık Prosedürü

Antimikrobiyal madde olarak nisin, di sodyum EDTA ve greyfurt çekirdeği ekstraktının (GFSE;Citril-200) hemen deneme öncesi hazırlanan stok çözeltilerinden, sodyum laktat ise direkt olarak, TSB (Tryptic Soy Broth) (Acumedia, Maryland, USA) içeren deney tüplerine gerekli hacimde (≤ 1 ml) ilave edilmiştir. Antimikrobiyal madde kullanılmadığında körleri (nisin için steril su ile hazırlanan 0,02 N HCl, diğerleri için steril saf su) kullanılmıştır. TSB besiyeri, toplam hacim 10

ml'ye tamamlandığında formülasyonu karşılayacak derişimde hazırlanmıştır. Tepki Yüzey denemelerinde minimum pH olarak, % 1 laktik asitin TSB besiyerinde meydana getirdiğı pH : 3,44 seçilmiştir. NaL ve GFSE denemelerinde taze tavuk eti pH'sı olan pH: 6 seçilmiştir. Deney tüplerinde pH ayarlaması 1 N HCl ve 5 N NaOH ile yapılmıştır. Deney tüpleri inokulasyon öncesinde 121°C'de 15 dak. sterilize edilmiştir. İn-vitro deneyler incelenen her bakteri için ayrı deney setleri hazırlanarak yürütölmüştür.

3.5 İn-vitro Test Tüplerinde Bakteri Sayısının Standardizasyonu

Inokulumun hazırlığı amacıyla TSA yatık agarda 35°C'de 18 saat üst üste iki kez tazelenen költürden alınarak deney tüplerindeki bakteri sayısını standardize etmek amacıyla Mc Farland standardlarından (% 1'lik seyreltik BaCl₂ ve sülfirik asit H₂SO₄ çözeltilerinin farklı oranlardaki karışımları) yararlanılmıştır. Bu çözeltilerdeki farklı türbiditye (bulanıklık) düzeyleri peptonlu su içindeki bakteri popölasyonunun oluşturduğu (Yatık TSA'dan peptonlu suya aktararak hazırlanan) türbitide ile karşılaştırılarak bakteri sayısının tahmini yapılmıştır. Bakteri konsantrasyonu 10⁸ kob/ml tahminlenen tüpten 1 ml alınarak 9 ml peptonlu suya ilave edilerek 10⁷ kob/ml dilüsyonu hazırlanmış, steril besiyeri+antimikrobiyal içeren test tüplerine 0,1 ml (100 µl) ilave edilerek, 10 ml hacminde yaklaşık 5 log₁₀ kob/ml düzeyinde başlangıç bakteri sayısı sağlanmışır. İnokulumun bakteri sayısı, TSA besiyeri ve dökme plak yöntemi ile 35°C'de 24 saat inkübasyon sonunda sayım yapılarak belirlenmiştir.

3.6 İnokulasyon, İnkübyasyon Şartları ve Mikrobiyolojik Sayım

Farklı konsantrasyonlarda inhibitör madde (nisin ve/veya EDTA, sodyum laktat, greyfurt çekirdek ekstraktı;GFSE) içeren veya içermeyen (kör) deney tüplerindeki TSB ortamına 0,1 ml inokulasyon yapıldıktan sonra deney tüpleri etüvde 35°C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası ortamdaki bakteriyel gelişmenin durdurulması için deney tüpleri buzlu su içine alınarak soğutulmuş (10 dak.), analiz edilinceye kadar geçen süre içinde tüpler 4°C'de muhafaza edilmiştir. Bakteri sayımları dökme plak yöntemi ile TSA (Tryptic Soy Agar) (Acumedia, Maryland, A.B.D.) költür ortamı kullanılarak yapılmış, petri kutuları etüvde 35°C'de 24 saat

inkübe edilmiş ve sayımlar bu süre sonunda yapılmıştır. GFSE ile 1 saatlik inhibisyon deneylerinde inkübasyon işlemi 35°C'deki termostatl su banyosunda (Nüve, İstanbul, Türkiye) yapılmıştır.

3.7 Kıyma Ortamına Antimikrobiyal, İngredient (NaCl, Sarımsak tozu) İlavesi, İnokulasyon, Depolama Şartları ve Mikrobiyolojik Sayım

Antimikrobiyal maddelerin hemen deneme öncesinde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Valisin (nisin) steril su ile hazırlanan 0,02 N HCl içerisinde, GFSE stok çözeltisi ise steril su ile hazırlanmıştır ve 25 g'lık paketlere maksimum 1 ml ilave edilerek gerekli konsantrasyon sağlanmıştır. Antimikrobiyal ilave edilmediğinde ise kör (antimikrobiyalin içinde hazırlandığı sıvı, steril) kullanılmıştır.

Formulasyon denemesinde tavuk kıyması ile GFSE (6000 ppm), NaCl (% 2) ve sarımsak tozunun (% 2) 8 farklı kombinasyonu yine 25 g toplam ağırlık içinde hazırlanmıştır. Paketlere her bakteri için 0,25 ml (250 µl) inokulum ilave edilerek (25 g'da her bakteri yaklaşık 5 log₁₀ kob/g) ilave sonunda paketler silindir bir çubuk yardımı ile paket dışından iyice homojenize edilmiştir. Daha sonra ambalajlama makinasında (Multivac ambalajlama makinası, Sepp Haggenmüller GmbH & Co. KG, Wolfertschwenden, Almanya) uygun atmosferde (aerobik: % 21 O₂+% 79 N₂/modifiye atmosfer: %70 CO₂+% 30 N₂) ambalajlanarak kapatılmıştır ve 4 veya 10°C'de soğutmalı inkübatör (Nüve, ES 110 soğutmalı inkübatör, İstanbul, Türkiye) içerisinde 6 güne kadar sürelerde depolanmıştır.

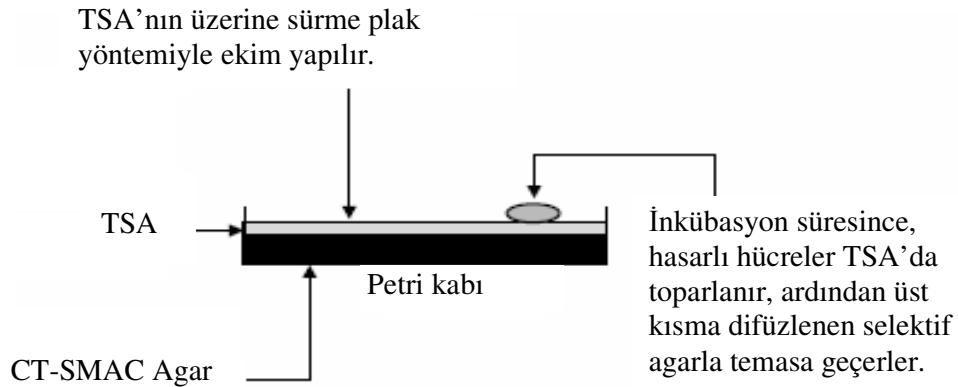
Depolamanın analiz periyotlarında paket atmosfer bileşimi ölçülmüştür. Hemen soğutucuya alınan paketlerde mikrobiyolojik sayımlara geçilmiştir (Şekil 3.1). Patojen bakteri sayımları thin agar layer (TAL) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Seçici besiyerleri, katkıları ve TSA Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir.



Şekil 3.1: Aerobik ve MAP paketlenmiş valisin ilaveli kıyma örnekleri.

Thin Agar Layer (İnce Agar Tabakası - TAL) yönteminde 14 + 14 ml [alt tabakada seçici besiyeri : Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar, Cefixime-Tellurite Sorbitol McConkey (SMAC - CT) Agar veya Oxford Listeria Selective Agar, 14 ml + üst tabakada TSA, 14 ml] şeklinde 2 tabaka halinde hazırlanan besiyerine sürme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır (Şekil 3.2). Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı (total plate count) TSA agar kullanılarak dökme plak yöntemi ile yapılmıştır. Petri kutularında sayım 35°C’de 24 saat inkübasyon sonunda yapılmıştır.

Tipik *Salmonella enteritidis* kolonileri XLD agar da koyu gri koloniler, *E. coli* O157:H7 kolonileri SMAC - CT agarda renksiz koloniler, *Listeria monocytogenes* kolonileri ise Oxford Listeria agar da ise siyahımsı yeşil, siyah zonlu kolonilerdir. Besiyerlerinde renk ve şekil bakımından tipik koloniler, saf bakteri kültürlerinin dilüsyon sıvısıyla seyreltilerek TAL’a ekimi ve inkübasyonu ile üremeleri sonucunda kontrol olarak kullanımıyla tanımlanmıştır.



Şekil 3.2: İnce agar tabakası (TAL) uygulamasının şematik gösterimi (Wu ve Fung, 2001).

3.8 Paket Atmosfer Bileşimi Ölçümü:

Örneklerin analiz periyotlarında gaz ölçüm cihazı ile (PBI Dansensor A/S, Model: CheckMate 9900 O₂/CO₂, Danimarka) aerobik ve MAP paket içi atmosfer bileşimi (% O₂ ve CO₂) ölçülmüştür.

3.9 İstatistik Analizler

Deneme bulgularının istatistik analizleri için “Minitab® Release 12.2 for Windows” (Microsoft, A.B.D.) bilgisayar programı kullanılmıştır. Veriler bu programa aktararak genel lineer modelleme yöntemi ile varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. İn vitro ve et sistemindeki deney desenleri, faktörler ve seviyeleri ile ölçülen parametreler Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge.3.1: İn vitro deney desenleri, faktörler ve seviyeleri ile ölçülen parametreler.

Deneme	Deney deseni	Faktörler	Faktör seviyesi	Ölçülen parametre
Nisin, 24 saat	Central Composite Design, Tepki-Yüzey $\alpha=1,414$ merkez nokta:5 örnek:13	Nisin (ppm)	0 73 250 427 500	Test bakteri sayısı (log kob/ml)
		pH	3,44 3,96 5,22 6,48 7,00	
NaL, 24 saat	Tam Tesadüfi Desen	NaL (% w/v)	0 2 4	Test bakteri sayısı (log kob/ml)
GFSE, 1 saat	Tam Tesadüfi Desen	GFSE (ppm)	0 30 60 150 300	Test bakteri sayısı (log kob/ml)
		Süre (dak.)	0,5 10 20 40 60	
GFSE, 24 saat	Tam Tesadüfi Desen	GFSE (ppm)	0 30 60 150 300	Test bakteri sayısı (log kob/ml)

Çizelge.3.2: Tavuk kıyması ve formülasyonlarında deney desenleri, faktörler ve seviyeleri ile ölçülen parametreler.

Deneme	Deney deseni	Faktörler	Faktör seviyesi	Ölçülen parametre
Tavuk kıyması,GFSE, 4°C	Tam Tesadüfi Desen	GFSE (ppm)	0 300 1000 2000	Toplam ve test bakteri sayısı (log ₁₀ kob/g)
		Süre (gün)	0 3 6 (<i>E.coli</i> için 0 ve 3 gün)	
Tavuk kıyması,GFSE, 10°C	Tam Tesadüfi Desen	GFSE (ppm)	0 3000 6000	Toplam ve test bakteri sayısı (log ₁₀ kob/g)
		Paket	Aerobik MAP	
		Süre (gün)	0 3 6	
Formülasyon, 10°C	Tam Tesadüfi Desen	GFSE (ppm)	0 6000	Test bakteri sayısı (log ₁₀ kob/g)
		NaCl (% w/w)	0 2	
		Sarımsak tozu (% w/w)	0 2	
		Paket	Aerobik MAP	
		Süre (gün)	0 3 6	
Tavuk kıyması,GFSE, 4°C	Tam Tesadüfi Desen	GFSE (ppm)	0 6000	Test bakteri sayısı (log ₁₀ kob/g)
		Paket	Aerobik MAP	
		Süre (gün)	1 3 6	
Tavuk kıyması, Nisin,4°C	Tam Tesadüfi Desen	Nisin (ppm)	0 73 250	Test bakteri (<i>L.monocytogenes</i>) sayısı (log kob/g)
		Paket	Aerobik MAP	
		Süre (gün)	1 3 6	

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İn-Vitro Deneme Bulguları

4.1.1 Nisinin patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri

Farklı pH düzeyleri (3,44 - 7,00) ve nisin konsantrasyonlarının (0 - 500 ppm) *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 üzerindeki etkileri EDTA varlığında (20 mM) “Central Composite Design” kullanılarak **Tepki Yüzey Yöntemi** ile incelenmiştir. *L. monocytogenes* ile yürütülen çalışmada ise deney koşulları aynı kalmış ancak besiyerine EDTA ilave edilmemiştir. Denemeler, TSB besiyeri ortamında 35°C’de 24 saatlik inkübasyonla gerçekleştirilmiştir.

İki faktörlü ikinci dereceden (quadratic equation) denklemler model kullanılmıştır. Bakteri sayısı (y) = log₁₀ (kob/ml) için tahminlenen regresyon katsayıları:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1^2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_1 x_2 \quad (4.1)$$

x₁ = nisin (ppm)

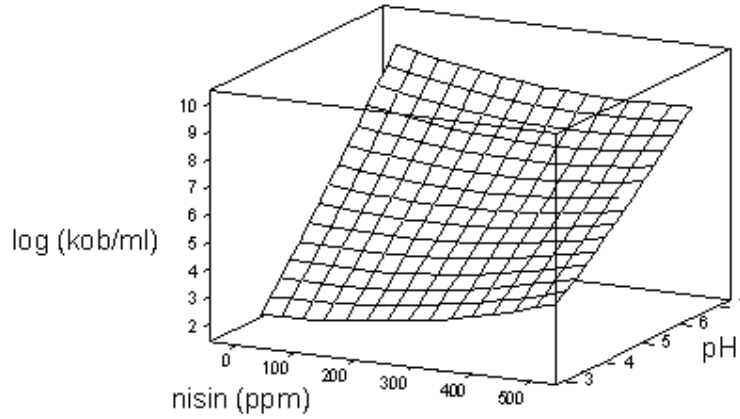
x₂ = pH

4.1.1.1 Nisinin *S. enteritidis* üzerinde antimikrobiyal etkisi

Örneklerdeki başlangıç *S. enteritidis* sayısı 5,58 log₁₀ kob/ml olarak bulunmuş, sonuçlar Şekil 4.1 ve Ek Çizelge A.1’de verilmiştir. Deney sonunda elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları ve regresyon katsayıları Ek Çizelge A.2 ve Çizelge A.3’de verilmiştir. Merkez noktada (pH:5,22 ve 250 ppm nisin) başlangıç bakteri sayısında önemli bir değişiklik gözlenmemiş, ortalama 5,27 log₁₀ kob/ml olarak bulunmuştur. Besiyerinde pH:7,0 değerinde ise 250 ppm nisin varlığında bakteri sayısında 2,71 log₁₀ düzeyinde bir artış belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada tek başına 20 mM EDTA, 5,22 pH değerinde bakteristatik etkide bulunmuştur. Dolayısı ile pH:5,22’de 250 ppm nisin varlığında gözlenen bakteristatik etkinin EDTA’dan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Verilerin istatistik analizi sonucunda modelde uygunsuzluk (“lack of fit”) değeri p<0,1 (anlamlı) çıkmıştır (p=0,072). Veriler modeli fit etmemektedir. Bu durumda

modelde eksik parametre kullanımı ile transformasyon yapılmıştır. Ek Çizelge A.1'deki 7,85 $\log_{10}$ verisi kaldırılarak yeniden analiz edildiğinde elde edilen değerler Çizelge 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: EDTA (20 mM) varlığında nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda *S. enteritidis* gelişimi üzerine etkisi.

Çizelge 4.1: *S. enteritidis*'in nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Regresyon	5	31,8490	6,3698	414,90	0,000
Lineer	2	30,8248	13,2296	861,72	0,000
Kare	2	0,3320	0,0847	5,52	0,044
İnteraksiyon	1	0,6922	0,6922	45,09	0,001
Rezidü hata	6	0,0921	0,0154		
Uygunsuzluk	2	0,0198	0,0099	0,55	0,616
Salt hata	4	0,0723	0,0181		
Toplam	11	31,9411			

Çizelge.4.2: *S. enteritidis*'in nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası regresyon katsayıları ve P değerleri.

	Regresyon Katsayısı	Standart Hata	T	P
Sabit	5,2740	0,05541	95,177	0,000
Nisin	0,0315	0,05058	0,622	0,557
pH	2,0409	0,05058	40,347	0,000
Nisin*Nisin	0,1612	0,04865	3,314	0,016
pH*pH	0,0412	0,04865	0,848	0,429
Nisin*pH	-0,5370	0,07998	-6,715	0,001

S = 0,1239 R-Sq = 99,7% R-Sq(adj) = 99,5%

Eksik parametre ile verilerin ANOVA varyans analizinde nisin konsantrasyonu bakteri inhibisyonunda önemli değilken ($p>0,05$), pH önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

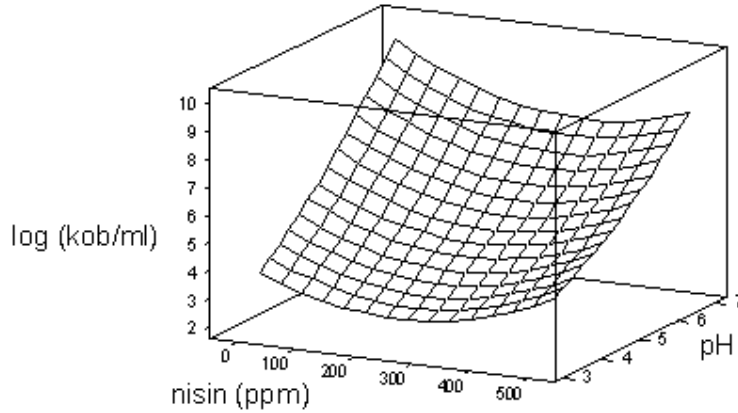
S. enteritidis sayısı ($\log_{10}$ kob/ml) için aşağıda verilen 2. dereceden eşitlik elde edilmiştir.

$$y = 5,27 + 0,031\text{nisin} + 2,04\text{pH} + 0,161(\text{nisin})^2 + 0,041(\text{pH})^2 - 0,537(\text{nisin} \times \text{pH}) \quad (4.1a)$$

Nisin ve pH interaksyonu önemlidir (Çizelge 4.2). Besiyeri pH'sı 5,22'nin üstünde iken (6,48 ve 7,0) 20mM EDTA+250 ppm nisinle düşük pH'da gözlenen bakteriostatik etki açıkça ortadan kalkmaktadır (Ek Çizelge A.1). Nisinin bakteri sayısı üzerindeki lineer olmayan etkisi önemli bulunmuştur.

4.1.1.2 Nisinin *E. coli* O157:H7 üzerinde antimikrobiyal etkisi

Örneklerdeki başlangıç bakteri sayısı 5,59 $\log_{10}$ kob/ml olarak bulunmuş, sonuçlar Şekil 4.2 ve Ek Çizelge A.4'de verilmiştir. Deneme sonunda elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları ve regresyon katsayıları Ek Çizelge A.5 ve Çizelge A.6'da verilmiştir. Bu denemede merkez noktada (pH 5,22 ve 250 ppm nisin) ortalama 0,93 $\log_{10}$ düzeyinde indirgenme meydana gelmiştir. Besiyerinde pH:7,0 olduğunda ise 250 ppm nisin varlığında bakteri sayısında yaklaşık 2 $\log_{10}$ artış kaydedilmiştir.



Şekil 4.2: EDTA (20 mM) varlığında nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerine etkisi.

Verilerin istatistik analizi sonucunda modelde uygunsuzluk ("lack of fit") değeri $p<0,05$ (anlamlı) çıkmıştır ($p=0,008$). Veriler modeli fit etmemektedir. Bu durumda modelde eksik parametre kullanımı ile transformasyon yapılmıştır. Ek Çizelge

A.4'deki 1,0 log₁₀ verisi kaldırılarak yeniden analiz edildiğinde elde edilen değerler Çizelge 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: *E. coli* O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Regresyon	5	16,4781	3,2956	10,12	0,007
Lineer	2	11,1389	2,8914	8,88	0,016
Kare	2	5,1586	2,5793	7,92	0,021
İnteraksiyon	1	0,1806	0,1806	0,55	0,485
Rezidü hata	6	1,9545	0,3258		
Uygunsuzluk	2	1,4019	0,7010	5,07	0,080
Salt hata	4	0,5526	0,1381		
Toplam	11	18,4326			

Çizelge.4.4: *E. coli* O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait verilerin transformasyonu sonrası regresyon katsayıları ve P değerleri.

	Regresyon Katsayısı	Standart Hata	T	P
Sabit	4,6600	0,2552	18,257	0,000
Nisin	-0,1766	0,2018	-0,875	0,415
pH	1,0737	0,2605	4,121	0,006
Nisin*Nisin	0,3753	0,2241	1,675	0,145
pH*pH	0,9715	0,2781	3,493	0,013
Nisin*pH	-0,2125	0,2854	-0,745	0,485

S = 0,5707 R-Sq = 89,4% R-Sq(adj) = 80,6%

Eksik parametre ile verilerin ANOVA varyans analizinde nisin konsantrasyonu bakteri inhibisyonunda önemli değilken (p>0,05) pH'nın lineer ve lineer olmayan etkileri önemli (p<0,05) bulunmuştur.

E. coli O157:H7 sayısı (log₁₀ kob/ml) için aşağıda verilen 2. dereceden eşitlik elde edilmiştir:

$$y = 4,66 - 0,176\text{nisin} + 1,07\text{pH} + 0,37(\text{nisin})^2 + 0,97(\text{pH})^2 - 0,21(\text{nisin} \times \text{pH}) \quad (4.1b)$$

Cutter ve Siragusa (1995) tarafından *E. coli* O157:H7 ve *S. typhimurium* ile yapılan bir çalışmada 50 ppm nisinin değişik antimikrobiyallerle kombinasyonunun etkileri tamponlanmış (MOPS: 3 - [N-morfolino] propansülfonik asit veya PBS: Fosfat-tamponlanmış tuz) ortamda incelenmiş, *Salmonella* sayısı üzerinde ilk bir saatte en fazla azalmanın (4,53 log₁₀) 37°C'de ortamda 50 ppm nisin ve 50 mM EDTA'nın

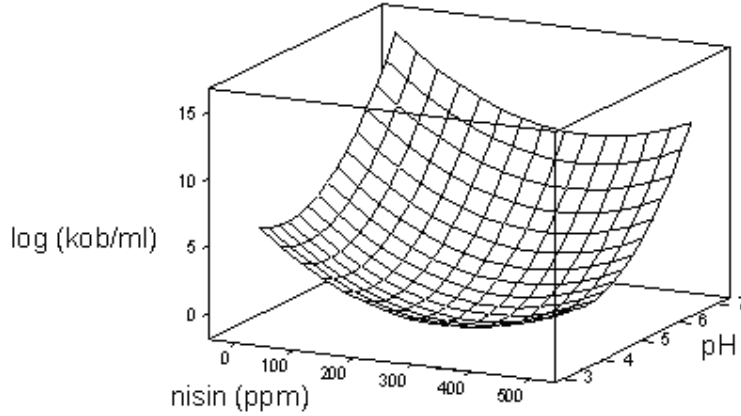
birlikte kullanıldığı (pH:7,0) koşulda ortaya çıktığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise pH 7,0'de 250 ppm nisin 20 mM EDTA ile kombinasyonu bakteri gelişmesini etkilememiştir. Ancak bu çalışmada test ortamı farklı (TSB) ve EDTA konsantrasyonu daha düşük olup, etki 24 saat sonunda belirlenmiştir. Bu durumda başlangıçta hasar görmüş hücrelerin direnç geliştirerek gelişme göstermesi olasıdır.

Boziaris ve Adams (1999) tarafından sıvı besiyerinde değişik çelatlayıcılar ve farklı nisin konsantrasyonlarının bazı Gram(-) bakteriler üzerindeki etkinliğini belirlemek için yapılan bir çalışmada pH: 6,5'da 30°C'de kullanılan çelatlayıcılar arasında en fazla inhibisyon 10 mM EDTA ile sağlanmıştır. Bu çalışmada, 100 IU/ml nisin ilavesinde dahi *E. coli* tamamen inhibe olmuştur. Ancak besiyerinde sadece 10 mM EDTA bulunduğunda bakteride üreme gözlenmiştir. Nisin üreten *L. lactis*'in ilave edildiği fermente brotlarda ise doğal pH değerinde (pH: 4,0) Gram(-)'lerde herhangi bir inhibisyon görülmemiştir. Bizim çalışmamızda ise nisin pH: 6,48'de EDTA varlığında Gram(-) test organizmalarının gelişmeleri üzerinde inhibitör etki göstermemiştir. Bu konuda yapılan değerlendirmelerde değişik suşların nisine duyarlılıkta fark yaratabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda 5,22 pH'nın *Salmonella* gelişimine etkisini EDTA olmadan belirlemek amacıyla ortama 5,6 log₁₀ bakteri inokule edilerek yapılan ilave denemelerde 24 saat sonunda bakteri sayısında 3,3 log₁₀ artış görülmüştür. Ancak aynı koşullarda EDTA (20 mM) varlığında bir artış belirlenmemiştir. Gill ve Holley (2003) tarafından yapılan çalışmada ortamda EDTA için 24°C'de 60 saat inkübasyonla pH: 6,0'da saptanan MIC değerleri *E. coli* ve *S. typhimurium*'da sırasıyla 1000 ppm ve > 2000 ppm olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda 20 mM EDTA (7445 ppm) pH 5,22'de Gram(-) bakterilere bakteriyostatik etkili bulunmuştur.

4.1.1.3 Nisinin *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etkisi

TSB besiyeri ortamında değişik pH (3,44-7,0) ve nisin (0-500 ppm) konsantrasyonunun *L. monocytogenes* gelişmesine etkisi Şekil 4.3 ve Ek Çizelge A.7'de gösterilmiştir. Deney sonunda elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları ve regresyon katsayıları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.3: Nisin konsantrasyonu ve pH'nın 35°C'de 24 saat sonunda *L. monocytogenes* gelişimi üzerine etkisi.

Bakteri inaktivasyonunda farklı nisin konsantrasyonu ve pH'nın bakteri sayısına etkisi ANOVA varyans analizi ile istatistiksel olarak analiz edildiğinde pH ve nisin konsantrasyonunun etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Nisinin besiyerine 73 - 500 ppm ilavesinin 3,44 - 5,22 pH değerleri arasında *L. monocytogenes* üzerinde kuvvetli bakterisit etki gösterdiği görülmüştür. Besiyerinde pH'nın 5,22 üzerindeki değerlerinde (6,48 ve 7,0) bakteri gelişimi nisinden etkilenmemiş ve üreme gözlenmiştir (yaklaşık 3,5 log₁₀ artış).

Çizelge 4.5: *L. monocytogenes*'in nisinle inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Regresyon	5	145,090	29,0179	13,87	0,002
Lineer	2	100,673	50,3367	24,06	0,001
Kare	2	44,395	22,1976	10,61	0,008
İnteraksiyon	1	0,021	0,0210	0,01	0,923
Rezidü hata	7	14,645	2,0922		
Uygunsuzluk	3	14,645	4,8817	*	*
Salt hata	4	0,000	0,0000		
Toplam	12	159,735			

*Merkez noktada (5) varyans olmadığından analizi yapılamadı.

Çizelge 4.6: *L. monocytogenes*'in nisinle inhibisyon denemesine ait regresyon katsayıları ve P değerleri.

	Regresyon Katsayısı	Standart Hata	T	P
Sabit	1,000	0,6469	1,546	0,166
Nisin	-1,327	0,5114	-2,594	0,036
pH	3,290	0,5114	6,433	0,000
Nisin*Nisin	1,826	0,5484	3,330	0,013
pH*pH	1,969	0,5484	3,590	0,009
Nisin*pH	-0,073	0,7232	-0,100	0,923

S = 1,446 R-Sq = 90,8% R-Sq(adj) = 84,3%

L. monocytogenes sayısı ($\log_{10}$ kob/ml) için aşağıda verilen 2. dereceden eşitlik elde edilmiştir:

$$y = 1 - 1,33\text{nisin} + 3,29\text{pH} + 1,83(\text{nisin})^2 + 1,97(\text{pH})^2 - 0,07(\text{nisin} \times \text{pH}) \quad (4.1c)$$

Boziaris ve Nychas (2006) tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde, sıcaklık, pH ve su aktivitesinin besiyerinde 3×10^5 kob/ml düzeyindeki *L. monocytogenes*'in gelişimindeki etkisini araştırdıkları çalışmada ise, 25 - 35°C'de 100 IU/ml nisin varlığında gelişme için minimum pH:5,20 ve minimum su aktivitesi 0,967 olarak belirlenmiştir.

Önceki çalışmalarda gösterildiği gibi nisin antimikrobiyal olarak en çok laktik asit bakterilerine ve diğer Gram(+) bakterilere etkilidir. Gill ve Holley'in (2003) çalışmasında pH: 6,0'da 24°C'de 60 saat inkübasyon sonunda *L. monocytogenes* için Chrisin (% 2,5 saf nisin) ile MIC değeri 250 ppm (6,25 ppm nisin) bulunmuştur. Bizim çalışmamızda 6,48 pH'da 73 ppm nisin *Listeria*'da inhibisyon meydana getirmemiştir, ancak iki çalışma arasında inkübasyon süre ve sıcaklıkları farklıdır.

Sivarooban ve diğ. (2007) tarafından yapılan çalışmada da bulgularımıza benzer şekilde 6400 IU/ml nisin, TSBYE (Tryptic Soy Broth-Yeast Extract)'ye $6,7 \log_{10}$ düzeyinde inokule edilen *L. monocytogenes*'e 37°C'de 72 saatlik inkübasyon sonunda herhangi bir inhibitör etkide bulunmamıştır ki, bizim çalışmamızda da pH'nın 5,22'nin üzerinde olduğu, TSB besiyerinin doğal pH'sına (pH:7,3) yakın değerlerde inhibisyon gözlenmemiştir.

Boziaris ve diğ.'nin (2007) *L. monocytogenes*'in in-vitro ortamda farklı a_w ve pH değerlerinde nisinle indirgenmesini inceledikleri çalışmada artan tuz ve nisin konsantrasyonu ve düşük pH değerlerinin bakteride daha yavaş gelişme hızı ve lag

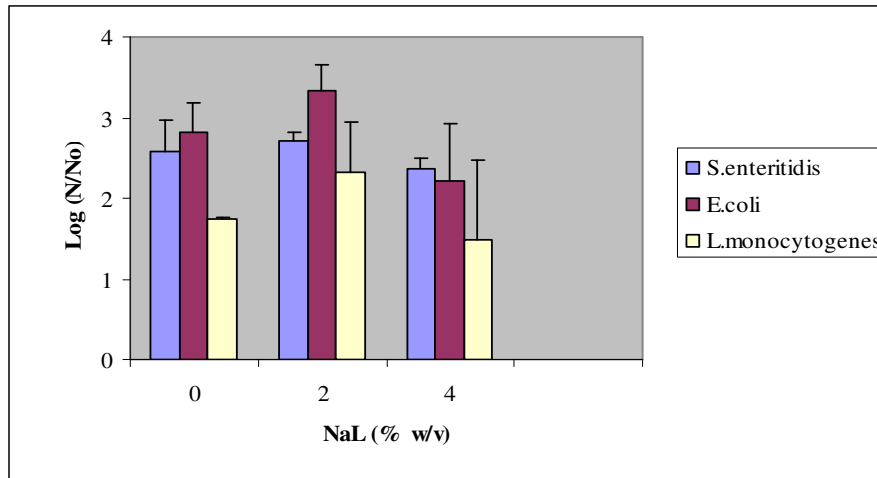
fazının uzamasıyla sonuçlandığını göstermişlerdir. pH: 4,50 olduğunda çoğalma gözlenmezken, 100 IU/ml nisin varlığında bakteri inaktive olmuştur. Bizim çalışmamızda ise 3,96 pH değerinde, 73 ppm nisin ile başlangıç düzeyi 5,04 log₁₀ olan bakteri tamamen inaktive olmuştur. Nisinin antimikrobiyal etkinliğinde pH önemli rol almıştır. Düşük pH değerlerinde nisinin çözünürlüğü, stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi artmaktadır (Delves-Broughton, 1987)

Bakteriosinlerin hassas mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi, büyük ölçüde pH, hücre konsantrasyonu, mikroorganizma cins ve türleri ile ortamın lipid içeriği, proteolitik enzimler ve sıvı/katı sistem gibi faktörlerle büyük ölçüde etkilenir. Ayrıca ortam sıcaklığı ve bakteriosinlere direnç önemlidir (Abee ve diğ.,1995).

4.1.2 Sodyum laktat (NaL)'ın patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri

Farklı iki NaL düzeyinin (% 2,0 ve 4,0) TSB besiyeri ortamında (pH : 6,0) *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, TSB'de 35°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda elde edilen sayım sonuçları istatistiki olarak ANOVA varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Deney bulguları toplu biçimde Şekil 4.4 ve Ek Çizelge A.8'de verilmiştir.

İstatistik analiz sonuçlarına göre, NaL her 3 patojen bakteri için de % 2 ve 4 oranında kullanıldığında bakterinin besiyerinde inhibisyonunda önemli bir etkide bulunmamıştır (Ek Çizelge A.9-A.11). Konsantrasyonlar arasındaki fark da önemli değildir (p>0,05).



Şekil 4.4: Farklı sodyum laktat (NaL) konsantrasyonlarında 35°C'de 24 saat sonunda test organizmaları sayılarında değişim.

Ortamda % 2 ve 4 oranında NaL varlığında *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 veya *L. monocytogenes* sayısında önemli bir indirgenme gözlenmemiştir. Gram(-) bakterilerin organik asit ve tuzlarına karşı Gram(+)’lerden daha hassas oldukları bildirilirken (Mbandi ve Shelef, 2001), sodyum laktatın spesifik inhibisyonunun Gram(+)’lerde daha fazla olduğu bildirilmiştir (Houtsma ve diğ., 1993). Sodyum laktat besiyerine ilave edildiğinde laktik asit gibi pH değişikliği yaratmamaktadır, fakat sıvı ortamda oluşan laktat anyonunun spesifik antimikrobiyal etkisi bilinmektedir. *Bacillus cereus*’un değişik sıcaklık ve pH şartlarında, farklı NaCl ve NaL konsantrasyonlarındaki davranışının incelendiği bir araştırmada, sodyum laktatın antimikrobiyal aktivitesinin pH’dan büyük ölçüde etkilendiği belirlenmiştir. Sodyum laktatın antimikrobiyal aktivitesi hem lag fazı süresini uzatarak hem de çoğalma hızını düşürerek gerçekleşmiştir (Ölmez-Kaptan, 2004).

Houtsma ve diğ.’nin (1993) et ürünlerinde bulunabilen çeşitli patojenik ve bozulma etmeni bakterilerin 10^5 kob/ml düzeylerinin NaL ile MIC (gelişmenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon) değerlerini araştırdığı çalışmada, *S. enteritidis* PT1 için NaL 714 mM (% 8 w/v) iken *L. monocytogenes* B için 804 mM (% 9 w/v) bulunmuştur. Bu çalışmadaki inkübasyon sıcaklık ve süresi 20°C ve 7 gündür.

Neetoo ve diğ.’nin (2008) çalışmasında 12 farklı *L. monocytogenes* suşu için organik asit tuzları ile yapılan MIC çalışmasında sodyum laktat için değerler % 4,60 ile 5,60 arasında bulunmuştur. Tütsülenmiş vakum paketli somon ezmesinin 4°C’deki depolamasında ise *Listeria* kontrolü en etkin olarak % 0,25 sodyum diasetat (SD) ve % 2,4 NaL + % 0,125 SD formülasyonları ile sağlanmıştır.

Wit ve Rombouts (1990) nötral besiyerine % 5 (w/w) sodyum laktat ilave ederek patojen ve bazı laktik asit bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak laktik asit bakterilerinde, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium*’da bu etki gözlenirse de *E. coli*’nin gelişme hızı bileşikten hiç etkilenmemiştir. Bu çalışmada bulgular farklı bakterilerin sodyum laktata karşı farklı cevaplar verdiğini göstermiştir. Nisbeten yüksek pH değerlerinde, laktik asitle artırılan hücresel membran geçirgenliğinin, nötral besiyerinde gözlemlenen sodyum laktatın antimikrobiyal etkinliğini anlamada yardımcı olabileceği belirtilmiştir. Sodyum laktatın antimikrobiyal etkisini gelişme için optimum olan sıcaklıkların altındaki soğuk depolama sıcaklıkları da artırmıştır.

Miller ve Acuff'un (1994) çalışmasında da % 1- 4 oranlarında NaL içeren pişirilmiş tavuk eti dilimlenerek patojen bakterilerle aşılanmıştır. İnoküle et dilimleri 10°C'de 0, 7, 14, 21, 28 gün gibi sürelerde depolanmıştır. Genel olarak % 3 ve 4 NaL'lı örneklerde kontrol ve % 2 NaL'lı örneklere kıyasla daha sınırlı düzeyde *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 çoğalması göstermiştir.

Aynı su aktivitesinde mikroorganizmalar sodyum laktat ile sodyum klorürden daha fazla inhibe olmuş ve bu etki ise laktat iyonuna bağlanmıştır (Koos, 1992). Ancak konsantrasyon, ortamın oksijen mevcudiyeti ve sıcaklık da mikrobiyal inhibisyonunda etkili faktörlerdir.

Laktatları içeren (%3) pişirilmiş karaciğer sosisinde 5 ve 20°C'lerde depolama sırasında inokule edilen patojen bakterilerin (*E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* ve *L. monocytogenes*) davranışı incelenmiş, ısıl işlemin laktatların antimikrobiyal etkisini artırdığı belirtilmiştir. Kalsiyum laktat yanında diğer kalsiyum tuzları da denenmiş, laktatın birincil antimikrobiyal faktör olduğu belirlenmiştir (Shelef ve Potluri, 1995).

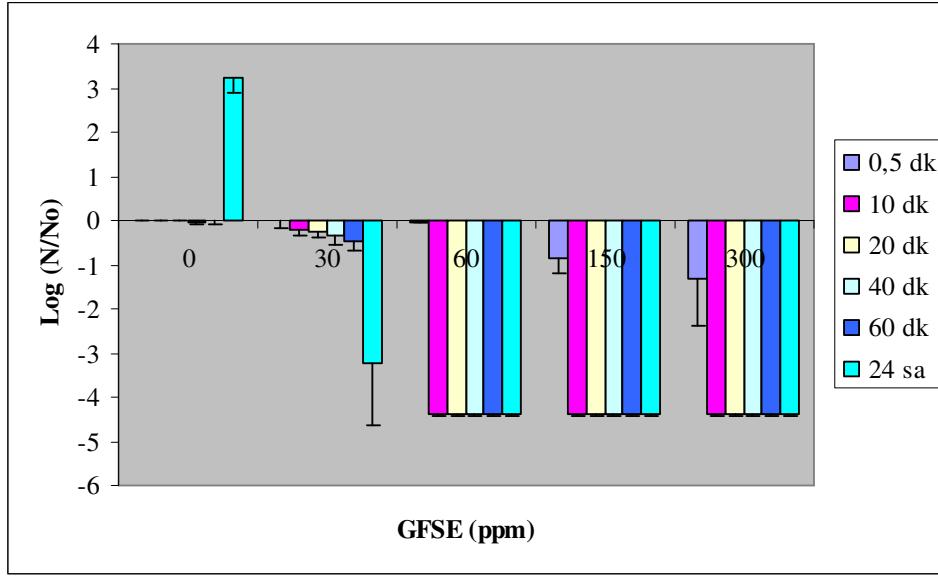
Sodyum laktat en çok ham, sosis ve ezmeler gibi pişirilmiş et ürünlerinde soğuk depolamayı uzatmak üzere kullanılırlar ve bu ürünlerde bozulma etmeni flora psikrotrofik laktik asit bakterilerinden oluşur. Sodyum laktatın özellikle soğuk depolamaya maruz kalan bu bakterilerin gelişimini inhibe ettiği bu ürünlerin raf ömrünü 1 veya 2 hafta artırdığı görülmüştür (Wit ve Rombouts, 1990).

4.1.3 Greyfurt çekirdek ekstraktı (Grapefruit Seed Extract:GFSE) kullanımının patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkileri

Geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri ile son yıllarda doğal antimikrobiyal madde olarak ilgi çeken greyfurt çekirdek ekstraktının (GFSE) ön denemede besiyerine 300, 600 ve 900 ppm (saf GFSE) ilavesinin pH: 6,0'da 35°C'de 24 saat inkübasyon sonunda 5 log₁₀ kob/ml düzeyindeki her 3 bakteriye bakterisit etkisi (1 log₁₀ kob/ml ye düşüş) gözlemlendiği için sonraki denemelerde 300 ppm maksimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir. GFSE ile yürütülen in-vitro denemeler, her patojen bakteri için 1 saat ve 24 saat denemesi olmak üzere aynı şartlardaki iki deney seti ile gerçekleştirilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı olup, bulgu ve değerlendirmeler aşağıda verilmiştir.

4.1.3.1 GFSE (Citril - 200)'nin *S. enteritidis* üzerinde antimikrobiyal etkileri

GFSE'nin 300 ppm konsantrasyonunda bakterisit etki gözlemlendiği için daha düşük konsantrasyonlarda GFSE'nin (30 - 300 ppm) ilk bir saatte ve 24 saat sonundaki (Şekil 4.5) *S. enteritidis* gelişimine etkisine tekrarlı olarak bakılmıştır (35°C; pH: 6,0). Deney bulguları Ek Çizelge A.12 ve Çizelge A.13'de verilmiştir.



Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında farklı sürelerde *S. enteritidis* sayısında değişim (pH: 6,0).

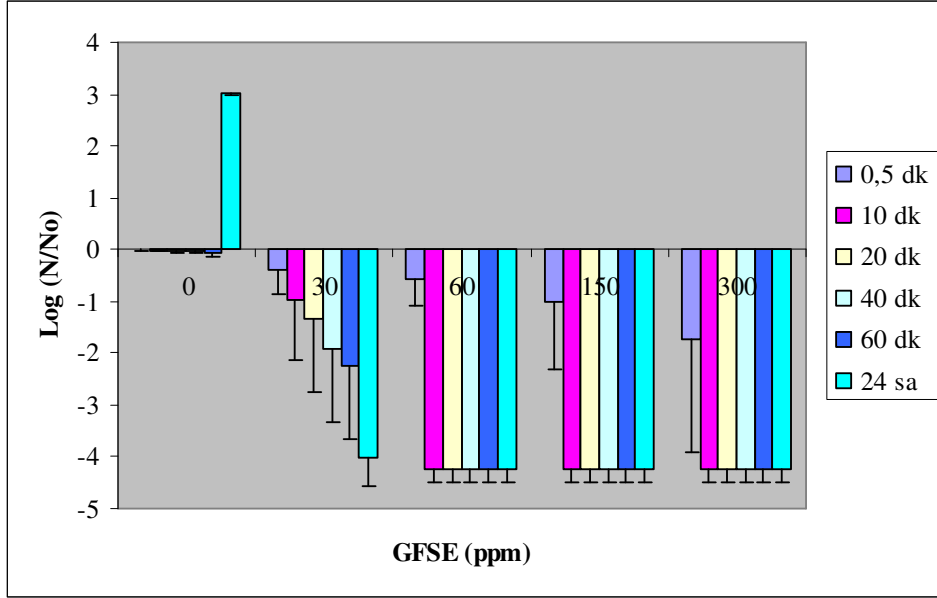
GFSE'nin *Salmonella* üzerinde ilk bir saatteki etkisine baktığımızda, kontrolde bakteri sayısında stabilite gözlenirken 24 saat sonunda 3 log₁₀ kadar artmış, 60 - 300 ppm de 10. dak.dan itibaren ilk bir saatte (Şekil 4.5) ve 24 saat sonunda sayı 1 log₁₀ kob/ml düzeyine inmiştir.

ANOVA varyans analizi ile bir saat sonuçları değerlendirildiğinde, GFSE, süre ve GFSE - süre interaksiyonu bakteri inaktivasyonunda önemli (p<0,05) bulunmuştur (Ek Çizelge A.14) GFSE konsantrasyonu arttıkça ve antimikrobiyale maruz kalan süre uzadıkça inaktivasyon da artmıştır. Bakteri sayısı kontrol ve 30 ppm gibi düşük GFSE konsantrasyonunda ilk 1 saatte stabilite göstermiştir.

Ji-Yeun ve diğ.'nin (2007) GFSE'nin *S. typhimurium* üzerine etkisini araştırdığı bir çalışmada, 37°C'de 20 µg/ml GFSE varlığında 8 saat süresince bakteri gelişiminin inhibe olmadığı gösterilmiştir ki bizim çalışmamızda da 30 ppm konsantrasyonda ilk 1 saat içinde bakteri canlılığını korumuştur.

4.1.3.2 GFSE (Citril - 200)'nin *E. coli* O157:H7 üzerinde antimikrobiyal etkileri

GFSE'nin (30 - 300 ppm) ilk bir saatte ve 24 saat sonundaki (Şekil 4.6) *E. coli* O157:H7 gelişimine etkisine tekrarlı olarak bakılmıştır (35°C; pH: 6,0). Deney bulguları Ek Çizelge A.16 ve Çizelge A.17'de görülmektedir.

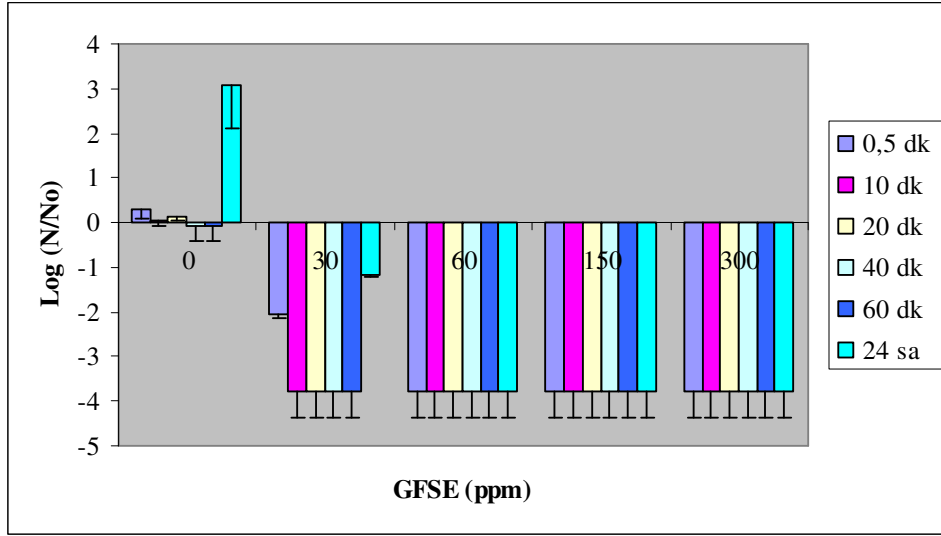


Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında farklı sürelerde *E. coli* O157:H7 sayısında değişim (pH: 6,0).

GFSE'nin *E. coli* O157:H7 üzerinde ilk bir saatteki etkisine baktığımızda, kontrolde bakteri sayısında stabilite gözlenirken 24 saat sonunda bakteri sayısı 3 log₁₀ kadar artmış, 60 - 300 ppm de 10. dak.dan itibaren ilk bir saatte (Şekil 4.6) ve buna paralel olarak 24 saat sonunda sayı 1 log₁₀ kob/ml düzeyine inmiştir. ANOVA varyans analizi ile bir saat sonuçları değerlendirildiğinde, GFSE ve süre önemli bulunmuştur (p<0,05) (Ek Çizelge A.18).

4.1.3.3 GFSE (Citril - 200)'nin *L. monocytogenes* 4b üzerinde antimikrobiyal etkileri

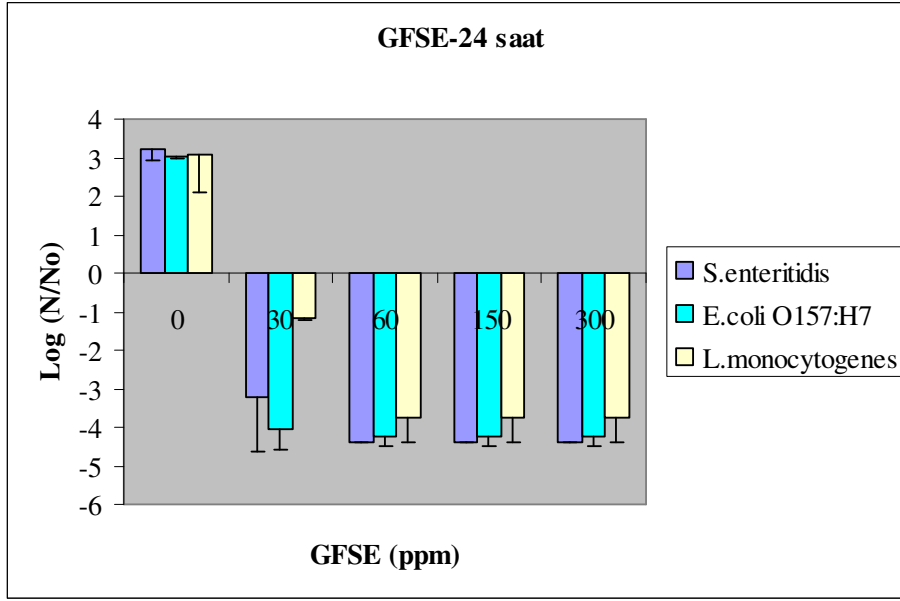
GFSE'nin (30 - 300 ppm) ilk bir saatte ve 24 saat sonundaki *L. monocytogenes* gelişimine etkisine tekrarlı olarak bakılmıştır (35°C; pH: 6,0). Deney bulguları Şekil 4.7 ile Ek Çizelge A.20 ve Çizelge A.21'de verilmiştir.



Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında farklı sürelerde *L. monocytogenes* sayısında değişim (pH: 6,0).

GFSE'nin *L. monocytogenes* üzerinde ilk bir saatteki etkisine baktığımızda kontrolde bakteri sayısında stabilite gözlenirken, 24 saat sonunda 3 log₁₀ kadar artmış, 60 - 300 ppm de 1. dak.dan itibaren 1 saatte (Şekil 4.7) ve buna paralel olarak 24 saat sonunda kuvvetli bakterisit etki meydana gelmiştir. Bir saatlik denemelerde 30 ppm gibi düşük bir GFSE konsantrasyonunda bir saat içinde bakteri sayısı 1 log₁₀ kob/ml düzeyine inmişken, aynı konsantrasyonda 24 saatlik inhibisyon denemesi sonunda *Listeria* sayısı başlangıç sayısından 1 log₁₀ aşağıdadır (Şekil 4.7). Bu da muhtemelen, düşük antimikrobiyal konsantrasyonunda spontan olarak oluşan az sayıdaki antimikrobiyal dirençli *L. monocytogenes* mutantlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde yeniden gelişmesinden/çoğalmasından (regrowth) kaynaklanmıştır.

L. monocytogenes'in nin ilk 1 saatteki inaktivasyonunda GFSE istatistiksel olarak önemli iken (p=0,00) süre önemsiz bulunmuştur (Ek Çizelge A.22). GFSE, 30-300 ppm konsantrasyonda 10. dak.dan itibaren 1 saat içindeki tüm analiz periyotlarında bakterisit etki göstermiştir.



Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 35°C’de 24 saat sonunda test organizmaları sayılarındaki değişimler (pH: 6,0).

Farklı konsantrasyonlarda (30-300 ppm) GFSE kullanılarak patojen bakterilerin 35°C’de 24 saatlik inkübasyonu sonucunda meydana gelen inaktivasyon bulguları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GFSE, bakterilerin indirgenmesinde önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Çizelge A.15, A.19, A.23) ancak konsantrasyonların birbirinden farklı önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$). Şekil 4.8’de patojen test organizmalarının GFSE ile 24 saat sonunda inaktivasyonu gösterilmiştir.

4.2 Tavuk Kıymasında Patojenlere Karşı Antimikrobiyal ve Ambalaj Uygulamaları

4.2.1 GFSE (Citril - 200)’nin etkisi

GFSE’nin Gram(-) ve Gram(+) bazı bakteri izolatlarına antibakteriyel etkilerine 1:1 ila 1:512 arasında değişen konsantrasyonlarda, değişen zaman aralıklarında bakılmış ve 1:512 (1949 ppm) lik dilüsyonda hem bakterisit hem de non-toksik kalmıştır. Ayrıca 1:1 den 1:128’e (7751 ppm) kadarki konsantrasyonlarda yine bakterisit fakat toksik (insan deri fibroblast hücrelerine) bulunmuştur (Heggors ve diğ., 2002).

Bizim in-vitro çalışma bulgularımızda bütün patojen bakteriler için 60 - 300 ppm GFSE, pH: 6,0’da yaklaşık $5 \log_{10}$ kob/ml düzeyindeki bakteri sayısını ilk 1 saatte ve 24 saat sonra $1 \log_{10}$ kob/ml düzeyine düşürmüştür. GFSE’nin tavuk kıymasında

4°C’lik soğuk muhafazada bakterisit etki gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan ilk denemede her 3 patojeni de içeren tavuk kıyması ortamında GFSE 300 - 2000 ppm kullanılmıştır. Çizelge 4.7’de ortalama deneme bulguları görülmektedir.

Çizelge 4.7: Farklı GFSE konsantrasyonlarında, farklı sürelerde 4°C’de tavuk kıymasında (stomacher torbası içerisinde) toplam bakteri ve test organizma sayıları ve standard sapmaları.

GFSE (ppm)	Süre (gün)	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (log ₁₀ kob/g)	Test Organizmaları (log ₁₀ kob/g)		
			<i>S.enteritidis</i> ⁽¹⁾	<i>E.coli</i> O157:H7 ⁽²⁾	<i>L.monocytogenes</i> ⁽³⁾
0	0	5,56±0,00	5,38±0,16	4,81±0,04	4,00±0,00
	3	5,57±0,23	5,26±0,04	4,38±0,12	4,37±0,17
	6	5,59±0,11	5,26±0,10	- ⁽⁴⁾	4,99±0,08
300	0	5,39±0,05	5,16±0,05	4,88±0,12	3,15±0,21
	3	5,55±0,08	5,24±0,01	4,15±0,21	3,87±0,17
	6	5,38±0,00	4,89±0,41	-	5,19±0,57
1000	0	5,28±0,07	5,12±0,04	4,61±0,02	3,13±0,05
	3	5,21±0,02	4,85±0,09	4,00±0,00	3,00±0,00
	6	5,25±0,19	4,92±0,32	-	4,46±0,65
2000	0	5,21±0,00	5,07±0,04	4,55±0,16	2,82±0,06
	3	5,01±0,11	5,06±0,03	4,00±0,00	2,78±0,00
	6	5,25±0,08	5,01±0,09	-	3,94±0,35

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,27 log₁₀,⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,15 log₁₀,⁽³⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,07 log₁₀,⁽⁴⁾Sayım yapılamadı.

Depolama süresi boyunca kontrolde toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarında değişim gözlenmemiştir. GFSE ilave edilen örneklerde patojen bakterilerde ilk günde kontrole göre ≤1 log₁₀’luk indirgenmeler meydana gelmiştir. *S. enteritidis* sayısında 300-2000 ppm GFSE ile ilk günde kontrole göre <1 log₁₀ indirgenmeler meydana gelmiştir. 2000 ppm GFSE konsantrasyonunda 6 gün sonundaki *Salmonella* sayısı kontrole göre 0,5 log₁₀ kadar aşağıdadır. *E. coli*’de 300 ppm de ilk gün sayı kontrolden farksızken diğer konsantrasyonlarda <1 log₁₀ azalma ve 3. gün sonunda GFSE’nin tüm düzeylerinde 0,5 log₁₀ kadar azalma bulunmuştur. *L. monocytogenes*’de GFSE ilavesi ile ilk gün kontrole kıyasla 1 log₁₀ kadar azalmalar gözlenmiş, 6 gün sonunda kontrolde bakteri sayısı 1 log₁₀ artarak 5 log₁₀’a ulaşırken,

1000 ve 2000 ppm de kontrole göre sırasıyla 0,5 log₁₀ ve 1 log₁₀ azalma gözlenmiştir.

Deney bulguları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, toplam aerobik mezofilik bakteri sayısında GFSE önemli sayılacak ($p=0,00$) bir indirgeme sağlarken süre önemsizdir, (Ek Çizelge A.24) çünkü depolama sıcaklığı genel olarak bakterilerin gelişimi için uygun olmayan 4°C'dedir. Konsantrasyon 300 ppm iken aerobik mezofilik bakteri sayısı kontrolden farksızdır. 1000 ve 2000 ppm GFSE kontrole kıyasla önemli ($p<0,05$) düzeyde inhibisyona neden olmuş, ancak etkinlikleri arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

S. enteritidis'in inhibisyonunda GFSE konsantrasyonu önemli, süre ise önemsizdir (Ek Çizelge A.25). GFSE'nin iki düzeyinin (1000 ve 2000 ppm) etkinlikleri birbirinden farksızdır ($p>0,05$).

E. coli O157:H7'nin kıymada canlılığı üzerinde 3 günlük bulgular değerlendirildiğinde, GFSE konsantrasyonu ve süre önemli rol oynamıştır (Ek Çizelge A.26). İstatistiksel olarak 300 ppm GFSE ile kontrol bakteri sayıları arasında fark gözlenmemiştir, ancak GFSE konsantrasyonu 1000 ve 2000 ppm olduğunda bakteriyel sayılar önemli düzeyde azalmıştır.

L. monocytogenes için GFSE konsantrasyonu ve 6 günlük süre önemlidir (Ek Çizelge A.27). İstatistiksel olarak 300 ppm kontrolden farklı değilken, 1000 ve 2000 ppm inhibisyonunda önemli oranda fark yaratmıştır. *Listeria* psikrotrofik patojen bir bakteri olduğu için, 4 °C'de 6. gün sonunda çoğaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.7).

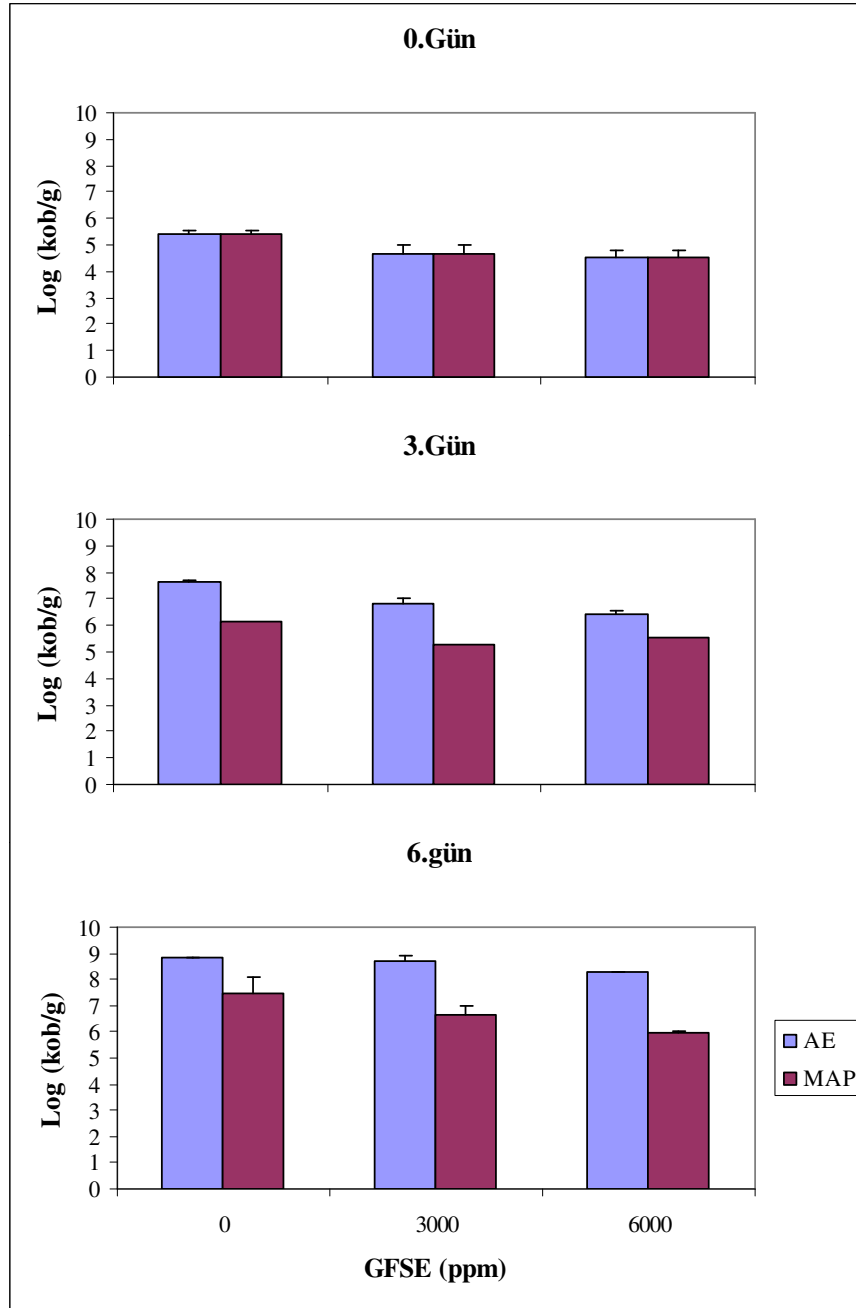
Vakum ve CO₂ ortamında paketlenmiş parça sığır etlerinin soğuk depolanması sırasında *Salmonella* (*S. typhimurium* ve *S. brandenberg*) ve *E. coli* O157:H7'nin canlılığı araştırılmış, -1,5°C'de 6 hafta ve sonrasında 4°C'de 2 hafta soğuk depolama sırasında iki paketlenme tipinde de patojen bakterilerin sayısında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle bu bakteriler açısından riskli taze etlerde güvenliğin sağlanması için koruyucu katkı maddeleri ilavesinin gündeme gelebileceği bildirilmiştir (Dykes ve diğ., 2001).

4.2.2 GFSE (Citril - 200)'nin yüksek sıcaklıkta (10°C) Modifiye Atmosferde Paketleme ile etkisi :

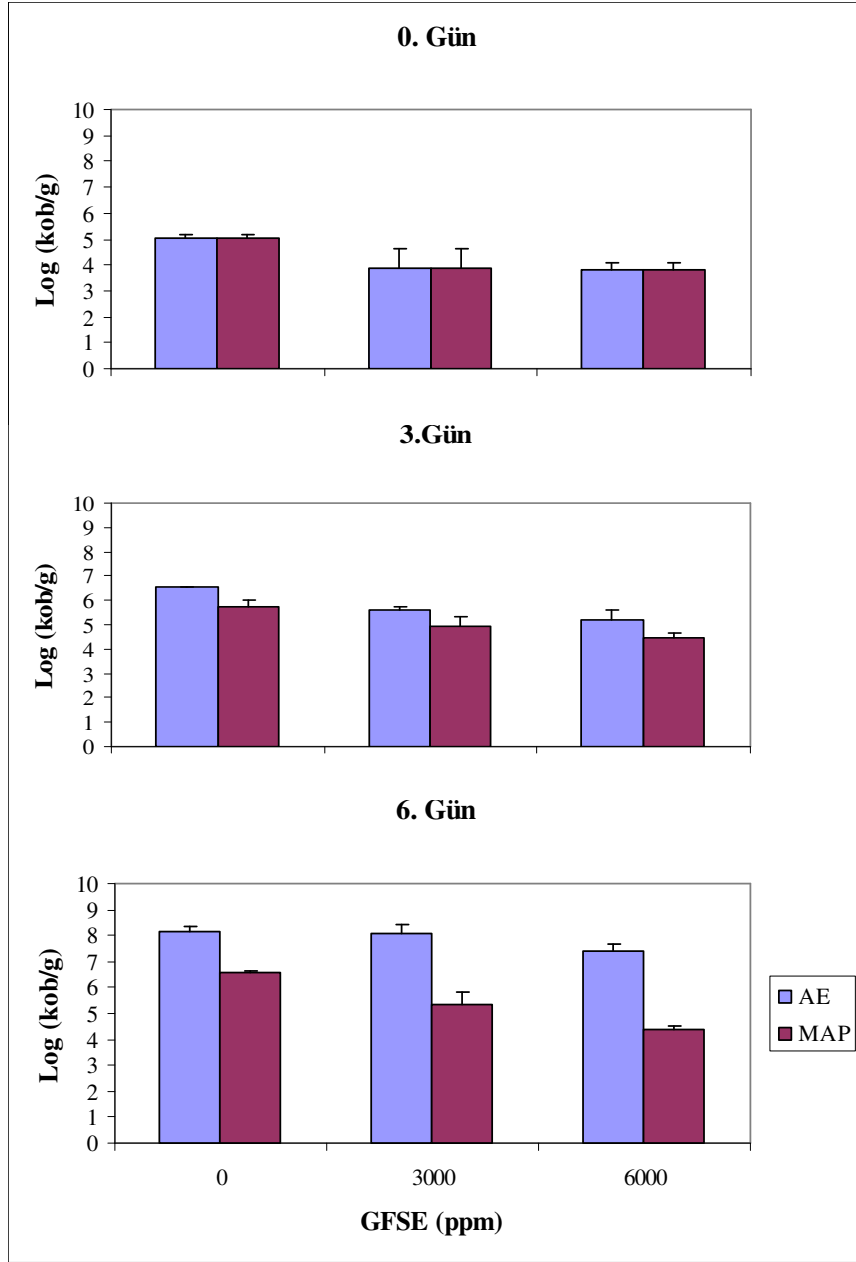
Patojen bakterilerin gelişimi taze etin soğuk depolaması ile baskılanmakla birlikte satış zinciri veya işleme gibi ileriki aşamalarda sıcaklık yükselmesi ve dalgalanmalarına karşı ambalajlama yanında doğal katkıların ilavesi güvenliğini artırabilir. Günümüzde taze et ürünlerinin paketlenerek tüketiciye ulaşması gittikçe yaygınlaşmaktadır. Yeni denememizde antimikrobiyal etkili GFSE ile gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatan modifiye ambalaj tekniği kombine edilerek “engel teknolojisi” uygulamasının nisbeten yüksek sıcaklıkta (10°C) patojen bakteriler üzerindeki etkisini görmek amaçlanmıştır. GFSE'nin 2000 ppm'e kadar olan konsantrasyonları 4°C'de patojen bakterilerde sınırlı bir inhibisyon ($\leq 1 \log_{10}$) yarattığı için ve 10°C bakteri gelişimini teşvik eden bir depolama sıcaklığı olduğundan GFSE konsantrasyonu artırılarak 2 düzey (3000 ve 6000 ppm) çalışılmıştır. Ambalaj atmosferi bileşimi aerobik paketler için %21 O₂ + %79 N₂ ve modifiye atmosfer paketler için %70 CO₂ + %30 N₂ olarak seçilmiştir. Deneme bulguları Ek Çizelge A.28'de ve Şekil 4.9-4.12'de görülmektedir.

Bu denemede patojenlerle inokule edilen tavuk kıymasının GFSE ilavesi ve MAP'ın (%70 CO₂ + %30 N₂) kombine edilerek 10°C'de 6 gün depolanması sırasında aerobik paketlemeye kıyasla mikrobiyal aktivitede sınırlanma görülmüştür. Şekil 4.9'da görüleceği gibi, 6000 ppm GFSE ilavesinde, aerobik depolamada 4,5 log₁₀ toplam aerobik mezofilik bakteri sayısından, 6 gün sonunda yaklaşık 8,5 log₁₀ bakteri sayısına ulaşırken MAP'ta bu sayı 6 log₁₀ düzeyinde kalmıştır. Buna paralel olarak inokule edilen patojenlerden *Salmonella*'da (Şekil 4.10) ve *Listeria*'da (Şekil 4.12) yaklaşık 0,5 log₁₀, *E.coli*'de (Şekil 4.11) yaklaşık 1 log₁₀ artışlar kaydedilmiştir ki aerobik paketlemeden daha düşük düzeydedir.

Veriler ANOVA varyans analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilerek tavuk kıymasına GFSE ilavesinde konsantrasyon (0, 3000 ve 6000 ppm), 10°C'de depolama süresi (0.,3.,6.gün) ve ambalajlama şeklinin (Aerobik : %21 O₂ + %79 N₂ ve Modifiye Atmosfer: %70 CO₂ + %30 N₂), toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı ve kıymaya inokule edilen her bir patojen bakterinin gelişimi üzerindeki etkisine bakılmıştır.



Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C’de depolanan tavuk kıymasında toplam aerobik mezofilik bakteri sayıları.



Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C’de depolanan tavuk kıymasında *S. enteritidis* sayıları.

Depolama süresi boyunca toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının değişimi incelendiğinde, GFSE, süre ve paket tipi etkisi önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur (Ek Çizelge A.29). GFSE’nin iki düzeyinin etkisi birbirinden farksız bulunmuştur

($p=0,0529$). MAP paketleme ile 3. ve 6. günlerde toplam bakteri gelişiminin yavaşladığı görülmüştür.

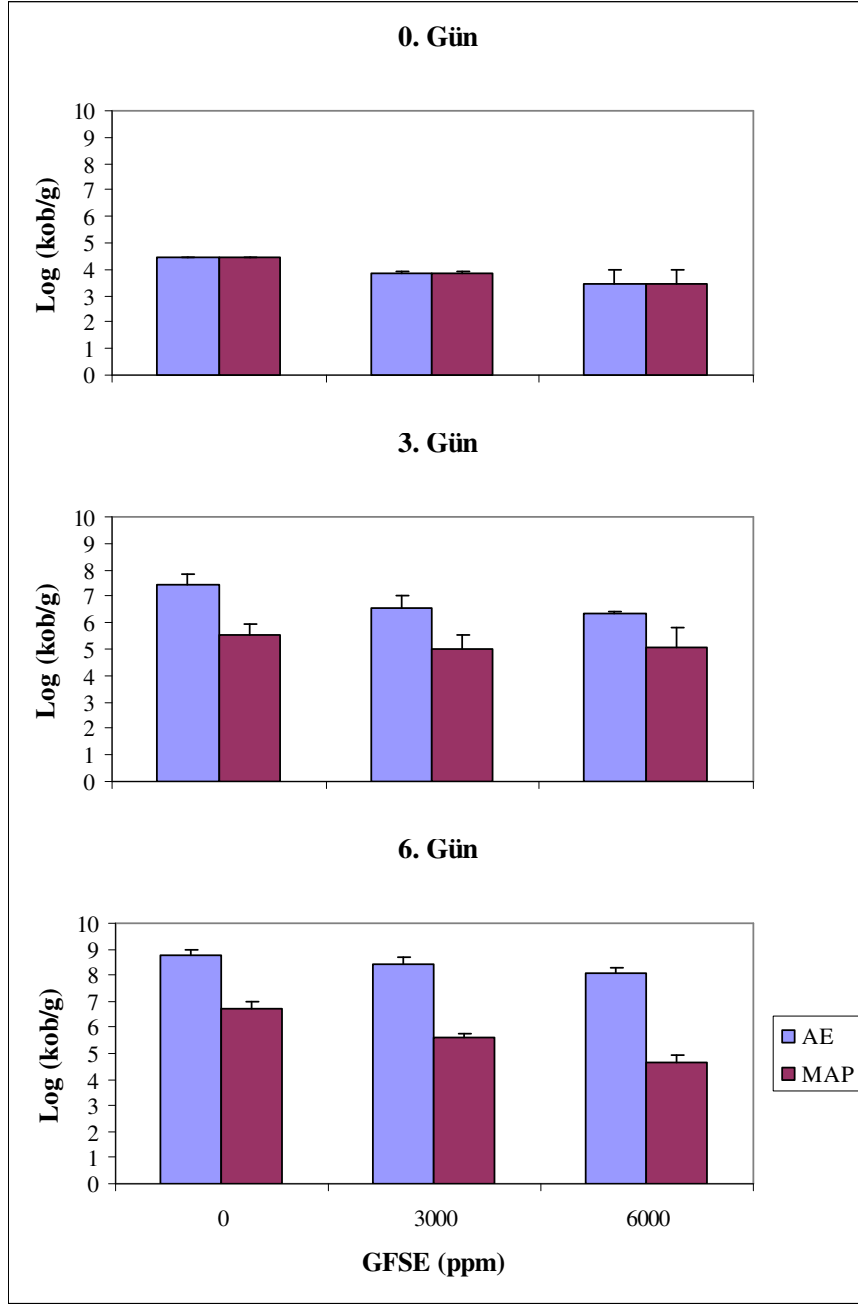
S. enteritidis'in gelişimi üzerinde her bir faktörün (GFSE, süre, paket tipi) etkisi önemli bulunmuştur. ($p<0,05$) (Ek Çizelge A.30). GFSE'nin iki düzeyinin (3000 ve 6000 ppm) indirgenme üzerindeki etkisi istatistiksel olarak farklıdır ($p<0,05$). İnhibisyonda 6000 ppm daha etkili bulunmuştur. Bakteri sayısında depolama süresine bağlı olarak artış MAP'ta aerobik paketlemeden daha azdır, MAP patojen bakteri gelişimini önemli ölçüde yavaşlatmıştır. Aerobik pakette 6.günde sayı 8 $\log_{10}$ 'a ulaşmışken MAP'ta 6 $\log_{10}$ 'un aşağısındadır.

E. coli O157:H7'nin zamana bağlı gelişimine bakarsak, *Salmonella*'da olduğu gibi her bir faktörün etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Ek Çizelge A.31). GFSE'nin iki düzeyinin indirgenme üzerindeki etkisi istatistiksel olarak farklıdır ($p=0,049$). İnhibisyonda 6000 ppm daha etkili bulunmuştur.

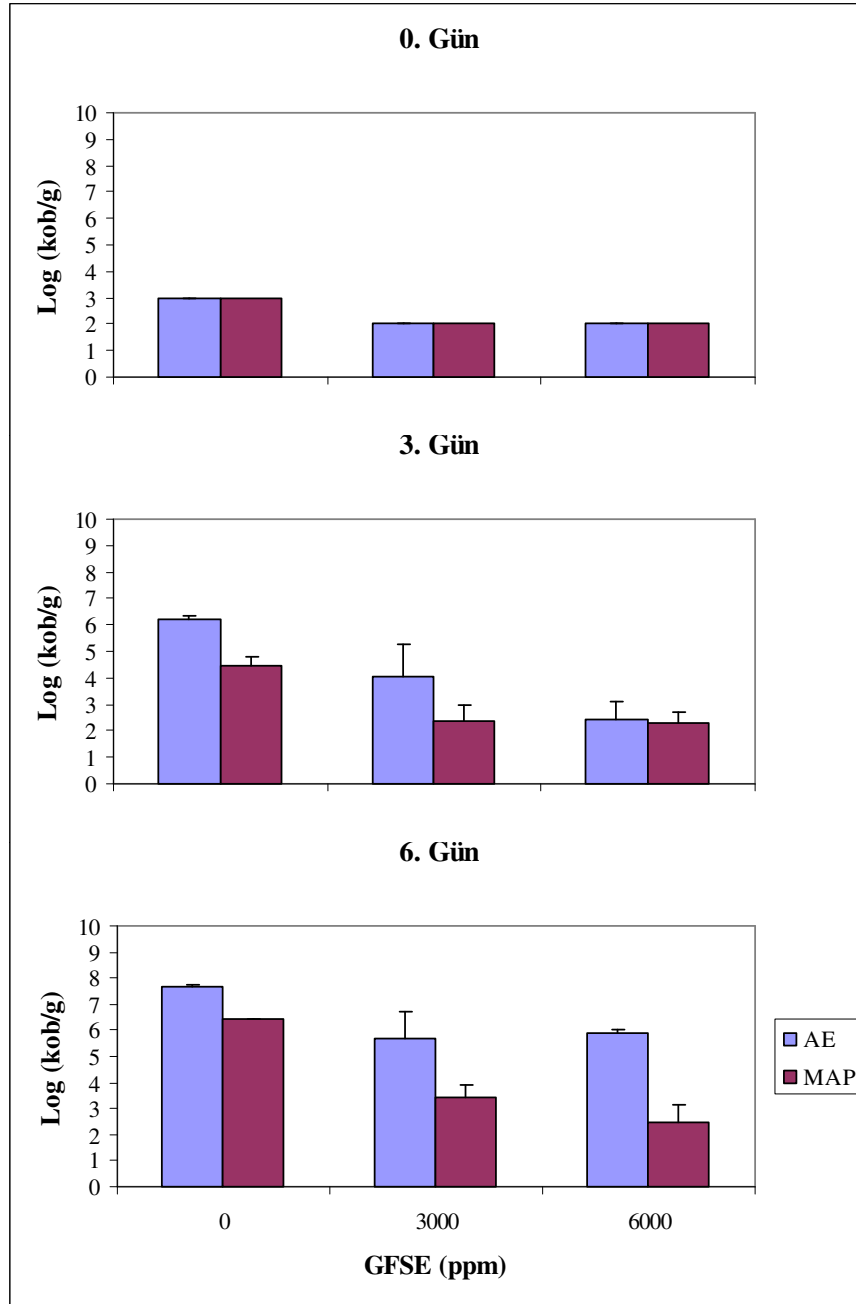
L. monocytogenes için kontrolde diğer patojenlere göre daha düşük olan başlangıç bakteri sayısı (3 $\log_{10}$) 6000 ppm GFSE ilavesi ile belirleme limitinin altına düşmüştür ($<2 \log_{10}$) ve bakterinin gelişiminde GFSE, süre ve paket tipi önemlidir (Ek Çizelge A.32) İstatistiksel olarak 3000 ve 6000 ppm arasındaki fark önemli değilken, paketlemeler arasındaki fark önemli bulunmuştur. MAP, patojen inhibisyonunda daha etkindir. İlk 3 günlük depolamada 6000 ppm GFSE, 3000 ppm'e kıyasla ortalama 1 $\log_{10}$ kadar fazla inhibisyona neden olmuştur.

Patojenlerin inhibisyonunda paket tipi ve sürenin interaksyonu istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p=0,00$). MAP'ın inhibisyon etkisi aerobik paketlemeden fazladır ve bu etki depolama süresinin artışı ile belirginleşmiştir.

Genel olarak, ilave edilen GFSE, rekabetçi floranın da düşük sayıda olduğu ilk gün patojen bakterilerde belirgin bir indirgeme sağlamıştır. Depolamada 10°C gibi nisbeten yüksek sıcaklık derecesinde, kıymaya GFSE ilavesi ve MAP uygulaması birlikte açıkça engel oluşturmuş, ortamdaki patojen bakteri gelişimini sınırlarken kıymanın raf ömrünü de uzatmıştır. İnhibisyonda 6000 ppm daha etkindir.



Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C’de depolanan tavuk kıymasında *E. coli* O157:H7 sayıları.



Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde (AE: Aerobik, MAP: Modifiye Atmosfer Paketleme) 10°C’de depolanan tavuk kıymasında *L. monocytogenes* sayıları.

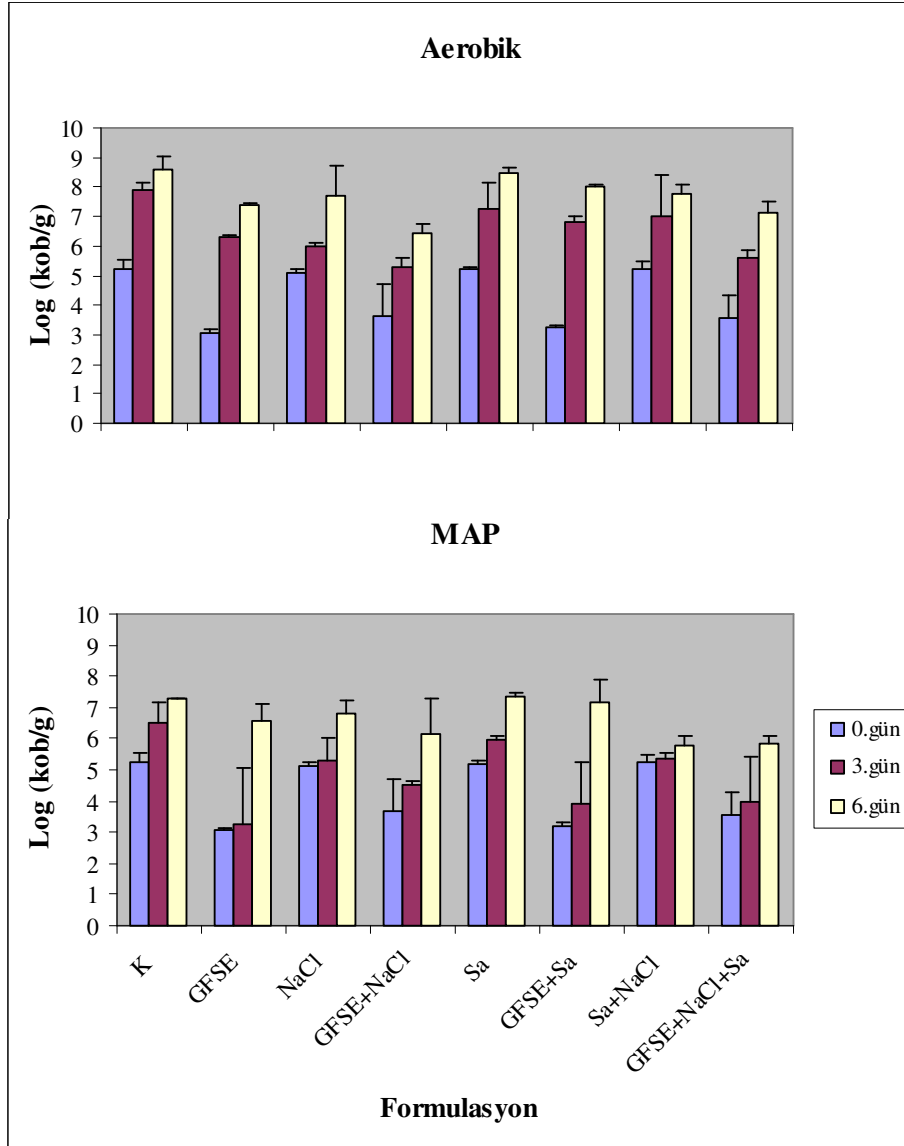
4.2.3 Tavuk Kıymasının Farklı Formulasyonlarında GFSE ve Modifiye Atmosferde Paketlemenin Patojenler Üzerine Etkisi

Tavuk kıymasında GFSE'nin (6000 ppm) sarımsak tozu (%2 w/w) ve tuz (NaCl, %2 w/w) ile 8 farklı formulasyonunun, aerobik ve modifiye atmosferde paketlenerek 10°C'de 6 gün depolamasının test organizmaları üzerine etkisi Şekil 4.13 - 4.15'de (Ek Çizelge A.33 ve Ek Çizelge A.34) gösterilmiştir.

Veriler ANOVA varyans analiziyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, *S. enteritidis* ve *E. coli*'nin 10°C gibi nisbeten yüksek sıcaklıkta gelişiminde GFSE, NaCl, süre ve paket tipi önemli ($p<0,05$) etkide bulunmuştur (Ek Çizelge A.35 ve A.36). Sarımsak tozunun etkisi ise önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu iki bakteri için NaCl-süre, GFSE-süre ve süre-paket interaksyonları da önemli bulunmuştur. Ortamda % 2 NaCl bulunması, 6. gün sonunda *S. enteritidis* ve *E. coli*'de 1 log₁₀ kadar indirgeme sağlamıştır. GFSE ilk 3 günlük depolamada bu bakterilerde kontrole göre 2 log₁₀'a yakın indirgenme sağlarken 6. gün sonunda etkinlik düşüktür. GFSE bu sıcaklıkta özellikle ilk 3 günde daha etkin bulunmuştur. MAP paketleme aerobik pakete göre, 6. gün sonunda *Salmonella*'da 1 log₁₀, *E. coli*'de ise 2 log₁₀ civarında indirgenme sağlamıştır. Genel olarak her iki bakteride 1 log₁₀ indirgeme sağlamıştır. *L. monocytogenes* için GFSE, NaCl, süre ve paket tipine ilaveten sarımsak da önemli ($p=0,018$) etkili çıkmıştır (Ek Çizelge A.37). *Listeria* için GFSE-süre ve süre-paket interaksyonları önemlidir. GFSE ilavesi ile 3 günlük depolamada *Listeria* gelişimi kontrol edilirken, 6 gün sonunda sayı kontrole göre ortalama 3 log₁₀ aşağıda kalmıştır. Sarımsağın ilavesi *Listeria*'da ortalama 0,4 log₁₀ düzeyinde inhibisyona neden olmuştur. MAP paketleme aerobik paketlemeye göre ortalama 1 log₁₀ luk indirgenme sağlamıştır.

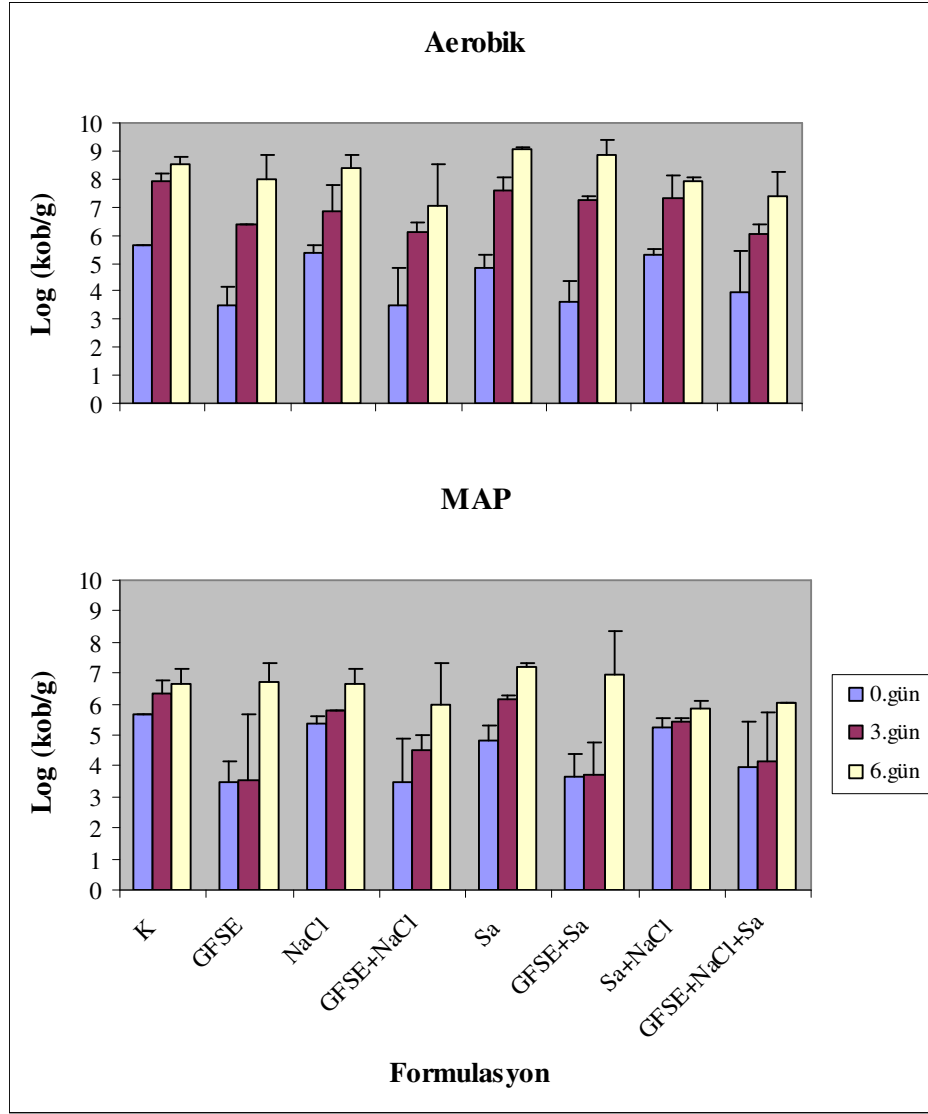
MAP paketleme bulgularını istatistiksel olarak kendi içinde değerlendirecek olursak, *Salmonella* gelişiminde GFSE ve süre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. NaCl-süre interaksyonunda $p=0,051$ iken GFSE-süre interaksyonunda $p=0,005$ bulunmuştur. NaCl'nin % 2 ilavesi ilk 3 günde değişim yaratmazken 6. gün sonunda ortalama 1 log₁₀ indirgeme sağlamıştır. 6000 ppm GFSE ilk ve 3. günde ortalama 2 log₁₀ kadar indirgeme sağlarken, 6. günde etkinlik neredeyse yoktur. *E. coli*'nin 6 günlük depolamada gelişiminde GFSE, süre ve GFSE-süre interaksyonu önemlidir ($p<0,05$). GFSE ilk gün ve 3. gün sonunda ort. 2 log₁₀ kadar indirgenme sağlarken 6. gün sonunda etkisi gözlenmemiştir. *Listeria* gelişiminde ise GFSE, NaCl ve süre

etkili bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca GFSE-süre interaksyonu önemlidir. 6 gün sonunda bakteri sayısı kontrolde ortalama 6 $\log_{10}$ 'u bulurken GFSE ilavesi ile ortalama 3 $\log_{10}$ 'da kalmıştır.



Şekil 4.13: GFSE'nin sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının aerobik ve MAP paketlenmiş tavuk kıymasında 10°C'de *S. enteritidis* gelişimine etkisi*.

*K: Kontrol, GFSE: 6000 ppm GFSE, NaCl: % 2 NaCl, GFSE+NaCl: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl, Sa: % 2 sarımsak tozu, GFSE+Sa: 6000 ppm GFSE+%2 sarımsak tozu, Sa+NaCl: % 2 sarımsak tozu +% 2 NaCl, GFSE+NaCl+Sa: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl+% 2 sarımsak tozu

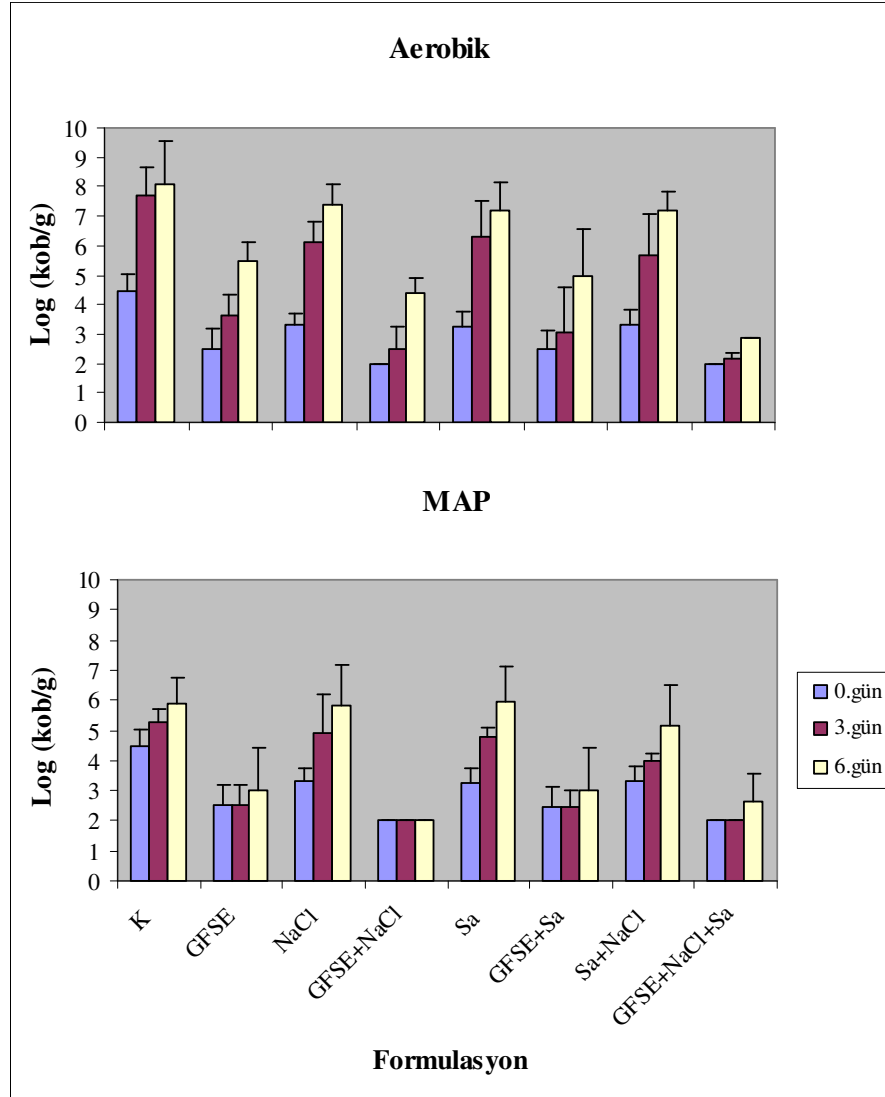


Şekil 4.14: GFSE'nin sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının aerobik ve MAP paketlenmiş tavuk kıymasında 10°C'de *E. coli* O157:H7 gelişimine etkisi*.

*K: Kontrol, GFSE: 6000 ppm GFSE, NaCl: % 2 NaCl, GFSE+NaCl: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl, Sa: % 2 sarımsak tozu, GFSE+Sa: 6000 ppm GFSE+%2 sarımsak tozu, Sa+NaCl: % 2 sarımsak tozu +% 2 NaCl, GFSE+NaCl+Sa: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl+% 2 sarımsak tozu

Aerobik paketlenme bulgularını istatistiksel olarak kendi içinde değerlendirecek olursak, *Salmonella* gelişiminde GFSE, tuz ve süre istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. % 2 NaCl, ilk günde etkisini göstermez iken 3. ve 6. günlerde 1 log₁₀ kadar inhibisyon sağlamıştır. GFSE bakteri popülasyonunu ilk gün 2 log₁₀ kadar, 3. ve 6. günlerde 1 log₁₀ kadar indirgemıştır. *E. coli* için yine GFSE, tuz ve süre istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Tuz (% 2), depolamanın 3. ve 6. günlerinde 1 log₁₀ indirgeme sağlamıştır. *Listeria* inhibisyonunda MAP'takinden

farklı olarak NaCl, GFSE ve süreye ilaveten sarımsak da önemli etkili ($p=0,027$) bulunmuştur. GFSE ilavesi ile 6.gün sonunda ortalama 4,5 $\log_{10}$ olan *Listeria* sayısı, kontrolde 7 $\log_{10}$ civarındadır.



Şekil 4.15: GFSE'nin sarımsak tozu ve tuzla kombinasyonlarının aerobik ve MAP paketlenmiş tavuk kıymasında 10°C'de *L. monocytogenes* gelişimine etkisi*.

*K: Kontrol, GFSE: 6000 ppm GFSE, NaCl: % 2 NaCl, GFSE+NaCl: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl, Sa: % 2 sarımsak tozu, GFSE+Sa: 6000 ppm GFSE+%2 sarımsak tozu, Sa+NaCl: % 2 sarımsak tozu +% 2 NaCl, GFSE+NaCl+Sa: 6000 ppm GFSE+% 2 NaCl+% 2 sarımsak tozu

Konu ile ilgili olan bir çalışmada, sığır kıymasına sarımsakda bulunan 4 organosülfür bileşiği 5, 10 veya 20 μM ilave edilerek örnekler 15°C'de 10 gün süreyle depolanmıştır. Kıyma fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kalite kriterleri açısından

incelenmiştir. Organosülfürlü bileşiklerden N-asetil sistein ve s-etil sistein'in antimikrobiyal etki göstermediği, diallil sülfid ve diallil disülfid maddelerinin ise total bakteri sayısını önemli oranda azalttığı ve örneklerle inokule edilen patojen bakterileri (*Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella typhimurium*) de inhibe ettiği gözlenmiştir (Yin ve Cheng, 2003).

Denemenin 3. ve 6. günlerinde aerobik ve MAP paketlerin atmosfer bileşimi ölçülmüştür (Çizelge 4.8). Buna göre aerobik paketlerde mikrobiyal gelişmeye bağlı olarak ortamın başlangıç oksijen oranında zamanla azalma gözlenmiştir. Paketlerin CO₂ oranı ise depolama sırasında sayısı yükselen bakterilerce ortama salınan CO₂ ile yükselmiştir. MAP paketlerde başlangıçta % 70 olan CO₂ kıymanın yağ ve su fazında çözünerek oranı düşmüş olabilir. Ayrıca ambalajın gaz geçirgenliği de etkilidir. CO₂'in gıdada çözünürlüğünde yağ oranı, su aktivitesi, pH, sıcaklık ve gaz/ürün oranı etkilidir (Devlieghere ve diğ., 2004). MAP paketlerin CO₂ ve O₂ oranlarında 3 ve 6. günler arasında önemli bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 4.8: Tavuk kıyması formülasyonlarının 10°C'de depolanması sonucu 2 paket atmosferi bileşiminde meydana gelen değişimler (ortalama).

Muamele	Sarımsak Tozu (%w/w)	NaCl (%w/w)	GFSE (ppm)	Süre (gün)	Paket Atmosferi Bileşimi (%)			
					Aerobik		MAP	
					O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
1	0	0	0	3	17,75	2,80	0,184	64,95
				6	12,30	5,05	0,000	60,75
2	0	0	6000	3	19,00	1,10	0,417	59,05
				6	15,30	5,20	0,246	61,40
3	0	2	0	3	18,90	0,85	0,124	63,15
				6	15,20	2,95	0,138	61,70
4	0	2	6000	3	19,35	0,50	0,240	63,35
				6	18,40	1,90	0,038	63,35
5	2	0	0	3	18,55	1,30	0,207	63,50
				6	14,10	5,25	0,122	53,60
6	2	0	6000	3	19,20	1,35	0,228	63,70
				6	15,10	6,10	0,073	64,85
7	2	2	0	3	19,25	0,65	0,138	64,45
				6	17,55	2,15	0,389	56,27
8	2	2	6000	3	19,55	0,40	0,156	65,35
				6	17,55	1,80	0,711	58,85

4.2.4 GFSE'nin Düşük Sıcaklıkta Modifiye Atmosfer Ortamında Etkisi

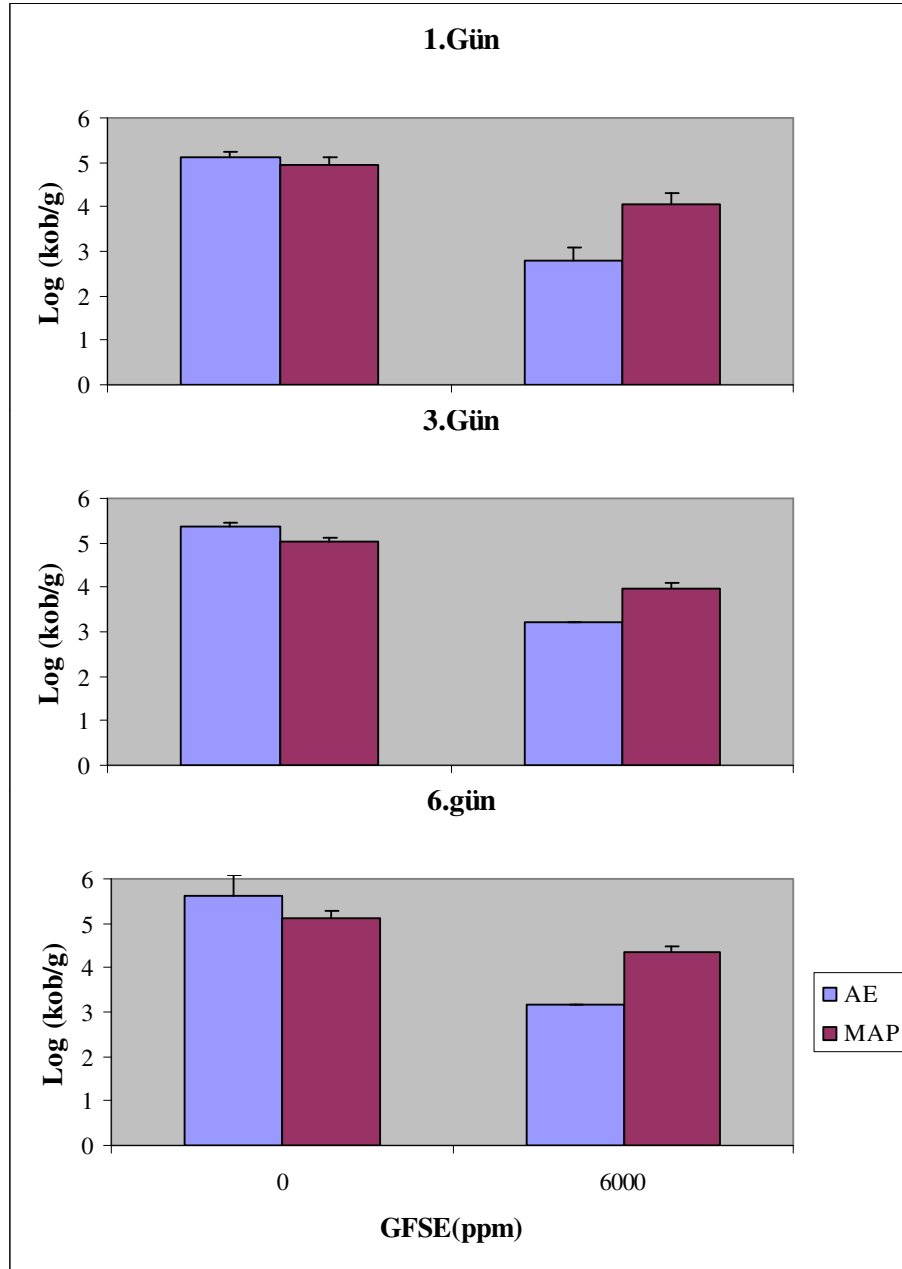
GFSE'nin tavuk kıymasına 6000 ppm düzeyinde ilavesinin aerobik ve modifiye atmosfer pakette 4°C'de 6 günlük depolamasının inokule edilen patojen bakteriler üzerinde etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen denemenin bulguları Şekil 4.16 - 4.18 ve Ek Çizelge A.38'de görülmektedir.

Analiz bulguları Minitab 12 bilgisayar programı kullanılarak ANOVA varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre *S. enteritidis*'in canlılığında GFSE, süre ve paket tipinin etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Ek Çizelge A.39). Bakteri sayıları 1. ve 3. günlerde birbirlerinden önemli düzeyde farklı çıkmamıştır ($p>0,05$). Bakteri sayısı GFSE ilavesiyle 1 gün sonra 2 log₁₀ kadar (aerobik) düşmüştür. Modifiye atmosfer altında bu düşüş 1 log₁₀'dur ve her iki paket tipinde de 6 gün boyunca bakteri sayılarında genel olarak stabilite gözlenmiştir. GFSE-paket interaksyonu önemlidir, GFSE ilaveli MAP paketlerde bakteri sayısı aerobik-GFSE paketlerden daha yüksek bulunduğu için MAP paketleme *Salmonella*'nın inhibisyonunda aerobik koşullara göre bir avantaj sağlamamıştır denebilir.

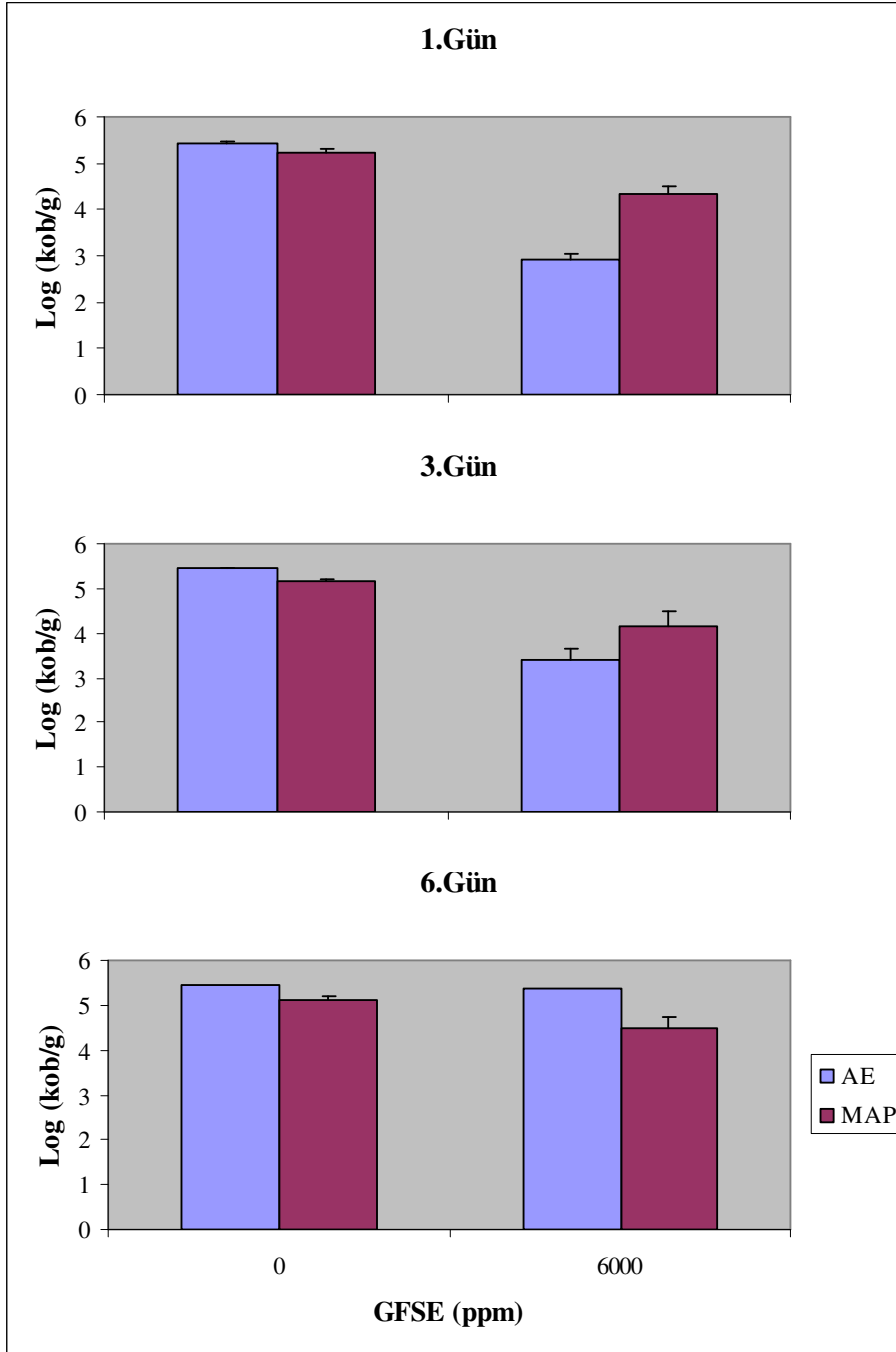
E. coli O157:H7'nin kıymadaki canlılığında GFSE ve sürenin etkisi önemli düzeydedir ($p<0,05$). Paket etkisi ise önemsizdir ($p=0,279$) (Ek Çizelge A.40). *E. coli* sayıları 1. ve 3. günlerde birbirinden önemli düzeyde farklı çıkmamıştır. Depolamanın 1. günü sonunda bakteri sayısı GFSE ilavesiyle aerobik paketlemede 2,5 log₁₀ kadar düşmüştür. MAP'ta bu düşüş 1 log₁₀ kadardır. GFSE-süre, GFSE-paket ve süre-paket interaksyonları önemlidir. Aerobik-kontrol paketlerinde bakteri sayıları MAP-kontrolden biraz daha yüksek iken, ilk 3 günlük sürede GFSE ilaveli aerobik paketlerde bakteri sayıları MAP'tan daha düşük bulunmuştur.

Örneklere GFSE ilavesi *L. monocytogenes* sayısında 1. gün sonunda hem aerobik, hem de MAP paketlemede 1 log₁₀ kadar düşüş meydana getirmiştir, 6 gün depolama ile kontrolde (aerobik paket) bakteri sayısı 1,5 log₁₀ artarken MAP'ta önemli bir değişim gözlenmemiştir. *Listeria*'nın canlılığında GFSE, süre ve paket etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Ek Çizelge A.41). GFSE-paket ve süre-paket interaksyonları önemlidir. GFSE ilave edildiğinde aerobik ve MAP paketlerde bakteri sayıları birbirine çok yakinken kontrol paketlerde MAP ortalama 1 log₁₀ inhibisyon sağlamıştır. MAP paketleme yöntemi *Listeria*'nın soğukta gelişiminin kontrolünde

aerobik paketlenmeden daha avantajlı bulunmuştur, depolamanın 6. gününde ortalama 1 log₁₀ inhibisyon sağlamıştır.



Şekil 4.16: GFSE'nin (6000 ppm) aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında *S. enteritidis* sayılarına etkisi (4°C).



Şekil 4.17: GFSE'nin (6000 ppm) aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında *E. coli* O157:H7 sayılarına etkisi (4°C).

Koo ve diğ. (2005) düşük yağlı sosis bileşimine ilave ettikleri GFSE'nin (% 0,1-0,3) 10 haftalık soğuk depolama sırasında ürünün fizikokimyasal özellikleri, tekstür ve mikrobiyolojik kalitesine etkisini incelemiştir. Sentetik koruyuculara alternatif olarak

kullanılan % 0,3 GFSE kalite kaybı yaratmadan *Listeria monocytogenes* gelişimini inhibe etmiştir.

Gıda kaynaklı patojen bakterilerin (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* veya *Escherichia coli* O157:H7) inokule edildiği geleneksel Kore ezmelerine (kanjang ve kochujang) GFSE ilave edilerek 4 ve 20°C’lerde depolanmış, patojenlerin gelişimini incelemişlerdir. Soğuk depolamada 250 veya 500 ppm GFSE ilavesi patojenlerin inhibisyonunda etkili iken, oda sıcaklığındaki etkileri kararsız bulunmuştur (Yong ve diğ., 2005). Ortam sıcaklığı, gıdadaki mikrobiyal yük veya gıda bileşenleri ile etkileşim muhtemelen aktivitesini etkilemiştir.

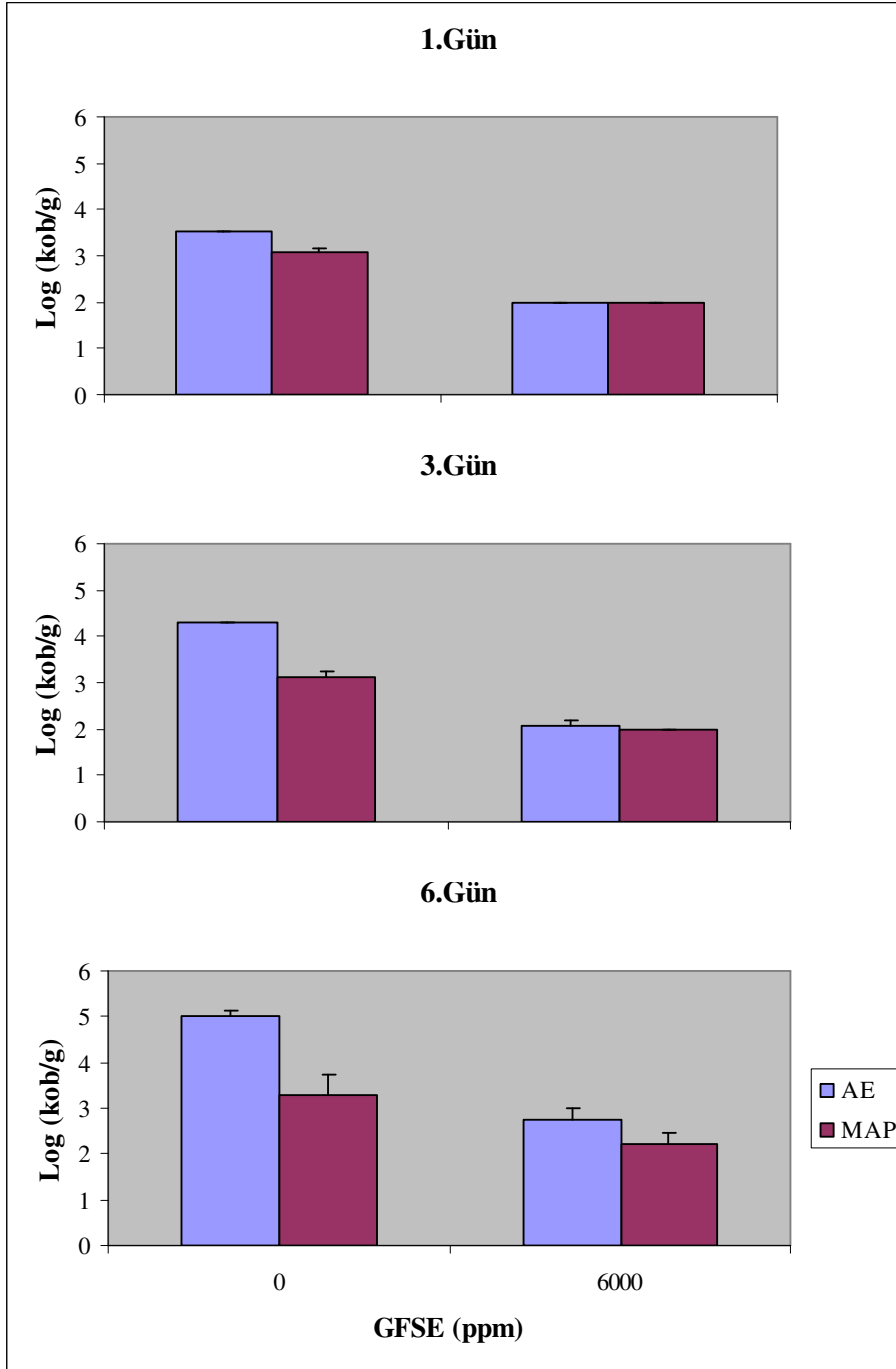
Sığır kıymasına antimikrobiyal olarak üzüm çekirdeği ekstraktının ilave edildiği bir çalışmada (Ahn ve diğ., 2004) inokule edilen patojen (*Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*) bakteri sayıları kontrol gruplarında 4°C’de 9 gün boyunca stabil kalmıştır. 10000 ppm GSE (ActiVin®: Grape Seed Extract: Üzüm Çekirdeği Ekstraktı) ilavesiyle ise 9 gün sonunda patojen bakteri sayılarında 1 log₁₀ düşüş kaydedilmiştir. Ahn ve diğ., patojen bakterilerin GSE’ye özellikle ilk 3 günde daha hassas olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda 6000 ppm GFSE ile 1. günde sağlanan indirgenmeler 6 güne kadar devam etmiştir.

Denememizin 3. ve 6. günlerinde paket atmosfer bileşimi ölçülmüştür (Çizelge 4.9). aerobik-kontrol paketlerde mikrobiyal faaliyetle O₂ oranı düşerken CO₂ yükselmiştir. aerobik-GFSE’li örneklerde ise O₂ ve CO₂ oranları 3. ve 6. günlerde fazla değişmemiştir. MAP paketlerde 3. ve 6. günlere ait atmosfer bileşimleri birbirine yakındır. Depolama sıcaklığının düşük olması nedeni ile mikrobiyal faaliyet yavaşladığı için paket atmosfer bileşimleri depolama süresince fazla değişmemiştir.

Çizelge 4.9: Tavuk kıymasına GFSE (0-6000 ppm) ilavesi ile 4°C’de depolanması ile 2 paket atmosferi bileşiminde meydana gelen değişimler (ortalama).

GFSE (ppm)	Gün	Paket Atmosferi Bileşimi (%)			
		Aerobik		MAP	
		O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
Kontrol	1	-(¹)	-	-	-
	3	19,55	0,25	0,113	63,50
	6	17,85	1,80	0,141	62,65
6000	1	-	-	-	-
	3	19,60	0,65	0,166	59,00
	6	18,95	0,70	0,125	62,35

(¹) Ölçüm yapılamadı.

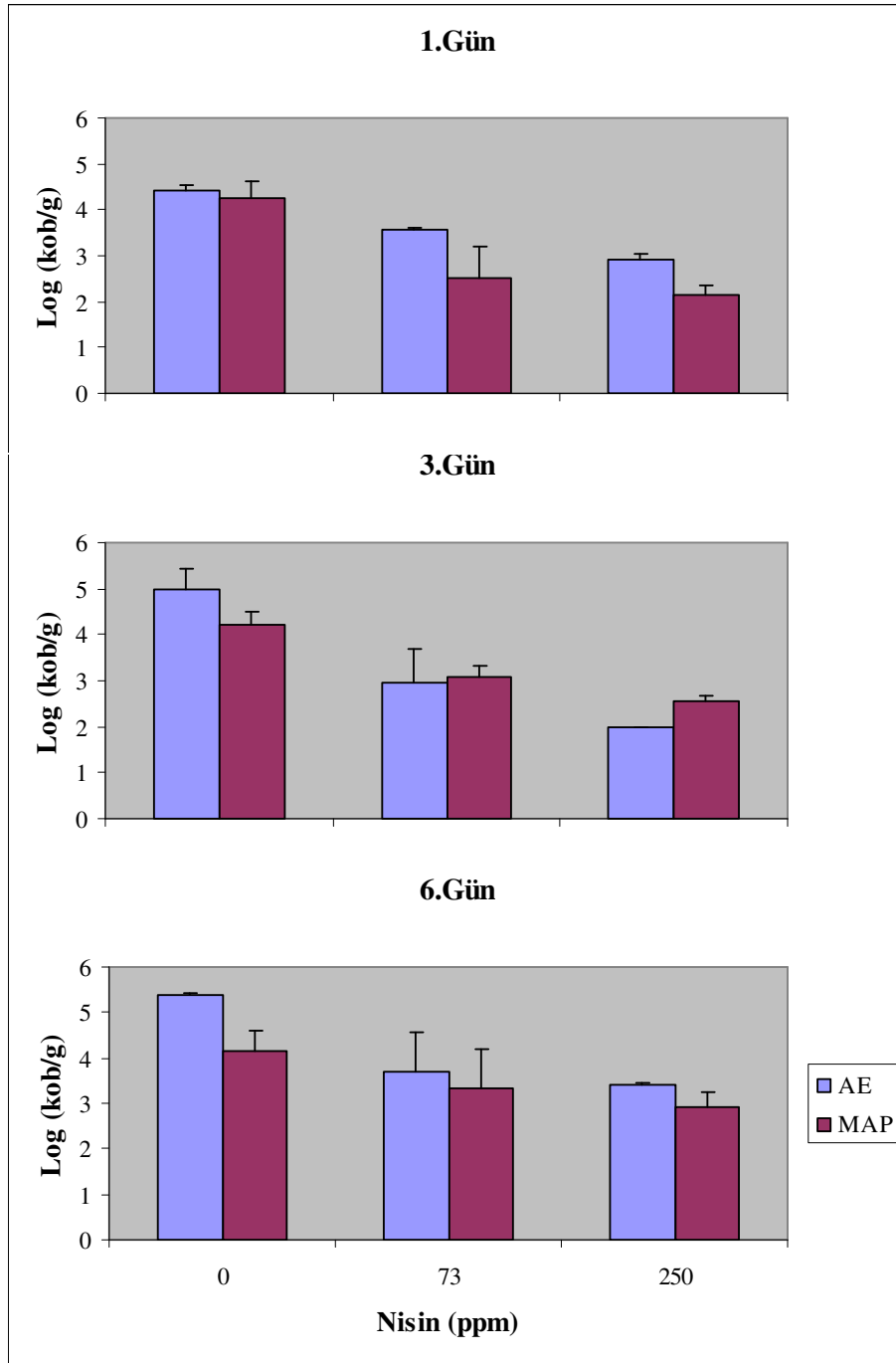


Şekil 4.18: GFSE'nin (6000 ppm) aerobik ve modifiye atmosfer paketlenmiş tavuk kıymasında *L. monocytogenes* sayılarına etkisi (4°C).

4.2.5 Nisin'in (Valisin) Düşük Sıcaklıkta Modifiye Atmosfer Ortamında *L. monocytogenes* Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada *L. monocytogenes*'in inokule edildiği tavuk kıymasına ilave edilecek nisin miktarı in-vitro çalışma bulgularımız gözönüne alınarak farklı 2 düzeyde (73 ve 250 ppm) seçilmiştir. İlave denemelerde (in-vitro) 5,22 pH'da 73

ppm nisinle de bakterisit etki gözlenmiştir. Bulgular Şekil 4.19 ve Ek Çizelge A.42’de verilmiştir.



Şekil 4.19: Farklı konsantrasyonlarda nisin ilavesinin tavuk kıymasında *L. monocytogenes* canlılığına etkisi (4°C).

Bulguların ANOVA varyans analizi ile istatistik analizi yapılmıştır. Buna göre nisin, paket tipi ve depolama süresi *L. monocytogenes*'in soğukta canlılığında önemli etkide ($p<0,05$) (Ek Çizelge A.43) bulunmuştur. Kullanılan iki konsantrasyonun (73 ve 250 ppm) etkisi istatistik olarak farklıdır. İnhibisyonda 250 ppm daha etkindir. Depolamada 1. ve 3. günler istatistiksel olarak farklı değilken 3. ve 6. günler birbirinden farklıdır. Nisin 250 ppm konsantrasyonda ortalama 2 log₁₀ inhibisyona neden olmuştur. MAP, *Listeria*'nın kontrolünde daha etkili paketlenme yöntemi olmuştur.

Nisin Gram(+) organizmalara ve sporlarına karşı antimikrobiyal etki göstermekle birlikte başka koruyucu maddelerle ve yöntemlerle birlikte kullanımları ile Gram(-)'lere de etkili olabilmektedir. EDTA, sitrik asit gibi çelatlayıcılar, fosfatlar ve sodyum klorür gibi bağlayıcı maddeler, lizozim, bazı organik asitler ve yüzey aktif maddelerden Tween-20 ilavesi, vakum veya CO₂ altında ambalajlama ile hidrostatik basınç uygulamaları gibi teknikler sinerjistik etki göstererek nisin etkinliğini artırmaktadır (Dawson, 2003).

L. monocytogenes inokule edilerek nisin (0, 10⁴, 5x10⁴ IU/ml=0, 250, 1250 ppm) çözeltisine daldırılan, MAP ve aerobik paketlenerek 4 ve 20°C'de depolanan domuz etinde *Listeria*'nın inaktivasyonunu incelenmiş, nisin iki paket tipinde de gelişmeyi inhibe ettiği belirlenmiştir ancak inhibisyon 4°C'de daha belirgindir, artan nisin ve CO₂ konsantrasyonu inhibisyon düzeyinde de artan etkiye neden olmuştur (Fang ve Lo, 1994) ki bizim bulgularımızda da kıymada nisin konsantrasyonunun artışı, *Listeria* inhibisyonunu artırmıştır.

Hye ve diğ.'nin (2001) çalışmasında laktokok bakteriosinleri sığır kıymasına ilave edilerek vakum veya modifiye atmosferle paketlenmiştir. 3 log₁₀/g düzeyindeki *L. monocytogenes* inokulasyonundan sonra 0 veya 100 AU (30 IU)/g nisin veya lacticin ilave edilerek paketlenmiş ve 4°C'de depolanmıştır. Depolama sırasında patojen sayısı kontrolde artarken, bakteriosin - muamelilerde sürekli olarak düşmüştür.

Yine sığır kıymasında nisin tek ve kekik esansiyel yağı ile kombine kullanımında, % 0,6 esansiyel yağın 1000 IU/g nisinle kombinasyonu, 4°C'lik depolama sırasında, *L. monocytogenes*'i 2,0 log₁₀ kob/g olarak saptanan Avrupa Birliği resmi limitinin altına düşürmüştür. Bu çalışmada nisin kıymaya 500 ve 1000 IU/g düzeylerinde tek başına ilave edildiğinde 4 ve 10°C'lik depolamaların 2.gününde sırasıyla 1 ve 1,5

$\log_{10}$ düzeylerinde indirgeme meydana getirmişlerdir. Ancak 1000 IU/g nisin ilavesinde 6. günden itibaren *Listeria* sayıları artarak 4,4 $\log_{10}$ 'a ulaşmıştır (Solomakos ve diğ., 2008). Bizim çalışmamızda da 6. günde muamele örneklerinde bakteri sayısı başlangıç inokulasyon düzeylerine yakındır. Solomakos ve diğ., kıymada nisin antimikrobiyal aktivitesinin konsantrasyon ve suşa bağımlı olduğunu bildirmiştir.

Lopez-Mendoza ve diğ.'nin (2007) çalışmasında ise domuz kıymasına *L. monocytogenes* inokule edilerek, nisin ve laktik asit tek ve kombine olarak ilave edildikten sonra aerobik ve MAP (%30 CO₂ + %70 O₂) paketlenerek 4°C'de (MAP 21 gün, aerobik 7 gün) depolanmış, aerobik örneklerde en iyi indirgenme 500 ppm nisin ve % 2,0 laktik asit kombinasyonu ile sağlanırken, MAP örneklerinde nisin + % 2,0 laktik asitle 3,95 $\log_{10}$ düzeyinde indirgenme sağlanmıştır. Bu çalışmada aerobik paketlerde 300 ve 500 ppm nisin tek başına 5. günden sonra antilisterial etki göstermemiştir. Burada nisin ilaveli modifiye atmosfer paketlenmiş örneklerde 3. günde bakteriyel sayılarda 1 $\log_{10}$ kadar azalma gözlenmiş ve 7. günde ise hafifçe artmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer biçimde nisin ilaveli örneklerde ilk gün sonunda sağlanan indirgenmelerden sonra 6 gün boyunca sayılarda hafifçe artış gözlenmiş, ancak bu artış MAP ta biraz daha sınırlı düzeyde olmuştur.

Pawar ve diğ.'nin (2000) çalışmasında, buffalo eti kıymasında 400 ve 800 IU/g nisin (Nisaplin)in % 2,0 NaCl ile kombinasyonu, inokule edilen 10³ kob/g *L. monocytogenes* in 4°C'de depolanması sırasında inhibisyonunda önemli etkide (listeriostatik) bulunmuştur. Kontrolde 16 gün sonunda 6,4 $\log_{10}$ olan sayı, 800 IU/g nisin + %2 NaCl ilavesi ile 3,8 $\log_{10}$ kadardır. Bizim çalışmamızda yaklaşık 4,0 $\log_{10}$ olan başlangıç *Listeria* sayısı 4°C'de 6 gün depolama sonunda kontrol aerobik pakette 5,50 $\log_{10}$ a ulaşırken, 250 ppm nisin (10000 IU/g) modifiye atmosfer ile kombinasyonunda 3,0 $\log_{10}$ bulunmuştur.

Çalışmamızda paketlerin atmosfer bileşimleri ölçülmüştür (Çizelge 4.10). Buna göre aerobik paketlerde, kontrol ve nisin ilaveli paketlerin bileşimleri birbirine yakın olup başlangıç oksijen oranı fazla değişmemiştir. MAP paketlerinde oksijen oranı çok düşük olup CO₂ oranları kontrol ve nisin ilaveli örneklerde birbirine yakındır ve depolama süresince değişim gözlenmemiştir. Soğuk depolamadaki sınırlı mikrobiyal faaliyet nedeni ile paket atmosfer bileşimleri fazla değişmemiştir.

Çizelge 4.10: Kıymaya valisin (nisin) ilavesi ile 4°C’de depolanması sonucu 2 paket atmosferi bileşiminde meydana gelen değişimler (ortalama).

Nisin (ppm)	Gün	Paket Atmosferi Bileşimi (%)			
		Aerobik		MAP	
		O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
Kontrol	1	18,55	0,40	0,56	65,00
	3	18,65	0,30	0,85	61,20
	6	19,55	0,40	0,13	65,05
73	1	18,55	0,40	0,00	66,60
	3	19,05	0,40	0,02	64,50
	6	19,00	0,40	0,00	65,70
250	1	18,45	0,35	0,02	66,40
	3	18,30	0,30	0,05	64,75
	6	18,95	0,35	0,00	64,95

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada nisin TSB (Tryptic Soy Broth) ortamında Gram(-) patojen bakteriler olan *Salmonella enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'nin gelişimi üzerinde çelatlama ajanı EDTA varlığında antimikrobiyal etkisi belirlenmemiştir. Ancak pH, bakterilerin gelişiminde etkili bir faktör olarak belirlenmiştir. EDTA (20 mM) tek başına kullanıldığında 5,22 pH'da bu patojenler üzerinde bakteristatik etki göstermiştir.

Nisin, TSB ortamında Gram(+) patojen bir bakteri olan *Listeria monocytogenes* üzerinde (73 - 500 ppm) tek başına 3,44 - 5,22 pH'da kuvvetli bakterisit etkili bulunmuştur (4 log₁₀ inaktivasyon). Besiyeri pH'sı nisin etkinliğinde önemli rol oynamıştır ve 5,22'den yüksek pH değerlerinde (pH: 6,48 ve 7,0) bu etki gözlenmemiştir.

Sodyum laktat (NaL) TSB besiyeri ortamında % 2 ve 4 (w/v) oranında kullanıldığında 5 log₁₀ kob/ml düzeyindeki patojen bakteriler üzerinde önemli bir inhibisyona neden olmamıştır.

Greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE) in-vitro ortamda 60 - 300 ppm konsantrasyonda (pH:6,0) her 3 patojen bakteride (*S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*; ~5,0 log₁₀ kob/ml) 35°C'de birinci saatte ve 24 saat sonra tam bir inaktivasyon sağlamıştır. Başlangıçta yaklaşık 5 log₁₀ kob/ml düzeyindeki *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7, 60 ppm GFSE ile ilk 10 dakikada ölmektedir. *L. monocytogenes* ise daha duyarlı olup ilk dakikada canlılığını yitirmiştir.

Engeller teknolojisi kapsamında tavuk kıymasında gerçekleştirilen çalışmada test organizmaları (*S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*; her bakteri ~5,0 log₁₀ kob/g) üzerinde farklı sıcaklıklarda (4 ve 10°C) antimikrobiyaller ve MAP tekniğinin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Buna göre ilk denemede 300 - 2000 ppm GFSE ilavesinin patojenler üzerinde 4°C'deki etkisine paketlenme faktörü dikkate alınmadan bakılmıştır. GFSE'nin 2000 ppm ilavesi ile 6 gün sonunda *S. enteritidis*'de kontrole göre <0,5 log₁₀, *L. monocytogenes*'de 1 log₁₀ ve 3. günde *E. coli* O157:H7'de 0,5 log₁₀ seviyesinde azalma gözlenmiştir.

Daha yüksek sıcaklık (10°C) derecesinde farklı iki ambalajlama uygulamasında GFSE'nin 3000 ve 6000 ppm gibi 2 düzeyi tavuk kıymasına ilave edilmiş ve test organizmaları üzerindeki inhibisyon etkisi 6 gün süreyle izlenmiştir. Deneme bulguları değerlendirildiğinde, 6000 ppm GFSE, MAP ile kombine edildiğinde 6 gün sonunda MAP-kontrole göre *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 sayıları 2 log₁₀, *L. monocytogenes* ise 4 log₁₀ kadar indirgenmiştir. İnhibisyonda, 6000 ppm GFSE'nin daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Taze ette patojenlerin yüksek sayılarda bulunabilmesi ve/veya soğuk zincirin kırılması olasılığına karşı GFSE'nin MAP'la birlikte kullanımı gıda güvenliği açısından etkin bir uygulama olacaktır.

Kıymada 6000 ppm GFSE'nin sarımsak tozu ve tuz gibi antimikrobiyal etkinlikleri bilinen ve et ürünleri formülasyonlarında kullanılan maddelerle kombinasyonlarının 10°C'de 6 günlük depolanmasında patojenlere etkileri iki paket tipinde de (aerobik - MAP) incelenmiştir. *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7'in inhibisyonunda GFSE, NaCl, ve paket tipi önemli iken *L. monocytogenes* için bunlara ilaveten sarımsak tozu önemli inhibisyon etkisi göstermiştir (p<0,05). MAP paketlemede GFSE ilavesi *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 için ilk 3 gün etkin olmuş ancak 10°C'de 6. günde etkinliği gözlenmemiştir. Ancak *L. monocytogenes* için 6 gün boyunca etkindir. Aerobik paketlemede GFSE ilavesi *Salmonella* ve *E. coli* için 6 gün boyunca etkinlik göstermiş, ancak *Listeria*'nın GFSE ile inhibisyonu daha güçlü olmuştur.

GFSE'nin kıymaya 6000 ppm ilavesinin, 4°C'de iki paket tipinde patojenlere etkisi incelendiğinde ise *Salmonella* için ilk gün antimikrobiyal ile sağlanan inhibisyon 6 gün boyunca devam etmiştir, bu sıcaklıkta MAP paketleme ilave bir katkı sağlamamıştır. *E. coli* O157:H7 için antimikrobiyal madde özellikle ilk 3 günde daha etkili bulunmuş, benzer biçimde MAP'ın önemli bir etkisi olmamıştır. *Listeria* için 6000 ppm GFSE ilave edildiğinde 6. gün sonunda aerobik pakette bakteri sayısı MAP'tan sadece 0,5 log₁₀ kadar yüksektir. GFSE ve MAP kombinasyonu 6 gün sonunda *Listeria* sayısında kontrol-aerobik paketlere göre 3 log₁₀ inhibisyon sağlamıştır.

Tavuk kıymasına nisin ilavesi (250 ppm) ve MAP tekniğinin birlikte uygulandığı denemede soğuk depolamada (4°C) *L. monocytogenes*'in gelişimi kontrol altına alınmıştır. Yaklaşık 4,0 log₁₀/g olan başlangıç *Listeria* sayısı 4°C'de 6 gün depolama

sonunda kontrol-aerobik pakette 5,50 log₁₀'a ulaşırken, 250 ppm nisinin (10000 IU/g) modifiye atmosfer ile kombinasyonunda 3,0 log₁₀/g seviyesinde kalmıştır.

Greyfurt çekirdek ekstraktı (GFSE) geniş spektrumlu bir antimikrobiyal olup kıymada hem Gram(+), hem de Gram(-) patojen bakteriler üzerinde etkin olmuştur. GFSE gıda muhafazasında bilinen yeni doğal antimikrobiyal maddelerden biri olduğu için çeşitli gıda gruplarında patojenler için etkin olduğu dozlarda organoleptik özelliklere etkisi de belirlenmelidir Ayrıca gıdanın kimyasal bileşiminin antimikrobiyal aktiviteye etkisi nedeniyle model sistemlerde yapılacak araştırmaların bilimsel literatüre katkısı olacaktır. GFSE, içeriğindeki fenolik bileşiklerle antioksidant aktivite de gösterebilir. Bu kapsamda et ve et ürünlerinde renk ve aroma stabilitesini artırmak amacıyla kullanılan sitrik asit, askorbik asit, vitamin E gibi antioksidant vitaminler ve biberiye, oregano(yabani mercanköşk), adaçayı, borage (hodan), kırmızı biber, domates ve yeşil çay kaynaklı bitkisel ekstraktlar gibi diğer doğal antioksidantlarla karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilir.

Doğal antimikrobiyal maddelerin günümüzde hızla gelişen ısı olmayan yöntemler (hidrostatik basınç, darbeli elektrik alanları, ışınlama vd.) veya diğer antimikrobiyal maddeler ile kombine edilen sistemlerde kullanımı gıdanın besin değerini korurken güvenliğini artıracaktır.

KAYNAKLAR

- Abee T., Krockel and L., Hill, C.,** 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, **28**, 169-185.
- Acar, J., Karapınar, M., Temiz, A., Aktuğ Gönül, Ş. ve Tunçel, G.,** 1998. *Gıda Mikrobiyolojisi*. Eds. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., Mengi Tan Basımevi, İzmir.
- Ahn, J., Grün, I.U. and Mustapha, A.,** 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in-vitro and in ground beef. *Journal of Food Protection*, **67**, 148-155.
- Anon.,** 1996. ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), “*Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*”.p.217-225. Blackie Academic and Professional, London.
- Bacon, R.T. and Sofos, J.N.,** 2003. *Food Safety Handbook*. Ch.10., Eds. Schmidt, R.H. and Rodrick, G.E., Wiley-Interscience A John Wiley and Sons Inc., New Jersey
- Barboza, de M.Y., Ferrer, K. and Salas, E.M.,** 2002. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of Food Protection*, **65**, 1780-1783.
- Bem, Z. and Hechelmann, H.,** 1995. Chilling and refrigerated storage of meat. *Fleischwirtschaft*, 75, 439-444.
- Bell, C. and Kyriakides, A.,** 2002. *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Ch.10-12, Eds. Blackburn, C. de W. and McClure, P., CRC Press, New York, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Bogaert, J-C. and Naidu, A.S.,** 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*.Ch. 22, Ed. Naidu, A.S., CRC Press, New York.
- Boziaris, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M. and Nychas, G.-J.E.,** 2007. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 796-805.
- Boziaris, I.S. and Adams, M.R.,** 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gr-negatives. *International Journal of Food Microbiology*, **53**, 105-113.
- Boziaris, I.S. and Nychas, G.-J.E.,** 2006. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. *Food Microbiology*, **23**, 779-784.

- Brewer, M.S., Rostogi, B.K., Argoudelis, L. and Sprouls, G.K., 1995.** Sodium lactate/Sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. *Journal of Food Science*, **60**, 58-62.
- Buchanan, R.L. and Doyle, M.P., 1997.** Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology*, **51**, 69-76.
- Carneiro De Melo, A.M.S., Cassar, C.A. and Miles, R.J., 1998.** Trisodium phosphate increases sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *Journal of Food Protection*, **61**, 839-844.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001.** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 1-20.
- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R., 1995.** Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection*, **58**, 977-983.
- Dawson, P.L., 2003.** *Natural Antimicrobials for the Minimally Processing of Foods*. Ch.3. Ed. Roller, S., Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge.
- Delves-Broughton, J., 1987.** Nisin in food preservation. *Nordeuropæisk mejeritidsskrift*, **1**, 1-8.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J., 2004.** New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, **14**, 273-285.
- Donnelly, C.W., 2001.** *Guide to foodborne pathogens*. Eds. Labbe, R.G. and Garcia, S., Wiley-Interscience John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Dykes, G.A., Moorhead, S.M. and Roberts, S.L., 2001.** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on chill-stored vacuum or carbon dioxide packaged primal beef cuts. *International Journal of Food Microbiology*, **64**, 401-405.
- Egbert, W.R., Huffman, D.L., Bradford, D.D. and Jones, W.R., 1992.** Properties of low-fat ground beef containing potassium lactate during aerobic refrigerated storage. *Journal of Food Science*, **57**, 1033-1037.
- El-Khateib, T., Yousef, A.E. and Ockerman H.W., 1993.** Inactivation and attachment of *Listeria monocytogenes* on beef muscle treated with lactic acid and selected bacteriocins. *Journal of Food Protection*, **56**, 29-33.
- Fang, T.J. and Lo, W.L., 1994.** Inactivation of *Listeria monocytogenes* on raw pork treated with modified atmosphere packaging and nisin. *Journal of Food and Drug Analysis*, **2**, 189-200.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L. and Omar, N.B., 2007.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, **120**, 51-70.

- Gill, A.O. and Holley, R.A.,** 2000. Surface applications of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. *Journal of Food Protection*, **63**, 1338-1346.
- Gill, A.O. and Holley, R.A.,** 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *International Journal of Food Microbiology*, **80**, 251-259.
- Glass, K.A., Granberg, D.A., Smith, A.L., McNamara, A.M., Hardin, M., Mattias, J., Ladwig, K. and Johnson, E.A.,** 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. *Journal of Food Protection*, **65**, 116-123.
- Heggers, J.P., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., Cox, R. and Zhao, J.G.,** 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in-vitro toxicity. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **8**, 333-340.
- Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Beumer, R.R. and De Boer, E.,** 1999. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in meats obtained from retail outlets in the Netherlands. *Journal of Food Protection*, **62**, 1115-1122.
- Houtsma, P.C., Wit, J.C. de and Rombouts, F.M.,** 1993. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, **20**, 247-257.
- Hye, J.P., Na, K.L., Jin, O.C., Jung, U.H. and Hyun, D.P.,** 2001. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactococcal bacteriocins. *Food Science and Biotechnology*, **10**, 199-203.
- Ji-Yeun, K., Sangryul, R. and Geun, E.J.,** 2007. Effects of sulforaphane, grapefruit seed extracts, and reuterin on virulence gene expression using hila and invF fusion strains of *Salmonella typhimurium*. *Food Science and Biotechnology*, **16**, 778-782.
- Koo, B.C., Wha, Y.K. and Kwang, H.K.,** 2005. Physicochemical and textural properties, and antimicrobial effects of low-fat comminuted sausages manufactured with grapefruit seed extract. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **25**, 141-148.
- Koos, Ir.J.T. de.,** 1992. Lactic acid and lactates. *International Food Marketing and Technology*, **6**, 5-11.
- Kuo, W.L. and Shu, N.L.,** 2002. Effects of sodium lactate and trisodium phosphate on the physicochemical properties and shelf life of low-fat Chinese-style sausage. *Meat Science*, **60**, 147-154.
- Leistner, L.,** 1992. Food preservation by combined methods. *Food Research International*, **25**, 151-158.

- Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Gariépy, C., Rodrigue, N. and Saucier, L.,** 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 217-226.
- Llorca, N.G. and Sheldon, B.W.,** 1995. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on fresh pork loin using a nisin-based treatment. IAMFES Annual meeting, poster, 6-9 July.
- Lopez-Mendoza, M. C., Ruiz, P. and Mata, C. M.,** 2007. Combined effects of nisin, lactic acid and modified atmosphere packaging on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw ground pork. *International Journal of Food Science and Technology*, **42**, 562-566.
- Maas, M.R., Glass, K.A. and Doyle, M.P.,** 1989. Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 2226-2229.
- Maca, J.W., Miller, R.K., Bigner, M.E., Lucia, L.M. and Acuff, G.R.,** 1999. Sodium lactate and storage temperature effects on shelf life of vacuum packaged beef top rounds. *Meat Science*, **53**, 23-29.
- Mbandi, E. and Shelef, L.A.,** 2001. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. *Journal of Food Protection*, **64**, 640-644.
- Miller, R.K. and Acuff, G.R.,** 1994. Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *Journal of Food Science*, **59**, 15-19.
- Neetoo, H., Ye, H. and Chen, H.,** 2008. Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pâté and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, **123**, 220-227.
- Nychas, G-J.E. and Tassou, C.C.,** 1996. Growth/survival of *Salmonella enteritidis* on fresh poultry and fish stored with vp/map. *Letters in Applied Microbiology*, **23**, 115-119.
- Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Gasson, M.J. and Narbad, A.,** 2003. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 448-451.
- Ölmez-Kaptan, H.,** 2004. Modeling the Growth Kinetics of *Bacillus cereus* as a Function of Temperature, pH, Sodium Lactate and Sodium Chloride Concentrations. Doktora tezi. Danışman: Prof. Dr. Necla Aran. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pawar, D.D., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N. and Barbuddhe, S.B.,** 2000. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *L. monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Science*, **56**, 215-219.
- Proctor, V.A. and Cunningham, F.E.,** 1993. The antimicrobial properties of lysozyme alone and in combination with other additives in-vitro and in selected meat products. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **1**, 315-328.

- Ray, B.**, 1996. Characteristics of microorganisms in food in: *Fundamental Food Microbiology*. Ch.2. p.11-32. Boca Raton : CRC Press.
- Rozbeh, M., Kalchaynand, N., Field, R.A., Johnson, M.C. and Ray, B.**, 1993. The influence of biopreservatives on the bacterial level of refrigerated vacuum packaged beef. *Journal of Food Safety*, **13**, 99-111.
- Sakamoto, S., Sato, K., Maitani, T. and Yamada, T.**, 1996. Analysis of components in natural food additive 'grapefruit seed extract' by HPLC and LC/MS. *Eisei Shikenjo Hokoku*, **114**, 38-42.
- Schlundt, J.**, 2002. New directions in foodborne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 3-17.
- Shefet, S.M., Sheldon, B.W. and Klaenhammer, T.R.**, 1995. Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Salmonella typhimurium* and extended shelf life of broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, **58**, 1077-1082.
- Shelef, L.A.**, 1994. Antimicrobial effects of lactates: A review. *Journal of Food Protection*, **57**, 445-450.
- Shelef, L.A. and Potluri, V.**, 1995. Behaviour of foodborne pathogens in cooked liver sausage containing lactates. *Food Microbiology*, **12**, 221-227.
- Sivarrooban, T., Hettiarachchy, N.S. and Johnson, M.G.**, 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using nisin with grape seed extract on turkey frankfurters stored at 4 and 10 degrees C. *Journal of Food Protection*, **70**, 1017-1020.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E.**, 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 35-45.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N.**, 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, **25**, 120-127.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R.**, 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. *Journal of Food Protection*, **55**, 763-766.
- Takeoka, G., Dao, L., Wong, R.Y., Lundin, R. and Mahoney, N.**, 2001. Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3316-3320.
- Tan, W. and Shelef, L.A.**, 2002. Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork. *Meat Science*, **62**, 27-32.
- Tauxe, R.V.**, 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 31-41.
- Url-1**<<http://www.peyma-hansen.com.tr/makale.asp>>, alındığı tarih 18.10.2005.
- Url-2**<<http://www.salmonella.org/info.html>>, alındığı tarih 2006.

- Url-3**<<http://www.health.enotes.com/alternative-medicine-encyclopedia/grapefruit-seed-extract>>, alındığı tarih 2006.
- Url-4**<<http://www.geocities.com/HotSprings/Spa/grapefruit.html>> alındığı tarih 2006.
- Url-5**<<http://www.dairyscience.info/map-science.asp>> alındığı tarih 8.8.2008.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M.E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W. and Oliver, G.,** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology*, **41**, 410-416.
- Walczyska, M., Kolczak, T., Kijowski, A. and Lacki, J.,** 1998. Effect of sodium lactate and starter culture on minced beef during chilled storage. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **7**, 663-672.
- Wit, J.C. de and Rombouts, F.M.,** 1990. Antimicrobial activity of sodium lactate. *Food Microbiology*, **7**, 113-120.
- Wu, V.C.H. and Fung, D.Y.C.,** 2001. Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. *Food Microbiology and Safety*, **66**, 580-583.
- Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H. and Luo, Y.B.,** 2007. Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, **45**, 126-133.
- Xu, X.L., Lu, F.X. and Feng, D.Y.,** 2000. Effects of nisin, sodium lactate and microwaves on the shelf life of Nanjing salted duck. *Science & Technology of Food Industry*, **21**, 39-41.
- Yin, M.C. and Cheng, W.S.,** 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, **63**, 23-28.
- Yong, W.L., Jae, H.C. and Won, H.Y.,** 2005. Growth inhibitory effect of grapefruit seed extract on foodborne pathogens in kanjang paste and kochujang paste. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **25**, 513-520.
- Zhang S. and Mustapha A.,** 1999. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *Journal of Food Protection*, **62**, 1123-1127.

EKLER

EK A.

Çizelge A.1: Farklı pH ve nisin konsantrasyonlarında, 20 mM EDTA varlığında *S. enteritidis* sayılarındaki değişimler.

Nisin (ppm)	pH	<i>S. enteritidis</i> (log ₁₀ kob/ml)		Bakteri Sayısındaki Değişim (log ₁₀ N-log ₁₀ N ₀)
		Süre (saat)		
		0	24	
427	6,48	5,58	7,85	2,27
73	6,48	5,58	7,96	2,38
250	5,22	5,58	5,04	-0,54
250	3,44	5,58	2,41	-3,17
250	5,22	5,58	5,36	-0,22
250	5,22	5,58	5,28	-0,30
250	5,22	5,58	5,34	-0,24
427	3,96	5,58	4,08	-1,50
250	5,22	5,58	5,35	-0,23
0	5,22	5,58	5,59	-0,01
500	5,22	5,58	5,59	-0,01
250	7,00	5,58	8,29	2,71
73	3,96	5,58	2,88	-2,70

Çizelge A.2: *S. enteritidis*'in nisinle inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Regresyon	5	37,7577	7,5515	148,68	0,000
Lineer	2	36,9806	18,4903	364,04	0,000
Kare	2	0,3481	0,1740	3,43	0,092
İnteraksiyon	1	0,4290	0,4290	8,45	0,023
Rezidü hata	7	0,3555	0,0508		
Uygunsuzluk	3	0,2832	0,0944	5,22	0,072
Salt hata	4	0,0723	0,0181		
Toplam	12	38,1133			

Çizelge A.3: *S. enteritidis*'in nisinle inhibisyon denemesine ait regresyon katsayıları ve P değerleri.

	Regresyon Katsayısı	Standart Hata	T	P
Sabit	5,2740	0,10079	52,327	0,000
Nisin	0,1363	0,07968	1,710	0,131
pH	2,1457	0,07968	26,929	0,000
Nisin*Nisin	0,2136	0,08545	2,500	0,041
pH*pH	0,0936	0,08545	1,096	0,309
Nisin*pH	-0,3275	0,11269	-2,906	0,023

S = 0.2254 R-Sq = 99.1% R-Sq(adj) = 98.4%

Çizelge A.4: Farklı pH ve nisin konsantrasyonlarında, 20 mM EDTA varlığında *E. coli* O157: H7 sayılarındaki değişimler.

Nisin (ppm)	pH	<i>E. coli</i> O157:H7 (log ₁₀ kob/ml)		Bakteri Sayısındaki Değişim (log ₁₀ N-log ₁₀ N ₀)
		Süre (saat)		
		0	24	
427	6,48	5,59	7,15	1,56
73	6,48	5,59	8,14	2,55
250	5,22	5,59	4,46	-1,13
250	3,44	5,59	1,00	-4,59
250	5,22	5,59	4,63	-0,96
250	5,22	5,59	5,30	-0,29
250	5,22	5,59	4,55	-1,04
427	3,96	5,59	4,96	-0,63
250	5,22	5,59	4,36	-1,23
0	5,22	5,59	5,18	-0,41
500	5,22	5,59	4,98	-0,61
250	7,00	5,59	7,46	1,87
73	3,96	5,59	5,10	-0,49

Çizelge A.5: *E. coli* O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Regresyon	5	29,1015	5,8203	4,96	0,029
Lineer	2	26,0466	13,0233	11,10	0,007
Kare	2	2,8742	1,4371	1,23	0,350
İnteraksiyon	1	0,1806	0,1806	0,15	0,706
Rezidü hata	7	8,2109	1,1730		
Uygunsuzluk	3	7,6583	2,5528	18,48	0,008
Salt hata	4	0,5526	0,1381		
Toplam	12	37,3123			

Çizelge A.6: *E. coli* O157:H7'nin nisinle inhibisyon denemesine ait regresyon katsayıları ve P değerleri.

	Regresyon Katsayısı	Standart Hata	T	P
Sabit	4,6600	0,4844	9,621	0,000
Nisin	-0,1766	0,3829	-0,461	0,659
pH	1,7957	0,3829	4,690	0,002
Nisin*Nisin	0,6306	0,4106	1,536	0,168
pH*pH	0,2056	0,4106	0,501	0,632
Nisin*pH	-0,2125	0,5415	-0,392	0,706

S = 1,083 R-Sq = 78,0% R-Sq(adj) = 62,3%

Çizelge A.7: Farklı pH ve nisin konsantrasyonlarında *L. monocytogenes* sayılarında değişim.

Nisin (ppm)	pH	<i>L. monocytogenes</i> (log ₁₀ kob/ml)		Bakteri Sayısındaki Değişim (log ₁₀ N-log ₁₀ N ₀)
		Süre (saat)		
		0	24	
427	6,48	5,04	8,45	3,41
73	6,48	5,04	8,74	3,70
250	5,22	5,04	1	-4,04
250	3,44	5,04	1	-4,04
250	5,22	5,04	1	-4,04
250	5,22	5,04	1	-4,04
250	5,22	5,04	1	-4,04
427	3,96	5,04	1	-4,04
250	5,22	5,04	1	-4,04
0	5,22	5,04	8,30	3,26
500	5,22	5,04	1	-4,04
250	7,00	5,04	8,87	3,83
73	3,96	5,04	1	-4,04

Çizelge A.8: Farklı NaL konsantrasyonunda 24 saat sonunda patojen bakteri sayıları.

NaL (% w/v)	Patojen Bakteri Sayısı (log ₁₀ kob/ml)					
	<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>	
	Süre (saat)					
	0	24	0	24	0	24
Kontrol	5,90	8,76	5,12	8,20	5,21	6,97
	5,88	8,18	4,65	7,20	4,32	6,06
2	5,90	8,55	5,12	8,24	5,21	7,98
	5,88	8,66	4,65	8,21	4,32	6,21
4	5,90	8,16	5,12	7,84	5,21	7,39
	5,88	8,34	4,65	6,36	4,32	5,11

Çizelge A.9: *S. enteritidis*'in sodyum laktatla inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
NaL	2	0,12843	0,06422	1,01	0,462
Hata	3	0,19045	0,06348		
Toplam	5	0,31888			

Çizelge A.10: *E. coli* O157:H7'nin sodyum laktatla inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
NaL	2	1,2675	0,6338	1,19	0,416
Hata	3	1,5956	0,5319		
Toplam	5	2,8631			

Çizelge A.11: *L. monocytogenes*'in sodyum laktatla inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
NaL	2	0,747	0,374	0,24	0,797
Hata	3	4,580	1,527		
Toplam	5	5,327			

Çizelge A.12: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 1 saat içinde farklı sürelerde *S. enteritidis* sayıları.

GFSE (ppm)	Süre (dak.)	<i>Salmonella enteritidis</i> (log ₁₀ kob/ml)	
		1.Tekrar ⁽¹⁾	2.Tekrar ⁽²⁾
Kontrol	0,5	-(³)	5,44
Kontrol	10	-	5,42
Kontrol	20	-	5,43
Kontrol	40	5,27	5,42
Kontrol	60	5,28	5,44
30	0,5	5,23	5,49
30	10	5,25	5,11
30	20	5,20	5,05
30	40	5,20	4,90
30	60	5,06	4,77
60	0,5	5,30	5,38
60	10	1	1
60	20	1	1
60	40	1	1
60	60	1	1
150	0,5	4,77	4,32
150	10	1	1
150	20	1	1
150	40	1	1
150	60	1	1
300	0,5	4,79	3,33
300	10	1	1
300	20	1	1
300	40	1	1
300	60	1	1

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,35 log₁₀ ⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,40 log₁₀

⁽³⁾Sayım yapılamadı.

Çizelge A.13: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 24 saat sonunda *S. enteritidis* sayıları.

GFSE (ppm)	<i>Salmonella enteritidis</i> (log ₁₀ kob/ml)	
	1.Tekrar ⁽¹⁾	2.Tekrar ⁽²⁾
Kontrol	8,78	8,40
30	1,14	3,18
60	1	1
150	1	1
300	1	1

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,35 log₁₀ ⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,40 log₁₀

Çizelge A.14: *S. enteritidis*'in GFSE ile 1 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	4	149,3993	37,3498	693,77	0,000
Süre	4	40,6102	10,1526	188,58	0,000
GFSE*Süre	16	24,8354	1,5522	28,83	0,000
Hata	25	1,3459	0,0538		
Toplam	49	216,1908			

Çizelge A.15: *S. enteritidis*'in GFSE ile 24 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	4	87,282	21,821	50,67	0,000
Hata	5	2,153	0,431		
Toplam	9	89,435			

Çizelge A.16: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 1 saat içinde farklı sürelerde *E. coli* O157:H7 sayıları.

GFSE (ppm)	Süre (dak.)	<i>E. coli</i> O157:H7 (log ₁₀ kob/ml)	
		1.Tekrar ⁽¹⁾	2.Tekrar ⁽²⁾
Kontrol	0,5	5,06	5,40
Kontrol	10	5,04	5,39
Kontrol	20	5,06	5,37
Kontrol	40	5,07	5,33
Kontrol	60	4,92	5,38
30	0,5	4,32	5,37
30	10	3,24	5,25
30	20	2,71	5,10
30	40	2,15	4,50
30	60	1,81	4,20
60	0,5	4,10	5,18
60	10	1	1
60	20	1	1
60	40	1	1
60	60	1	1
150	0,5	3,10	5,37
150	10	1	1
150	20	1	1
150	40	1	1
150	60	1	1
300	0,5	1,78	5,22
300	10	1	1
300	20	1	1
300	40	1	1
300	60	1	1

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,04 log₁₀ ⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,42 log₁₀

Çizelge A.17: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 24 saat sonunda *E. coli* O157:H7 sayıları.

GFSE (ppm)	<i>E. coli</i> O157:H7 (log ₁₀ kob/ml)	
	1.Tekrar ⁽¹⁾	2.Tekrar ⁽²⁾
Kontrol	8,08	8,42
30	1,40	1
60	1	1
150	1	1
300	1	1

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi: 5,04 log₁₀ ⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi: 5,42 log₁₀

Çizelge A.18: *E. coli* O157:H7'nin GFSE ile 1 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	4	110,7175	27,6794	33,87	0,000
Süre	4	36,6045	9,1511	11,20	0,000
GFSE*Süre	16	15,6220	0,9764	1,19	0,336
Hata	25	20,4278	0,8171		
Toplam	49	183,3719			

Çizelge A.19: *E. coli* O157:H7'nin GFSE ile 24 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	4	83,004	20,751	752,94	0,000
Hata	5	0,138	0,028		
Toplam	9	83,142			

Çizelge A.20: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 1 saat içinde farklı sürelerde *L. monocytogenes* sayıları.

GFSE (ppm)	Süre (dak.)	<i>L. monocytogenes</i> (log ₁₀ kob/ml)	
		1.Tekrar ⁽¹⁾	2.Tekrar ⁽²⁾
Kontrol	0,5	5,65	4,47
Kontrol	10	5,17	4,47
Kontrol	20	5,27	4,54
Kontrol	40	5,34	4,00
Kontrol	60	5,34	4,00
30	0,5	3,17	2,20
30	10	1	1
30	20	1	1
30	40	1	1
30	60	1	1
60	0,5	1	1
60	10	1	1
60	20	1	1
60	40	1	1
60	60	1	1
150	0,5	1	1
150	10	1	1
150	20	1	1
150	40	1	1
150	60	1	1
300	0,5	1	1
300	10	1	1
300	20	1	1
300	40	1	1
300	60	1	1

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,20 log₁₀ ⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi:4,32 log₁₀

Çizelge A.21: Farklı konsantrasyonlarda GFSE varlığında 24 saat sonunda *L. monocytogenes* sayıları.

GFSE (ppm)	<i>L. monocytogenes</i> (log ₁₀ kob/ml)	
	1.Tekrar ⁽¹⁾	2.Tekrar ⁽²⁾
Kontrol	8,94	6,70
30	4,08	3,11
60	1	1
150	1	1
300	1	1

⁽¹⁾Başlangıç bakteri düzeyi:5,20 log₁₀ ⁽²⁾Başlangıç bakteri düzeyi:4,32 log₁₀

Çizelge A.22: *L. monocytogenes*'in GFSE ile 1 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	4	112,7975	28,1994	202,95	0,000
Süre	4	1,2692	0,3173	2,28	0,089
GFSE*Süre	16	3,4929	0,2183	1,57	0,151
Hata	25	3,4737	0,1389		
Toplam	49	121,0333			

Çizelge A.23: *L. monocytogenes*'in GFSE ile 24 saat inhibisyon denemesine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	4	71,036	17,759	29,80	0,001
Hata	5	2,979	0,596		
Toplam	9	74,015			

Çizelge A.24: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	3	0,63803	0,21268	18,27	0,000
Süre	2	0,00463	0,00232	0,20	0,822
GFSE*Süre	6	0,10277	0,01713	1,47	0,268
Hata	12	0,13970	0,01164		
Toplam	23	0,88513			

Çizelge A.25: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C'de tavuk kıymasında *S. enteritidis* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	3	0,37991	0,12664	4,37	0,027
Süre	2	0,10402	0,05201	1,79	0,208
GFSE*Süre	6	0,12858	0,02143	0,74	0,628
Hata	12	0,34785	0,02899		
Toplam	23	0,96036			

Çizelge A.26: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C’de tavuk kıymasında *E. coli* O157:H7 sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	3	0,29367	0,09789	7,50	0,010
Süre	1	1,35141	1,35141	103,61	0,000
GFSE*Süre	3	0,04837	0,01612	1,24	0,359
Hata	8	0,10435	0,01304		
Toplam	15	1,79779			

Çizelge A.27: Farklı konsantrasyonlarda (0-2000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 4°C’de tavuk kıymasında *L. monocytogenes* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	3	5,7406	1,9135	22,61	0,000
Süre	2	8,6057	4,3028	50,84	0,000
GFSE*Süre	6	1,0287	0,1715	2,03	0,140
Hata	12	1,0156	0,0846		
Toplam	23	16,3906			

Çizelge A.28: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında ve farklı iki ortam atmosferinde 10°C’de tavuk kıymasında toplam bakteri ve patojen organizma sayıları.

GFSE (ppm)	Süre (gün)	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (log ₁₀ kob/g)		Test Organizma Sayısı (log ₁₀ kob/g)					
				<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>	
		Aerobik	MAP ⁽¹⁾	Aerobik	MAP	Aerobik	MAP	Aerobik	MAP
Kontrol	0	5,34	5,34	4,90	4,90	4,48	4,48	3,00	3,00
		5,50	5,50	5,13	5,13	4,48	4,48	<3,00	<3,00
	3	7,70	6,11	6,50	5,91	7,14	5,30	6,15	4,69
		7,57	6,17	6,57	5,52	7,71	5,82	6,31	4,25
	6	8,78	7,89	8,29	6,60	8,69	6,91	7,68	6,38
		8,85	7,06	8,00	6,49	8,90	6,58	7,72	6,45
3000	0	4,46	4,46	3,30	3,30	3,90	3,90	2,00	2,00
		4,90	4,90	4,42	4,42	3,87	3,87	<2,00	<2,00
	3	6,68	5,04	5,69	4,69	6,19	4,60	3,17	<2,00
		6,97	5,47	5,53	5,22	6,87	5,39	4,90	2,78
	6	8,85	6,38	8,31	5,00	8,61	5,48	5,00	3,08
		8,60	6,86	7,84	5,68	8,23	5,72	6,40	3,74
6000	0	4,72	4,72	4,00	4,00	3,84	3,84	<2,00	<2,00
		4,40	4,40	3,60	3,60	<3,00	<3,00	<2,00	<2,00
	3	6,30	5,30	5,48	4,63	6,31	4,52	2,90	2,60
		6,52	5,72	4,95	4,34	6,42	5,57	<2,00	2,00
	6	8,30	5,90	7,17	4,30	8,24	4,87	5,76	2,00
		8,24	6,02	7,59	4,47	7,95	4,48	6,00	2,95

⁽¹⁾ %70 CO₂ + %30 N₂

Çizelge A.29: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında toplam aerobik mezofilik bakteri sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	2	5,6692	2,8346	47,20	0,000
Süre	2	45,6302	22,8151	379,87	0,000
Paket	1	10,4976	10,4976	174,78	0,000
GFSE*Süre	4	0,3061	0,0765	1,27	0,317
GFSE*Paket	2	0,1181	0,0590	0,98	0,393
Süre*Paket	2	5,7828	2,8914	48,14	0,000
GFSE*Süre*Paket	4	0,6742	0,1685	2,81	0,057
Hata	18	1,0811	0,0601		
Toplam	35	69,7593			

Çizelge A.30: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında *S. enteritidis* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	2	10,8006	5,4003	40,95	0,000
Süre	2	35,1404	17,5702	133,22	0,000
Paket	1	10,1018	10,1018	76,59	0,000
GFSE*Süre	4	0,6158	0,1539	1,17	0,358
GFSE*Paket	2	0,3062	0,1531	1,16	0,336
Süre*Paket	2	9,4285	4,7143	35,74	0,000
GFSE*Süre*Paket	4	0,8080	0,2020	1,53	0,235
Hata	18	2,3739	0,1319		
Toplam	35	69,5753			

Çizelge A.31: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında *E. coli* O157:H7 sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	2	7,1613	3,5807	26,85	0,000
Süre	2	60,6165	30,3082	227,28	0,000
Paket	1	18,8067	18,8067	141,03	0,000
GFSE*Süre	4	0,4875	0,1219	0,91	0,477
GFSE*Paket	2	0,1136	0,0568	0,43	0,660
Süre*Paket	2	11,5275	5,7637	43,22	0,000
GFSE*Süre*Paket	4	0,9804	0,2451	1,84	0,166
Hata	18	2,4003	0,1333		
Toplam	35	102,0938			

Çizelge A.32: Farklı konsantrasyonlarda (0-6000 ppm) GFSE varlığında farklı sürelerde 10°C’de tavuk kıymasında *L. monocytogenes* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	2	35,6786	17,8393	76,89	0,000
Süre	2	51,6955	25,8477	111,40	0,000
Paket	1	12,3318	12,3318	53,15	0,000
GFSE*Süre	4	5,4152	1,3538	5,83	0,003
GFSE*Paket	2	0,1330	0,0665	0,29	0,754
Süre*Paket	2	8,1210	4,0605	17,50	0,000
GFSE*Süre*Paket	4	3,7297	0,9324	4,02	0,017
Hata	18	4,1764			
Toplam	35	121,2811			

Çizelge A.33:Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesinin iki farklı ortam atmosferinde 10°C’de test organizmaları üzerine etkisi.

Muamele	Sarimsak Tozu (%w/w)	NaCl (%w/w)	GFSE (ppm)	Süre (gün)	Test Organizma Sayısı (log ₁₀ kob/g)					
					<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>	
					Aerobik	MAP ¹	Aerobik	MAP	Aerobik	MAP
1	0	0	0	0	5,46	5,46	5,66	5,66	4,09	4,09
				3	8,09	6,97	8,12	6,65	8,36	5,60
				6	8,93	7,30	8,69	7,00	9,13	6,48
2	0	0	6000	0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
				3	6,34	<2,0	6,35	<2,0	3,08	<2,0
				6	7,42	6,20	7,39	6,30	5,00	2,00
3	0	2	0	0	5,20	5,20	5,54	5,54	3,60	3,60
				3	6,06	5,84	6,20	5,78	6,60	5,84
				6	8,42	7,09	8,72	7,0	7,87	6,78
4	0	2	6000	0	2,90	2,90	2,50	2,50	<2,0	<2,0
				3	5,52	4,48	5,88	4,20	<2,0	<2,0
				6	6,17	5,30	6,00	5,00	4,08	<2,0
5	2	0	0	0	5,14	5,14	5,17	5,17	3,60	3,60
				3	7,89	6,06	7,28	6,06	7,17	5,00
				6	8,60	7,43	9,00	7,08	7,87	6,78
6	2	0	6000	0	3,15	3,15	3,13	3,13	<2,0	<2,0
				3	6,95	<3,0	7,16	<3,0	<2,0	<2,0
				6	8,09	6,69	8,48	5,95	3,84	<2,0
7	2	2	0	0	5,07	5,07	5,09	5,09	3,67	3,67
				3	7,99	5,48	7,90	5,3	6,65	4,17
				6	<8,0	<6,0	<8,0	<6,0	7,65	6,10
8	2	2	6000	0	3,02	3,02	2,90	2,90	<2,0	<2,0
				3	5,80	<3,0	5,84	<3,0	2,30	<2,0
				6	7,39	6,00	6,74	6,00	2,84	-(²)

(¹) %70 CO₂ + %30 N₂ (²) Sayım yapılamadı.

Çizelge A.34: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesinin iki farklı ortam atmosferinde 10°C’de test organizmaları üzerine etkisi (2.tekrar bulguları).

Muamele	Sarımşak Tozu (%w/w)	NaCl (%w/w)	GFSE (ppm)	Süre (gün)	Test Organizma Sayısı (log ₁₀ /g)					
					<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>	
					Aerobik	MAP ¹	Aerobik	MAP	Aerobik	MAP
1	0	0	0	0	5,04	5,04	5,66	5,66	4,88	4,88
				3	7,70	6,00	7,78	<6,0	<7,0	<5,0
				6	8,30	7,25	8,30	6,34	7,00	5,25
2	0	0	6000	0	3,13	3,13	3,94	3,94	<2,0	<2,0
				3	6,25	4,52	-(²)	5,06	4,13	2,98
				6	7,30	6,95	8,60	7,16	5,91	4,02
3	0	2	0	0	5,02	5,02	5,23	5,23	3,00	3,00
				3	5,87	4,81	7,52	5,81	5,60	<4,00
				6	7,00	6,48	8,02	6,30	6,90	4,85
4	0	2	6000	0	4,39	4,39	4,45	4,45	<2,00	<2,00
				3	5,04	4,60	6,33	4,87	3,02	<2,00
				6	6,65	6,96	8,08	6,92	4,75	-(²)
5	2	0	0	0	5,27	5,27	4,48	4,48	2,90	2,90
				3	6,57	5,81	7,95	6,22	5,43	4,60
				6	8,40	7,32	9,08	7,30	6,51	5,15
6	2	0	6000	0	3,29	3,29	4,16	4,16	2,95	2,95
				3	6,64	4,84	7,36	4,47	4,14	2,85
				6	8,00	7,68	9,24	7,92	6,12	4,00
7	2	2	0	0	5,40	5,40	5,45	5,45	3,00	3,00
				3	6,00	5,19	6,70	5,52	4,70	3,81
				6	7,54	5,54	7,90	5,65	6,73	4,23
8	2	2	6000	0	4,08	4,08	4,99	4,99	2,00	2,00
				3	5,45	5,01	6,29	5,28	2,00	<2,0
				6	6,85	5,70	7,98	6,04	-(²)	3,30

⁽¹⁾ %70 CO₂ + %30 N₂ ⁽²⁾Sayım yapılamadı.

Çizelge A.35: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesi ile 10°C’de depolanması ile *S. enteritidis* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Sarımsak	1	0,140	0,140	0,37	0,545
NaCl	1	4,620	4,620	12,25	0,001
GFSE	1	40,586	40,586	107,60	0,000
Süre	2	131,795	65,898	174,71	0,000
Paket	1	19,911	19,911	52,79	0,000
Sarımsak*NaCl	1	0,047	0,047	0,12	0,726
Sarımsak*GFSE	1	0,602	0,602	1,60	0,211
Sarımsak*Süre	2	0,021	0,010	0,03	0,973
Sarımsak*Paket	1	0,525	0,525	1,39	0,242
NaCl*GFSE	1	1,135	1,135	3,01	0,087
NaCl*Süre	2	5,332	2,666	7,07	0,002
NaCl*Paket	1	0,537	0,537	1,42	0,237
GFSE*Süre	2	5,862	2,931	7,77	0,001
GFSE*Paket	1	0,048	0,048	0,13	0,723
Süre*Paket	2	11,330	5,665	15,02	0,000
Hata	75	28,289	0,377		
Toplam	95	250,778			

Çizelge A.36: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesi ile 10°C’de depolanması ile *E. coli* O157:H7 sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Sarımsak	1	0,051	0,051	0,07	0,790
NaCl	1	2,866	2,866	5,50	0,022
GFSE	1	33,785	33,785	62,25	0,000
Süre	2	130,776	65,406	124,01	0,000
Paket	1	34,417	34,442	65,30	0,000
Sarımsak*NaCl	1	0,180	0,169	0,32	0,573
Sarımsak*GFSE	1	1,574	1,504	2,85	0,095
Sarımsak*Süre	2	0,222	0,110	0,21	0,811
Sarımsak*Paket	1	0,460	0,413	0,78	0,379
NaCl*GFSE	1	0,111	0,086	0,16	0,687
NaCl*Süre	2	3,716	1,851	3,51	0,035
NaCl*Paket	1	0,461	0,507	0,96	0,330
GFSE*Süre	2	7,304	3,575	6,78	0,002
GFSE*Paket	1	0,099	0,132	0,25	0,618
Süre*Paket	2	17,715	8,857	16,79	0,000
Hata	75	39,029	0,527		
Toplam	95	272,767			

Çizelge A.37: Tavuk kıymasına sarımsak tozu, tuz ve GFSE ilavesi ile 10°C’de depolanması ile *L. monocytogenes* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Sarımsak	1	3,531	3,202	5,86	0,018
NaCl	1	8,392	9,251	16,93	0,000
GFSE	1	142,416	135,126	247,25	0,000
Süre	2	78,141	37,032	67,76	0,000
Paket	1	20,556	21,447	39,24	0,000
Sarımsak*NaCl	1	0,440	0,514	0,94	0,336
Sarımsak*GFSE	1	1,210	1,243	2,27	0,136
Sarımsak*Süre	2	0,270	0,136	0,25	0,780
Sarımsak*Paket	1	0,617	0,624	1,14	0,289
NaCl*GFSE	1	0,009	0,040	0,07	0,787
NaCl*Süre	2	0,382	0,156	0,29	0,753
NaCl*Paket	1	0,815	0,591	1,08	0,302
GFSE*Süre	2	13,775	6,974	12,76	0,000
GFSE*Paket	1	1,040	0,773	1,41	0,238
Süre*Paket	2	12,053	6,026	11,03	0,000
Hata	75	39,349	0,547		
Toplam	95	322,996			

Çizelge A.38: Tavuk kıymasında GFSE’nin 4°C’de iki paket tipi ile kullanımının test organizmaları üzerinde etkileri.

GFSE (ppm)	Süre (gün)	Test Organizma Sayısı (log ₁₀ /g)					
		<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. monocytogenes</i>	
		Aerobik	MAP ⁽¹⁾	Aerobik	MAP	Aerobik	MAP
Kontrol	1	5,19	4,81	5,48	5,21	3,52	3,04
		5,00	5,04	5,42	5,28	3,51	3,13
	3	5,31	4,94	5,47	5,18	4,31	3,04
		5,41	5,10	5,45	5,16	4,31	3,21
	6	5,30	5,23	5,47	5,06	4,92	3,62
		5,95	5,00	- ⁽²⁾	5,17	5,11	2,97
6000	1	3,00	3,90	3,00	4,46	<2,00	<2,00
		2,60	4,25	2,84	4,20	<2,00	<2,00
	3	3,22	3,90	3,57	3,92	<2,00	2,00
		3,23	4,08	3,21	4,39	2,17	2,00
	6	3,16	4,28	5,36	4,29	2,93	2,00
		- ⁽²⁾	4,45	- ⁽²⁾	4,66	2,60	2,40

⁽¹⁾ %70 CO₂ + %30 N₂ ⁽²⁾ Sayım yapılamadı.

Çizelge A.39: Tavuk kıymasında GFSE'nin 4°C'de iki paket tipi ile kullanımı ile *S. enteritidis* sayılarına ait varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	1	15,1209	15,1209	384,47	0,000
Süre	2	0,4693	0,2347	5,97	0,016
Paket	1	0,8251	0,8251	20,98	0,001
GFSE*Süre	2	0,0013	0,0006	0,02	0,984
GFSE*Paket	1	3,0317	3,0317	77,09	0,000
Süre*Paket	2	0,1172	0,0586	1,49	0,264
GFSE*Süre*Paket	2	0,0934	0,0467	1,19	0,338
Hata	12	0,4720	0,0393		
Toplam	23	20,1310			

Çizelge A.40: Tavuk kıymasında GFSE'nin 4°C'de iki paket tipi ile kullanımı ile *E. coli* O157:H7 sayılarına ait varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	1	8,8331	8,8331	352,15	0,000
Süre	2	1,8698	0,9349	37,27	0,000
Paket	1	0,0323	0,0323	1,29	0,279
GFSE*Süre	2	2,1408	1,0704	42,67	0,000
GFSE*Paket	1	0,7633	0,7633	30,43	0,000
Süre*Paket	2	1,5754	0,7877	31,40	0,000
GFSE*Süre*Paket	2	1,2378	0,6189	24,67	0,000
Hata	12	0,3010	0,0251		
Toplam	23	16,7533			

Çizelge A.41: Tavuk kıymasında GFSE'nin 4°C'de iki paket tipi ile kullanımı ile *L. monocytogenes* sayılarına ait varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
GFSE	1	14,3995	14,3995	435,52	0,000
Süre	2	1,8470	0,9235	27,93	0,000
Paket	1	2,6467	2,6467	80,05	0,000
GFSE*Süre	2	0,1863	0,0931	2,82	0,099
GFSE*Paket	1	1,2015	1,2015	36,34	0,000
Süre*Paket	2	0,8628	0,4314	13,05	0,001
GFSE*Süre*Paket	2	0,1629	0,0815	2,46	0,127
Hata	12	0,3968	0,0331		
Toplam	23	21,7035			

Çizelge A.42: Kıymaya valisin (nisin) ilavesinin 4°C’de iki paket tipinde *L. monocytogenes* üzerine etkisi.

Nisin (ppm)	Süre (gün)	Test Organizma Sayısı (log ₁₀ /g)	
		<i>L. monocytogenes</i> ⁽¹⁾	
		Aerobik	MAP ⁽²⁾
Kontrol	1	4,30	4,00
		4,50	4,50
	3	5,30	4,40
		4,70	4,00
	6	5,41	4,47
		5,40	3,84
73	1	3,60	2,00
		3,50	3,00
	3	2,47	2,90
		3,47	3,26
	6	3,09	3,93
		4,31	2,70
250	1	2,80	2,00
		3,00	2,30
	3	2,00	2,65
		2,00	2,47
	6	3,43	3,15
		3,39	2,65

⁽¹⁾Başlangıç bakteri sayısı: 3,89 log₁₀

⁽²⁾%70CO₂+%30N₂

Çizelge A.43: Kıymaya valisin (nisin) ilavesi ile 4°C’de iki paket tipinde *L. monocytogenes* sayılarının varyans analizi (ANOVA) çizelgesi.

	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması (Varyans)	F	P
Nisin	2	23,4484	11,7242	62,42	0,000
Paket	1	1,9834	1,9834	10,56	0,004
Süre	2	2,1431	1,0715	5,70	0,012
Nisin*Paket	2	0,3785	0,1892	1,01	0,385
Nisin*Süre	4	0,5279	0,1320	0,70	0,600
Paket*Süre	2	0,8234	0,4117	2,19	0,141
Nisin*Paket*Süre	4	1,4387	0,3597	1,91	0,152
Hata	18	3,3810	0,1878		
Toplam	35	34,1243			

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Harika Çankaya

Doğum Yeri ve Tarihi: Gaziantep, 07-06-1966

Adres: İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü 34469 Maslak-İSTANBUL

E-posta: cankaya@itu.edu.tr , harikacankaya@hotmail.com

Lisans Üniversitesi:

1988-Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü

Yüksek Lisans Üniversitesi:

1997-Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yayın Listesi:

Çankaya, H. 1997: Kalsiyum Klorürün (CaCl_2) Pastırmanın Bazı Kalite ve Teknolojik Özelliklerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Yönetici: Doç. Dr. Hasan Yetim. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Yetim, H. ve **Çankaya, H.**, 1998: Salamura kürlenme ve CaCl_2 ilavesi ile pastırma üretimi. *Doğu Anadolu Tarım Kongresi*, s. 1710-1718. 14-18 Eylül, Erzurum.

Yetim, H. ve **Çankaya, H.**, 1998: CaCl_2 ilavesi ve salamura kürlenme yönteminin pastırmanın bazı kalite özelliklerine etkisi. *S.Ü. Ziraat Fak. Dergisi*, **12**, 123-130.

Yetim, H. ve **Çankaya, H.**, 2001: CaCl_2 ilavesi ve salamura kürlenme yönteminin pastırma gevrekliğine etkisi, *Gıda*, **26**, 203-207.

Çankaya, H., Güneş, G. and Aran, N., 2006: Effects of nisin, sodium lactate and grapefruit seed extract on growth of potential pathogens in meat products. Poster bildiri. *2nd FEMS Congress of European Microbiologists*, July 4-8, Madrid, Spain.