

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL KAYNAKLI ANTİMİKROBİYALLERİN
GIDA KAYNAKLI BAZI PATOJEN
MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDE ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Elvan ŞAHİN**

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2006

**BİTKİSEL KAYNAKLI ANTİMİKROBİYALLERİN GIDA
KAYNAKLI BAZI PATOJEN MİKROORGANİZMALAR
ÜZERİNDE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Elvan ŞAHİN
506021404

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 8 Mayıs 2006
Tezin Savunulduğu Tarih : 13 Haziran 2006

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Necla ARAN

Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Harun AKSU

Yrd.Doç.Dr. Gürbüz GÜNEŞ

HAZİRAN 2006

ÖNSÖZ

Gıda endüstrisinde mikroorganizmalar insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilere neden olduğu gibi, gıdalarda kokuşma ve bozulmaya neden olarak hem üretici hem de tüketici için büyük sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal özellikteki kimyasalların kullanımı bilinen en eski ve en yaygın metotlar arasındadır. Ancak tüketicilerin sentetik katkı maddeleri hakkındaki önyargıları gıda muhafaza yöntemlerinde alternatif yöntem arayışlarına neden olmuştur. Doğal antimikrobiyallerin bir kısmı gıda muhafazasında kullanılmakta olup, bir kısmı da hala araştırma aşamasındadır.

Bu kapsamda yaptığımız çalışmada bitkisel kaynaklı doğal antimikrobiyal maddelerin (maydanoz, kimyon esansiyel yağları, zencefil, paprika, kimyon, maydanoz oleoresinleri, greyfurt çekirdeği ekstraktı) gıda kaynaklı patojenlerden *Bacillus cereus*, *Eschericia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis* üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince değerli fikirleriyle beni yönlendiren, yardım ve desteğini esirgemeyen İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi sayın hocam Prof. Dr. Necla ARAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Hayatım boyunca ve bu tezin hazırlanması sırasında beni sürekli destekleyen, hiçbir şeyi esirgemeyen aileme, her zaman yanımda olan Ulaş Çıkla'ya teşekkürü borç bilirim. Deneysel çalışmalarında bana destek olan İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümünde doktora çalışmasını sürdüren Harran Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Harika ÇANKAYA'ya, istatistiksel verilerin değerlendirilmesi ve diğer her türlü konuda yardımcı olan İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma Görevlilerinden Volkan K. Köseoğlu'na teşekkür ederim. Bu çalışmada ve iş yaşamımda bana sonsuz desteğini büyük bir sabır ve sevgi ile sunan Gıda Yük. Müh. Serap NAZIR'a, deneysel çalışmalarım sırasında gerekli imkanları sunan Dr. Hülya Günay'a, büyük özveri ile yardımlarını esirgemeyen ve iş yükümü paylaşan çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada kullandığım baharat esansiyel yağlarının teminini sağlayan Sayın Sevim Davutoğlu şahsında IFF Aroma Esans Sanayi ve Ticaret A.Ş.(Kocaeli)'ne, greyfurt çekirdeği ekstraktı (GSE) teminini sağlayan Belkis Kormaz şahsında Peyma-Chr.Hansen's Peynir Mayası San. Ve Tic. A.Ş. (İstanbul)'ne teşekkür ederim.

Mayıs, 2006

Elvan ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Doğal Antimikrobiyal Sistemler	3
2.2. Baharat, Esansiyel Yağ ve Bitkisel Ekstraktların Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı	4
2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	6
2.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi	7
2.3.2. Türbidimetrik Yöntem	8
2.3.3. İmpedimetrik Yöntem	8
2.3.4. Geleneksel Mikrobiyolojik Yöntem	8
2.3.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu	9
2.4. Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkili Faktörler	9
2.4.1. Bitkisel Antimikrobiyaller	9
2.4.2. Mikroorganizmalar	10
2.4.3. Çevresel Faktörler	11
2.4.3.1. Oksijen	11
2.4.3.2. Sıcaklık	11
2.4.3.3. Süre	11
2.4.4. Antimikrobiyal Test Yöntemi	12
2.4.5. Ortamının Bileşenleri	12
2.4.5.1. Yağ	12
2.4.5.2. Protein	12
2.4.5.3. Gıdanın Katı/Sıvı Yapıda Olması	13
2.4.5.4. pH	13
2.4.5.5. Su Aktivitesi	13
2.4.5.6. Tuz	14

2.5. "In vitro"ve Gıdalar ile Yapılan Çalışmalar	14
2.6. Antimikrobiyal Etki Mekanizması	15
2.7. Toksikolojik Özellikler	15
2.8. Baharatların Mikrobiyolojik Kalitesi	16
2.9. Greyfurt Çekirdeği Ekstraktı	16
2.10. Mikroorganizmalar	18
2.10.1. <i>Bacillus cereus</i>	18
2.10.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
2.10.3. <i>Salmonella enteritidis</i>	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. MATERYALLER	21
3.1.1. Bakteri Kültürleri	21
3.1.2. Kültür Ortamları	21
3.1.3. Greyfurt Çekirdeği Ekstraktı	21
3.1.4. Esansiyel Yağ ve Oleoresinler	21
3.1.5. Gıda Örneği	21
3.2. METOTLAR	22
3.2.1. Kağıt Disk Yöntemi ile İnhibisyon Zonlarının Belirlenmesi	22
Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	22
3.2.2. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	22
3.2.3. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	22
3.2.4. Tween 20'nin Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	23
3.2.5. Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	23
3.2.6. Gıda Örneğinin Hazırlanması	23
3.2.7. Gıda Matrisinde GSE ve Potasyum Sorbatın İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması	24
3.2.8. İstatistiksel Deneme Deseni	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Kağıt Disk Yöntemi ile Elde edilen İnhibisyon Zonları	25
4.2. Agar Difüzyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	27

4.2.1. Maydanoz Esansiyel Yağı	27
4.2.2. Kimyon Esansiyel Yağı	28
4.2.3. Greyfurt Çekirdeği Ekstraktı	28
4.2.4. Minimum İnhibisyon Konsanrasyonları (MIC)	28
4.3. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	30
4.3.1. <i>Bacillus cereus</i>	31
4.3.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	31
4.3.3. <i>Salmonella enteritidis</i>	32
4.4. Tween 20'nin Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	33
4.5. Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	34
4.5.1. <i>Bacillus cereus</i>	34
4.5.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	35
4.5.3. <i>Salmonella enteritidis</i>	36
4.6. Gıda Matrisinde GSE ve Potasyum Sorbatın İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması	37
4.6.1. <i>Bacillus cereus</i>	38
4.6.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	39
4.6.3. <i>Salmonella enteritidis</i>	40
5. SONUÇ	43
KAYNAKLAR	45
EKLER	52
ÖZGEÇMİŞ	57

KISALTMALAR

GSE	: Greyfurt Çekirdeği Ekstraktı
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
HUS	: Hemolitik Üremik Sendrom
GRAS	: Genellikle emniyetli kabul edilen
CO₂	: Karbondioksit
O₂	: Oksijen
N₂	: Nitrojen
a_w	: Su aktivitesi
BHA	: Butillenmiş HidroksiAnisol
TBHQ	: Tert-Butilhidro Quinon
DMSO	: Di Metil Sülfoksit
GSE	: Grapefruit Çekirdeği Ekstraktı
TSA	: Tryptic Soya Agar
TSB	: Tryptic Soya Broth
O/R	: Oleoresin
E/O	: Esansiyel Yağ
GC-MS	: Gaz kromatografi-Kütle Spektrometresi
STEM	: “Scanning Transmission Electron Microscopy”

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Elde edildikleri kaynağa göre başlıca doğal antimikrobiyal bileşikler.....	4
Tablo 2.2. Baharat, şifalı ot ve diğer bitkilerde bulunan antimikrobiyal etkiye sahip bileşenler	6
Tablo 4.1. GSE, esansiyel yağ ve oleoresinlerin oluşturdukları ortalama inhibisyon zonları (mm)	25
Tablo 4.2. Maydonoz esansiyel yağının agar difüzyon yönteminde minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi	28
Tablo 4.3. Greyfurt çekirdeği ekstraktının agar difüzyon yönteminde minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	28
Tablo 4.4. Kimyon esansiyel yağının agar difüzyon yönteminde minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi.....	29
Tablo 4.5. Agar difüzyon yönteminde belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonları.....	29
Tablo 4.6. Tween 20 varlığında <i>B. cereus</i> için farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarında elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları.	31
Tablo 4.7. Tween 20 varlığında <i>E. coli</i> O157:H7 için farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarında elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	32
Tablo 4.8. Tween 20 varlığında <i>S. enteritidis</i> için Farklı Yağ ve GSE konsantrasyonlarında elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	33
Tablo 4.9. Emülgatör olarak Tween 20'nin kullanıldığı ve kullanılmadığı besi ortamında <i>S. enteritidis</i> gelişimi.....	33
Tablo 4.10. <i>B. cereus</i> için farklı yağ ve gse konsantrasyonlarında elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları (kob/ml).....	35
Tablo 4.11. <i>E. coli</i> O157:H7 için farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarında elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları (kob/ml).....	36
Tablo 4.12. <i>S. enteritidis</i> için farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarında elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçları (kob/ml).....	37
Tablo 4.13. Örneklerin pH değerleri.....	38
Tablo 4.14. GSE ve potasyum sorbatın 10 °C'de muhafaza edilen kıymalı sos örneğinde <i>B. cereus</i> gelişimi üzerinde etkileri.....	39
Tablo 4.15. GSE ve potasyum sorbatın 10 °C'de muhafaza edilen kıymalı sos örneğinde <i>E. coli</i> O157:H7 gelişimi üzerinde etkileri.....	39
Tablo 4.16. GSE ve potasyum sorbatın 10 °C'de muhafaza edilen kıymalı sos örneğinde <i>S. enteritidis</i> gelişimi üzerinde etkileri.....	40

Tablo A.1.	Tween 20 varlığında <i>B. cereus</i> gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-37,5-150-600 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları	52
Tablo A.2.	Tween 20 varlığında <i>E. coli</i> O157:H7 gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-37,5-150-600 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	52
Tablo A.3.	Tween 20 varlığında <i>S. enteritidis</i> gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-37,5-150-600 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	52
Tablo A.4.	<i>B. cereus</i> gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-18,75-75-300 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	53
Tablo A.5.	<i>E. coli</i> O157:H7 gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve gse (0-18,75-75-300 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	53
Tablo A.6.	<i>S. enteritidis</i> gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-18,75-75-300 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	53
Tablo A.7.	Kıymalı sos örneğinde GSE ve potasyum sorbatın <i>B. cereus</i> üzerinde inhibisyon etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	54
Tablo A.8	Kıymalı sos örneğinde GSE ve potasyum sorbatın <i>E. coli</i> O157:H7 üzerinde inhibisyon etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	54
Tablo A.9	Kıymalı sos örneğinde GSE ve potasyum sorbatın <i>S. enteritidis</i> üzerinde inhibisyon etkilerinin varyans analizi sonuçları.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil B.1.	: Farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarına sahip model sistemde Tween 20 kullanılması ve kullanılmaması durumunda <i>B. cereus</i> sayıları ($\log_{10}$ kob/ml).....	55
Şekil B.2.	: Farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarına sahip model sistemde Tween 20 kullanılması ve kullanılmaması durumunda <i>E. coli</i> O157:H7 sayıları ($\log_{10}$ kob/ml).....	55
Şekil B.3.	: Farklı yağ ve GSE konsantrasyonlarına sahip model sistemde Tween 20 kullanılması ve kullanılmaması durumunda <i>S. enteritidis</i> sayıları ($\log_{10}$ kob/ml).....	56

BİTKİSEL KAYNAKLI BAZI ANTİMİKROBİYALLERİN GIDA KAYNAKLI BAZI PATOJEN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDE ETKİLERİ

ÖZET

Doğal ve katkı maddesi içermeyen ürünlere yönelik artan tüketici talepleri, yeni üretim teknikleri ve doğal antimikrobiyallere olan ilgiyi arttırmıştır. Bu çalışmada antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile baharatların da dahil olduğu çeşitli bitkisel kaynakların gıdalarda mikrobiyal gelişmenin kontrol altına alınmasında kullanımını araştırmak üzere kimyon, maydonoz esansiyel yağları, paprika, zencefil, kimyon ve maydonoz oleoresinleri ve greyfurt çekirdeği ekstraktının (GSE) *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* gibi gıda kaynaklı bazı patojen bakteriler üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır.

Araştırılan bitkisel kaynakların antimikrobiyal etkisi olup olmadığını belirlemek üzere kağıt disk metodu kullanılmış, oluşturdukları inhibisyon zonları belirlenmiştir. Oleoresinler inhibitör etki göstermezken, GSE, maydonoz ve kimyon esansiyel yağlarının patojen üç mikroorganizmanın gelişimi üzerinde inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Daha sonra antimikrobiyal etkinliğini değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan minimum inhibisyon konsantrasyonu, maydanoz, kimyon ve GSE için belirlenmiştir. Agar dilüsyon yönteminde en düşük MIC değerleri GSE için saptanmış, bunu kimyon ve maydanoz esansiyel yağı izlemiştir.

Ortamın yağ içeriğinin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini belirlemek üzere sıvı kültür ortamına yağ ilave edilerek, mikrobiyal gelişim izlenmiştir. Sıvı kültür ortamında antimikrobiyal etki gözlenmemesi nedeniyle emülsiyon oluşumu için kullanılan Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerinde etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda emülgatör olarak kullanılan Tween 20'nin inhibitör etkiyi azalttığı ya da yok ettiği tespit edilmiştir. GSE'nin antimikrobiyal etkisini azaltan Tween 20 kullanılmadan hazırlanan besi ortamında elde edilen sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GSE ve yağın mikrobiyal populasyon üzerinde etkili olduğu, GSE ve yağ arasında bir interaksiyon olduğu belirlenmiştir.

GSE'nin gıda matriksinde etkisini görmek ve yaygın kullanımda olan bir antimikrobiyal ile karşılaştırmak üzere 1800 ppm potasyum sorbat ve GSE kıyma sosuna ilave edilmiştir. Örnekler etkin soğutmanın sağlanamadığı koşulları temsil edecek şekilde 10°C'de 5 gün boyunca inkübe edilerek 1, 3 ve 5. günlerde her üç patojenin gelişimleri izlenmiştir. Potasyum sorbat kontrolden ve GSE uygulamasından istatistiksel olarak farklı bulunmuş, bakteri sayılarında kontrol ve GSE'ye göre azalma sağlanmıştır ($p < 0.05$). GSE ise in vitro çalışmalarda yüksek antimikrobiyal etki göstermesine rağmen gıda matriksinde 1800 ppm inhibitör etki gösterememiştir.

INHIBITORY EFFECTS OF PLANT DERIVED ANTIMICROBIALS ON SOME FOOD-BORNE PATHOGENIC BACTERIA

SUMMARY

Increasing demand of food which is natural and free from additives, resulted in growing interest in the use of new production techniques and natural antimicrobials. In this research, potential of essential oils of cumin and parsley, oleoresins of paprika, ginger, cumin and parsley, also grapefruit seeds extract in controlling microbial growth is investigated on some food borne pathogenic bacteria such as *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*

In order to compare plant derived antimicrobials, disk diffusion method was used and inhibition zones were measured. Oleoresins did not inhibit pathogens, while grapefruit seed extract, cumin and parsley essential oils did. Since minimum inhibition concentration is a method widely used in evaluation of antimicrobial effect, MIC of GSE and essential oils of cumin and parsley were determined. Having high antimicrobial effect or low MIC, grapefruit seed extract was chosen for further analysis. MIC of parsley and cumin essential oils were found high.

In the presence of oil in growth medium (0, 10, 20 %) behavior of grapefruit seed extract as an antimicrobial and microbial growth was screened. No inhibitor effect had been detected, then it was investigated that if Tween 20 which was added in order to provide oil-in-water emulsion stability, had an effect on antimicrobial activity. It was observed that Tween 20 had an antagonistic effect and decreased inhibitor effect of GSE. When Tween 20 was not added to growth medium, GSE showed strong bactericidal effect on three pathogens. It was observed that, oil concentration was statistically important ($p < 0,05$) and decreases antimicrobial effect of GSE..

In order to determine the behaviour of GSE on food matrix and compare with widely used antimicrobial, 1800 ppm potassium sorbate and GSE were added to minced meat sauce. Incubation at 10°C for 5 days and sampling at days of 1,3 and 5 was performed and bacterial growth was screened. It was found that potassium sorbate was statistically different from GSE and control ($p < 0.05$). Although GSE was effective according to results that obtained in vitro, no antimicrobial effect was observed in food matrix.

1. GİRİŞ

Gıda güvenliğini ilgilendiren bir çok faktör arasında mikroorganizmalar ilk sırada yer almakta olup (Eilers, 1990), son yıllarda çeşitli etkenlere bağlı olarak gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmelerde artış gözlenmektedir (Smith-Palmer ve diğ., 2001). Toplumların yaşam tarzlarındaki değişiklikler, hassas tüketici gruplarındaki artış, ithalat-ihracat olanaklarındaki gelişmeler, hayvansal gıda maddelerinin üretimindeki artış, gıda işleme tekniklerindeki yeni uygulamalar, seyahat olanaklarının artması, global ısınma, doğal beslenmeye olan eğilim, katkı maddesi içermeyen taze gıdalara yoğun talep gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmelerdeki artışın nedenleri arasında yer almaktadır.

Gıda muhafazasında temel prensip, patojen ve gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaların inaktive edilmesi, gelişiminin geciktirilmesi veya önlenmesidir. Düşük sıcaklık, düşük su aktivitesi, yüksek asidite, anaerobik ortam, modifiye atmosferde paketlenme, antimikrobiyal kullanımı, fermentasyon mikrobiyal gelişimi önleyip yavaşlatırken, pastörizasyon, sterilizasyon, ısınlama, yüksek hidrostatik basınç, darbeli elektrik alan, mikrodalga uygulamaları ile mikroorganizmalar inaktive edilmektedir. Aseptik işleme ve paketlenme, santrifüj, filtrasyon gibi yöntemlerde ise mikroorganizmanın gıdaya bulaşması önlenmekte ya da gıdadan uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu yöntemlerin kombinasyonlarının kullanılarak ayrı ayrı yarattıkları etkilerin toplamından daha olumlu sonuç elde edilmekte, engeller teknolojisi (“hurdle technology”) olarak adlandırılan bu sistem ile mikrobiyal gelişiminin durdurulması ya da engellenmesi mümkün olmaktadır (Gould, 1996).

Bu teknikler arasında antimikrobiyal aktiviteye sahip kimyasalların kullanımı ve ısıl işlem uygulamaları bilinen en eski ve en yaygın metotlar arasındadır (Gould, 1999). Ancak tüketicilerin sentetik katkı maddeleri hakkındaki önyargıları/olumsuz düşünceleri, minimum işlem uygulanmış güvenli ve uzun raf ömrüne sahip gıda ürünlerine olan talepleri gıda muhafaza yöntemlerinde alternatif yöntem arayışlarına neden olmuştur (Bagamboula ve diğ., 2003).

Bitkisel kaynaklı esansiyel yağların, üzüm çekirdeği ekstraktı gibi diğer bazı bitkisel kaynakların ve bazı organik asitler ve tuzlarının doğal veya GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde kabul edilmesi, bakteri ve küf gibi çeşitli mikroorganizmlara karşı antimikrobiyal etki göstermesi, sentetik gıda katkılarına karşı doğal koruyuculara olan ilgiyi artırmıştır (Smith-Palmer ve diğ., 2001; Kim ve diğ., 1995; Tassaou ve diğ., 2004; Meyer ve diğ., 2002; Nychas ve Skandamis, 2003).

Bu çalışmanın amacı; sentetik katkı madde kullanımına alternatif olacak şekilde bazı bitkisel kaynaklı esansiyel yağ, oleoresin ve ekstraktın *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella enteritidis* gibi gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerindeki inhibitör etkilerinin araştırılmasıdır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Doğal Antimikrobiyal Sistemler

Katkı maddeleri ürün kalitesini arttırmak, gıdayı korumak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla ürün içeriğine eklenen kimyasal bileşiklerdir. Mikrobiyal gelişmeyi kontrol altına almak amacıyla kullanılan katkı maddeleri ise antimikrobiyal olarak adlandırılmaktadır. Laboratuvar ortamında elde edilen sentetik ve biyolojik sistemlerde bulunan doğal antimikrobiyaller olmak üzere antimikrobiyalleri iki grupta incelemek mümkün olup bunlardan birincisi, yasal düzenlemelerle gıdalarda kullanımlarına izin verilen asetik asit ve asetat, benzoik asit ve benzoat, laktik asit ve laktat, nitrit ve nitrat, sorbik asit ve sorbat, sülfite gibi sentetik antimikrobiyallerdir. İkinci grupta ise hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı doğal antimikrobiyaller bulunmaktadır (Davidson ve Harrison, 2003).

Katkı maddesi içermeyen, daha az tuz içeren, daha az işlem görmüş gıdalarda koruyucu faktörlerin azalması ile ürün mikrobiyal gelişim ve bozunma reaksiyonları açısından riskli hale gelmekte, ayrıca ürünün raf ömrü sınırlanmaktadır. Tüketicilerde eğilim sentetik katkı maddelerinden farklı olarak hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen doğal antimikrobiyallerin kullanımı yönünde olmaktadır. Doğal antimikrobiyallerin bir kısmı gıda muhafazasında kullanılmakta olup, bir kısmı da hala araştırma aşamasındadır. Yumurtadaki lizozim, ovotransferrin ve avidin, sütteki laktoperoksidaz ve laktoferrin, kan serumundaki transferrinler hayvansal kaynaklı doğal antimikrobiyallere örnek oluştururken, fitoaleksinler, baharat ve şifalı bitkilerden elde edilen düşük molekül ağırlığına sahip “carvacrol”, “eugenol”, “thymol”, “cinnamic aldehyde”, “allicin” gibi fenolik bileşenler, esansiyel yağlar, ekstraktlar başlıca doğal bitkisel antimikrobiyaller arasındadır. Mikroorganizmalardan elde edilen doğal antimikrobiyaller arasında ise nisin ve pediosin gibi bakteriyosinler yer almaktadır (Gould, 1996; Davidson ve Harrison, 2003; Lemay ve diğ., 2002).

Tablo 2.1’de bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunan başlıca antimikrobiyal sistemler verilmiştir.

Tablo 2.1. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Başlıca Doğal Antimikrobiyal Bileşikler (Gould, 1996; Meyer ve diğ., 2002; Beuchat ve Golden, 1989)

Kaynak	Örnek	Antimikrobiyal Ajan
Hayvanlar	Süt	Laktoperoksidaz, laktoferrin
	Yumurta	Lizozim, ovotransferrin, avidin
	Serum	Transferrin
Mikroorganizmalar	Laktik asit bakterileri	Nisin, pediosin, diğer bakteriosinler
	Diğer mikroorganizmalar	Pimarisin, subtilin, natamisin, diasetil
		Düşük molekül ağırlıklı metabolitler (etanol, reuterin, H ₂ O ₂ vb.)
Bitkiler	Baharatlar, şifalı otlar	Organik asitler (sitrik, suksinik, tartarik, benzoik, malik vb.)
		Alkaloidler (tomatine)
		Fenolik bileşikler (kafeik asit, ögenol, timol, sinamikaldehid vb.)
	Strese maruz kalan bitkiler	Fenolik bileşikler (gallotanins, ellagitanins vb.)
		Sülfoksitler (allisin vb.)
		Fitoaleksinler (Resvatrol, pisatin vb.)
		İsotiosiyanatlar

2.2. Baharat, Esansiyel Yağ ve Bitkisel Ekstraktların Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı

Baharatlar bitkinin meyve (kırmızı biber, karabiber), tohum (kişniş, anason, kimyon, hardal), kök ve rizom (zencefil, zerdeçal), yaprak (adaçayı, defne, biberiye), çiçek ve tomurcuk (karanfil, safran), soğan (sarımsak, soğan) gibi farklı kısımlarından elde edilen (Karapınar ve Aktuğ, 1986a; Aran, 1988), yıllardır gıdalara lezzet/çeşni vermek, aroma kazandırmak amacıyla kullanıldığı gibi, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile gıdaları korunmasında/muhafazasında ve kozmetik gibi sektörlerde kullanım alanı bulan bitkisel ürünlerdir (Kim ve diğ., 2004; Smith-Palmer ve diğ., 2001; Valero ve Salmeron, 2003; Yuste ve Fung, 2002).

Baharatların genel olarak kullanım amaçları aşağıda sıralanmaktadır (Karapınar ve Aktuğ, 1986b; Üner ve ark., 2000)

- I. Gıdaların tat ve koku özelliklerini geliştirerek lezzeti arttırmak, yeni ürünler elde ederek çeşitlilik sağlamak,
- II. Antioksidan özellikleriyle gıdalarda acılaşmayı önlemek,
- III. Antimikrobiyal özellikleriyle gıdaları korumak, patojen gelişimini engellemek,

Esansiyel yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan çeşitli distilasyon ve ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen, genellikle oda sıcaklığında sıvı halde olan,

uçucu, kuvvetli kokulu, baharatın tüm koku ve tat verici bileşenlerini içeren, su buharı ile taşınabilen karışımlardır. Oleoresinler ise baharatların tüm tad verici bileşenlerini/ingrediyentlerini içeren yoğun ekstraktlar olarak tanımlanmaktadır (Korukluoğlu ve diğ., 2005; Karapınar ve Aktuğ, 1986b).

Bitkiler, baharatlar, şifalı otlar, esansiyel yağları ve bunlardan izole edilen bileşikleri bakterilerin, küf ve mayaların metabolik aktivitelerini inhibe eden maddeler içerdiği bilinmektedir. İçerdikleri bu bileşenler sayesinde baharatlar, bitkisel materyallerden ekstrakte edilen esansiyel yağlar, oleoresin ve ekstraktların büyük çoğunluğu Gr(-) bakteri, Gr(+) bakteri, küf ve mayaların gelişimini ve toksin oluşumunu olumsuz etkilemektedir. Antimikrobiyal etki konsantrasyona bağlı olup, yüksek konsantrasyonlarda ölümcül etki göstermektedir. Yenibahar, badem, defne, karabiber, karaman kimyonu, tarçın, karanfil, kişniş, kimyon, sarımsak, greyfurt, limon, mandarin, soğan, portakal, kekik, kuşburnu, adaçayı ve mercanköşk antimikrobiyal etkisi bilinen esansiyel yağlardır (Nychas ve Skandamis, 2003; Korukluoğlu ve diğ., 2005). Literatürde 1300'den fazla bitkinin antimikrobiyal etkisi olduğu rapor edilmektedir, ancak hepsinin gıdalarda kullanımı henüz mümkün olmamıştır. İstenilen antimikrobiyal etkiyi sağlayan dozlar duyuşal olarak kabul edilebilir sınırları aştığından gıdalarda koruyucu olarak kullanımları sınırlanmıştır (Gould, 1996; Cutter, 2000).

Bitkisel kaynakların antimikrobiyal özellikleri esans yağı içeriklerine, bileşimlerinde bulunan aldehytler, organik asitler ve fenolik bileşiklere bağılı olarak değışiklik göstermektedir (Davidson ve Naidu, 2000). Sarmısak, soğan, tarçın, sumak, köri, kekik, mercanköşk, kuşburnu, adaçayı, anason, fesleğen, zencefil, zerdeçal, kereviz, defne, yenibahar, kişniş, vanilya, safran, bergamot, yasemin (Nasar-Abbas ve Halkman, 2004; Davidson ve Naidu, 2000; Tassaou ve diğ., 2004) ve üzüm çekirdeğı (Ahn ve diğ., 2004) gibi diğere bazı bitkisel kaynaklar ve benzeri bir çok baharat ve şifalı bitkinin değışik kısımlarının ya da ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Karanfilde “eugenol”, sarmısakta “allicin”, mercanköşk ve kekikte “carvacrol” ve “thymol”, tarçın da “cinnamic aldehyde” ve “eugenol”, yenibaharda “eugenol” ve “metil eugenol”, kimyonda “cumin aldehyde”, hardalda “isothiocyanate”, “zencefilde” “gingerol” ve “gingeron”, kuşburnunda “thymol”, adaçayında “borneol” gibi fenolik bileşenlerin gıda kaynaklı patojenler ve mikotoksin oluşturan küfleri kapsayan geniş bir yelpazede bulunan

mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal özellik gösterdiği saptanmıştır (Valero ve Salmeron, 2003; Takikawa ve diğ., 2002; Tassaou ve diğ., 2004; Davidson ve Naidu, 2000). Tablo 2.2’de antimikrobiyal etki gösteren baharat, şifalı ot ve diğer bitkiler ve bunların etken maddeleri listelenmiştir.

Tablo 2.2. Baharat, şifalı ot ve diğer bitkilerde bulunan antimikrobiyal etkiye sahip bileşenler (Davidson ve Naidu, 2000)

Baharat ve diğer bitkiler	Latince Adı	Antimikrobiyal Madde
Yenibahar	<i>Pimenta dioica</i>	"eugenol"
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	"d-linalool", "methyl chavicol"
Karabiber	<i>Piper nigrum</i>	"monoterpenes", "sesquiterpens"
Defne	<i>Laurus nobilis</i>	"cineol"
Tarçın	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	"cinnamic aldehyde"
Karanfil	<i>syzygium aromaticum</i>	"eugenol"
Kimyon	<i>Cuminum cyminum</i>	"cuminaldehyde"
Sarmısak	<i>Allium sativum</i>	"diallyl disulfide"
Soğan	<i>Allium cepa</i>	"d-n-propyl disulfide", "methyle-n-propyl disulfide"
Mercanköşk	<i>Origanum vulgare</i>	"thymol", "carvacrol"
Maydanoz	<i>Petroselinum crispum</i>	"alfa*pinene", "fenol-eter-apiol"
Kuşburnu	<i>Rasmarinus officinalis</i>	"borneol", "cineol"
Hardal	<i>Brassica hirta, B. nigra</i>	"allyl, isothiocyanate"
Adaçayı	<i>Salvia officinalis</i>	"thujone", "cineol", "borneol"
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	"thymol"
Vanilya	<i>Vanilla planifolio, V. pompona</i>	"vanillin"

Baharatlar, bitkisel kaynaklı esansiyel yağ ve ekstraktların yüksek protein ve yağ içeriğine sahip gıdalarda yüksek MIC değerleri gerektirmesi, duyuşal açıdan kabul edilebilir sınırların dışına çıkması nedeni ile kullanımları sınırlanmaktadır. Doğal antimikrobiyallerin diğer çevresel stres faktörleri ile kombinasyonları kullanılarak istenmeyen bu etkilerin minimize edilmesi mümkündür. Bu şekilde tüketicilerin minimum işlem görmüş, katkı maddesi içermeyen gıdalara olan talebinin karşılanması söz konusudur (Valero ve Salmeron, 2003).

2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Antimikrobiyal bileşiklerin mikroorganizmalar üzerindeki toksik etkisi belirlenirken genellikle iki yol izlenmektedir. Bunlardan birincisi sürenin sabitlendiği, istenen inhibitör etkiyi sağlayan konsantrasyonun belirlendiği yöntemdir. Diğer izlenen yol ise konsantrasyonun sabit tutularak istenen mikrobiyal seviyeye ulaşılan sürenin belirlenmesidir (Tassaou ve diğ., 2004; Marwan ve Nagel, 1986).

Baharatların ve bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkileri araştırılırken laboratuvar kültür ortamlarından yararlanılmakta, türbidimetrik yöntemler, inhibisyon zonlarının ölçümü, biyomas ağırlıklarının belirlenmesi, mikroorganizma sayımları gibi farklı metotlar kullanılabilir. Ek olarak, diğer antimikrobiyal bileşiklerde olduğu gibi MIC (“minimum inhibitory concentration”: minimum inhibisyon konsantrasyonları) belirlenerek antimikrobiyal etkinlik değerlendirilmektedir (Tassaou ve diğ., 2004; Marwan ve Nagel, 1986).

Antimikrobiyal etkiyi sağlamak üzere literatürde yer alan yöntemlerde;

- I. Antimikrobiyal bileşeni içeren belirli bir çapa sahip kuyucuk ya da filtre kağıdının etrafında oluşan inhibisyon zonunun yarıçap ya da çapı,
- II. Antimikrobiyal maddeyi içeren besiyerinde bakteriyel gelişimdeki azalma,
- III. Sıvı besi ortamında bakteriyel gelişimi engelleyen minimum konsantrasyon,
- IV. Antimikrobiyal bileşeni içeren sıvı besi ortamının optik yoğunluğu ya da empedansındaki değişim,

ölçülmektedir (Nychas ve Skandamis, 2003; Tassaou ve Nychas, 2004).

2.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yönteminde test edilen mikroorganizma ile inokule edilmiş katı agar üzerinde yer alan disk ya da oluşturulan havuzcuk/kuyuya antimikrobiyal eklenmektedir. Agar bünyesinde antimikrobiyalın tekdüze bir şekilde difüzlenebilme yeteneğine dayanarak inhibisyon zonları oluşmakta, bu zonların çapları ölçülerek antimikrobiyal etki hakkında bilgi edinilmektedir (Davidson and Parish, 1989; Nychas ve Skandamis, 2003; Kim ve diğ., 2004; Mann ve Markham, 1998).

İnhibisyon zonunun büyüklüğü etken maddenin çözünürlüğüne ve difüzlenebilme yeteneğine bağlı olmaktadır (Hao ve diğ., 1998). Çok sayıda mikroorganizma ya da çok sayıda antimikrobiyal incelemek için pratik bir yöntem olup, birbiri içerisinde bağlı antimikrobiyal etkiyi belirleme imkanını sağlamakta, yine de test edilen mikroorganizma üzerindeki etkisini belirlemek için tek başına yeterli olmamaktadır (Kim ve diğ., 2004).

2.3.2. Türbidimetrik Yöntem

Türbidimetrik yöntem tahrip edici olmayan, maliyeti düşük, hızlı ancak hassasiyeti düşük bir yöntemdir. Mikrobiyal gelişim eğrisinin üst kısımlarını tespit edebilmektedir. Besi ortamında canlı mikroorganizma sayımları ile sonuçları karşılaştırmak üzere kalibrasyon gerektirmektedir. Bakteriyel hücrelerin farklı gelişim aşamalarındaki sayısına göre adsorbanstaki değişim ölçülmekte, mikrobiyal popülasyon tahminlenmektedir. (Tassaou ve diğ., 2004; Nychas ve Skandamis, 2003).

Spektrofotometrede anlamlı okumalar için 10^6 - 10^7 kob/ml seviyelerinde mikrobiyal yük gerekmektedir. Çoğalma aşamasında olan $<10^5$ kob/ml seviyesindeki mikroorganizmalar bu yöntem ile tespit edilememekte, absorbansta herhangi bir artış gözlenememektedir. Bu dezavantajı elimine etmek amacıyla belirli aralıklarla örnek alınarak bakteriyel gelişimin izlenmesi yararlı olmaktadır (Kim ve diğ., 2004; Davidson and Parish, 1989).

2.3.3. İmpedimetrik Yöntem

İmpedans ölçümüne dayalı yöntem antimikrobiyal maddenin gerçek zaman içindeki davranışlarını izlemek için kullanılabilir. Antimikrobiyal bileşenlerin aktivitelerini izlemek için alternatif hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde, bakteriyel gelişim ile düşük iletkenliğe sahip besin öğelerinin yüksek iletkenliğe sahip bileşenlere dönüşmesi sonucunda oluşan impedimetrik değişim ölçülmektedir. Türbidimetrik yöntemde olduğu gibi plak sayımları ile kalibrasyon gerektirmektedir (Tassaou ve Nychas, 2004; Nychas ve Skandamis, 2003).

2.3.4. Geleneksel Mikrobiyolojik Yöntem

El emeği gerektirmesi ve zaman alıcı olmasına rağmen mikroorganizma sayımına dayanan geleneksel mikrobiyolojik yöntem hala antimikrobiyal çalışmalarda en sık kullanılan yöntemdir. Maliyetinin düşük olması en önemli avantajıdır. Dezavantajları ise yöntemin tekrarlanabilirliğinin zayıf/düşük olması, ek olarak kullanılan materyale bağlı olarak sonuçların farklılık göstermesi ve inkübasyon/bekleme süresinin uzun olmasıdır (Tassaou ve Nychas, 2004).

2.3.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)

Birden fazla konsantrasyonda test edilen antimikrobiyal bileşenin mikrobiyal gelişimi tamamen yok ettiği/engellediği en düşük konsantrasyon MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak tanımlanmaktadır. MIC belirlemek için sıvı ya da katı agar besi ortamında antimikrobiyal dilüsyonlarının hazırlanması sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır (Kim ve diğ., 1995; Mann ve Markham, 1998; Lambert ve diğ., 2000). Bir antimikrobiyal için MIC değeri mikroorganizma, inkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı gibi analiz koşullarına bağlı olmaktadır. Son yıllarda aynı anda çok sayıda mikroorganizma ve antimikrobiyal araştırma olanağı sağlayacak şekilde “Bioscreen Microbiological Growth Analyzer” cihazı geliştirilmiştir (Tassaou ve Nychas, 2004).

2.4. Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkili Faktörler

Antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olan ve yapılan çalışmaların çıktılarında farklılıklara neden olan faktörleri 5 grupta toplamak mümkündür (Nasar-Abbas ve Halkman, 2004; Tassaou ve diğ., 2004; Negi ve diğ., 1999; Bagamboula ve diğ., 2003; Valero ve Salmeron, 2003; Ultee ve diğ., 2000; Davidson ve Naidu, 2000).

- I. Test edilen baharat, ekstrakt ya da esansiyel yağ ile ilgili faktörler (bitkisel kaynağın orjini, kompozisyonu, hasat zamanı, yetiştirildiği bölge, rakım vb.)
- II. Test edilen mikroorganizma (suş, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, inokulum miktarı),
- III. Çevresel faktörler (Sıcaklık, süre, oksijen),
- IV. Kullanılan metot (Mikroorganizma sayımı, besiyeri),
- V. Besiyeri/gıdanın bileşimi (Yağ, protein, tuz ve su içeriği, pH).

2.4.1. Bitkisel Antimikrobiyaller

Bitkisel esansiyel yağ veya ekstraktın antimikrobiyal aktivitesi ekstraksiyon metoduna ve bitkinin esansiyel yağ içeriğine/miktarına bağlıdır. Bir bitkinin aktif antimikrobiyal bileşen içeriği kendi içinde farklılık gösterebilmektedir. Aynı yıl içerisinde farklı zamanlarda hasat edilen “Lemongrass” bitkisinin esansiyel yağlarının antimikrobiyal etkinliğinin değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Mayıs ile Aralık ayları arasında toplanan “Lemongrass”tan ekstrakte edilen esansiyel yağ test

edilen mikroorganizmaların %100'ünü inhibe ederken, Şubat ile Nisan ayları arasında toplanan “lemongrass” esansiyel yağı ancak %73-80 üzerinde etkili olmuştur. Bu nedenle esansiyel yağ saflığını ve aktif bileşenin konsantrasyonu standardize edecek yöntemlerin oturtulması/araştırılması gerekmektedir (Lopez-Malo ve diğ., 2000).

Bitkisel materyalin kendisi, esansiyel yağı ya da oleoresini gibi kullanıldığı forma göre antimikrobiyal etki değişmektedir. Gurdip ve diğerleri, zencefil (*Zingiber officinale*) esansiyel yağı ve oleoresininin GC-MS ile kompozisyonlarını belirlemiş, antifungal etkilerini araştırmıştır. Zencefil esansiyel yağının % 96,93'ünü oluşturmak üzere 69 bileşen tespit edilmiş, başlıca bileşenlerin “zingiberene”, “beta-phellandrene”, “camphene” ve “ar-curcumene” olduğu tespit edilmiştir. Oleoresinde saptanan 34 bileşen arasında en çok yüzdeye sahip olan bileşenler ise “trans-6-shogaol”, “trans-10-shogaol”, “alpha-zingiberene”, “10-gingerdione” olarak belirlenmiştir. Oleoresin *Aspergillus niger*, esansiyel yağ ise *Fusarium oxysporum* üzerinde %100 antifungal etki göstermiştir (Gurdip ve diğ.2005).

2.4.2. Mikroorganizmalar

Yapılan çalışmalar Gr (+) bakterilerin Gr (-) bakterilere göre bitkisel kaynaklı antimikrobiyallere karşı daha hassas olduğunu göstermiştir (Kim ve diğ., 1995; Bagamboula ve diğ., 2003; Yuste ve Fung, 2002; Lemay ve diğ., 2002; Nasar-Abbas ve Halkman, 2004).

Etkisi araştırılan bitkisel kaynaklı ekstrakt veya esansiyel yağ bazı mikroorganizmalar üzerinde etkili iken, bazı mikroorganizma üzerinde etkili olamamaktadır. Antimikrobiyal aktivite de test edilen suşa göre farklılık gözlenmektedir. *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* suşları üzerinde 17 farklı baharat ve bitki esans yağlarının etkisinin incelendiği çalışmada sadece karanfil esansiyel yağı bütün suşlar üzerinde inhibisyon sağlarken, kekik, yenibahar, fesleğen, kuşburnu ve mercanköşk *S. flexneri* CIP suşu hariç diğer suşlar üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir (Bagamboula ve diğ., 2003).

2.4.3. Çevresel Faktörler

2.4.3.1. Oksijen

Esansiyel yağların antimikrobiyal etkinliğini yakından ilgilendiren bir diğer faktör oksijen varlığıdır. Anaerobik ve mikroaerobik koşullarda kekik esansiyel yağının *S. enteritidis* ve *S. aureus* üzerinde etkisinin aerobik koşullara göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ortamda daha az oksijenin bulunması ile esansiyel yağın daha az oksidatif değişikliğe uğrayarak etkinin arttığı düşünülmektedir. Bir diğer çalışmada vakum ve modifiye atmosferde (%40 CO₂ : %30 O₂ : %30 N₂) kekik esansiyel yağının aerobik koşullara göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Nychas ve Skandamis, 2003).

2.4.3.2. Sıcaklık

Sıcaklık arttıkça baharat ve bitkisel kaynaklı ürünlerin antimikrobiyal etkisinin arttığı belirtilmektedir (Hao ve diğ., 1998).

Pastörize elma suyunda toz tarçının antilisteriasidal etkisi iki farklı sıcaklık (5-20 °C) ve pH (3,7-5,0) değerinde incelenmiştir. Düşük sıcaklıkta *Listeria monocytogenes* canlılığını sürdürürken, 20 °C’de muhafaza edilen ve % 0,1 tarçın içeren pastörize elma suyunda *L. monocytogenes* üreme göstermemiştir. Düşük sıcaklıklarda mikroorganizmanın metabolik faaliyetleri yavaşladığından hücrelerin inaktivasyonunun da yavaşladığı, ek olarak düşük sıcaklıklarda tarçın esansiyel yağının antimikrobiyal etkiye sahip bileşenlerinin mikrobiyal hücre içine penetrasyonunda azalmanın buna neden olabileceği ifade edilmiştir (Yuste ve diğ., 2002).

Bazı esansiyel yağ ve bileşenlerinin *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella enterica* üzerinde bakterisit etkisi araştırılırken elma suyu 4, 21 ve 37 °C olmak üzere farklı sıcaklıklarda muhafaza edilmiştir. Sıcaklık arttıkça antimikrobiyal etkinin de arttığı gözlenmiştir (Friedman ve diğ., 2004).

2.4.3.3. Süre

Friedman ve çalışma arkadaşları sıcaklığın etkisi ile beraber *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella enterica* üzerinde süre faktörünü değerlendirmiş, 5, 60 ve 120 dakika

olmak üzere farklı süreler denenmiştir. İnhibitör etkinin süre ile beraber arttığı rapor edilmiştir (Friedman ve diğ., 2004).

2.4.4. Antimikrobiyal Test Yöntemleri

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek üzere kullanılan yöntem sonuçlar üzerinde etkili olmaktadır. *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* suşları üzerinde agar dilüsyon yöntemi ile MIC değeri kuşburnu, kekik, mercanköşk için % 0,5 (w/vol) ve fesleğen için %1 (w/vol) bulunurken, sıvı kültür ortamında % 10 (w/vol) seviyesinde antimikrobiyal etki gözlenememiştir (Bagamboula ve diğ., 2003).

2.4.5. Ortam Bileşenleri

2.4.5.1. Yağ

Gıda bileşiminde bulunan yağın bakteri hücresinin antimikrobiyal ile temasına engel olduğu, hidrofobik esansiyel yağ ya da fenolik bileşenleri sarmalayarak antimikrobiyal etkiyi azalttığı bilinmektedir (Skandamis ve diğ., 2002).

Defne, karanfil, tarçın ve kekik esansiyel yağlarının mikrobiyal gelişim üzerindeki etkisini incelemek üzere *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis* ile inokule edilen tam yağlı ve yarım yağlı beyaz peynir 14 gün boyunca 4 ve 10°C sıcaklıklarda muhafaza edilmiştir. Belirli zaman aralıkların örnekler alınarak mikrobiyal popülasyon izlenmiştir. Yarım yağlı beyaz peynir için her 4 esansiyel yağ %1 konsantrasyonda *L. monocytogenes*'i inhibe ederken, tam yağlı peynirde aynı etkiyi sadece karanfil esansiyel yağı gösterebilmiştir. Besiyeri üzerinde kekik esansiyel yağı *S. enteritidis* tamamen inhibisyon sağlarken, tam yağlı beyaz peynirde bu etki gözlenememiştir. Yarım yağlı peynirde ise her 4 esansiyel yağ ancak 4 gün sonunda *S. enteritidis* sayısında 1 log'dan daha az düşüş sağlayabilmiştir (Nychas ve Skandamis, 2003; Smith-Palmer ve diğ., 2001).

2.4.5.2. Protein

Gıdanın protein içeriği de antimikrobiyal etkinlik üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Bakteriyel hücre zarındaki proteinlerle kompleks oluşturan fenolik bileşenler hücre zarının işlevini olumsuz etkilemektedir. Antimikrobiyal bileşenin gıdanın bileşiminde bulunan proteinler ile kompleks oluşturması ise antimikrobiyal etkiyi zayıflatmaktadır (Smith-Palmer ve diğ., 2001).

Kültür ortamında tripton ya da maya ekstraktının katılması ile oleuropeinin aktivitesi azalmıştır. Fenolik bileşenler ve proteinler arasındaki etkileşim proteinin karakteristiğine, pH değerine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu etkileşimde peptitler ve fenolik gruplar arasında hidrojen bağları olduğu ve antimikrobiyal etkiyi zayıflattığı düşünülmektedir (Lopez Malo ve diğ., 2000).

2.4.5.3. Gıdanın Katı/Sıvı Yapıda Olması

Sıvılarda bakteriyel gelişim planktonlar şeklinde olurken, katı matris yapısında ise ayrı koloniler halinde gelişim göstermektedir. İmmobilize olan hücreler katılarda oldukça yoğun bir şekilde lokalize olmaktadır. Yapılan çalışmalar bakterilerin gıdalarda gösterdiği fizyolojik davranışın, sıvı kültür ortamlarında olduğu gibi özgür davranıştan uzak olduğunu göstermiştir. Gıdanın heterojen yapıya sahip olması (katı-sıvı) gıda yapısında pH farklarının oluşumuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda antimikrobiyal konsantrasyon ve mikrobiyal populasyon gıda içinde tekdüze olmayan bir şekilde dağılmakta, bu ise antimikrobiyal aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir (Tassaou ve Nychas, 2004).

2.4.5.4. pH

pH düştükçe genellikle antimikrobiyal etkinin arttığı bilinmektedir. Düşük pH değerlerinde fenolik bileşenlerin çözünürlük ve stabilitesi artmaktadır. “Tyhmol” ün *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde etkisinin araştırıldığı çalışmada fenolik aktif bileşenin hücre zarı üzerinde etki gösterdiği, hücresel bütünlüğün korunamaması ile hücresel yıkımın meydana geldiği belirlenmiştir. Düşük pH değerlerinde “thymol” molekülünün hücre zarının lipid fazında daha iyi çözünmekte, hücre zarının membran proteinlerine daha kolay bağlanarak hücre zarının yıkımını hızlandırmaktadır (Lopez-Malo ve diğ., 2000).

2.4.4.5. Su Aktivitesi (a_w)

Gıdanın düşük su aktivitesine sahip olması antimikrobiyalin bakteriyel hücreye transferini zorlaştırmakta, antibakteriyel etkiyi azalttığı bilinmektedir (Smith-Palmer ve diğ., 2001).

Sıvı kültür ortamında kekik esansiyel yağı *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerinde inhibisyon sağlarken, emülsiyon ve yarı-emülsiyon yapısındaki patlıcan ezmesi, tarama ve mayonez gibi gıda örneklerinde

antimikrobiyal etki pH, sıcaklık ve yağ içeriği gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* gibi patojen mikroorganizmalar ile inokule edilen tüketime hazır yemeklerin pH aralığı 4-5,3 olacak şekilde ayarlanmış, 0-20°C arasında muhafaza sıcaklıklar ve % 0- 2,1 arasında değişen mercanköşk esansiyel yağ konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Her iki patojen mikroorganizma sayımında azalma gözlenmiş ve sonuçlar üzerinde pH, muhafaza sıcaklığı ve esansiyel yağ konsantrasyonunun etkili olduğu belirlenmiştir (Nychas ve Skandamis, 2003; Skandamis ve diğ., 2002).

2.4.4.6. Tuz

Kültür ortamı farklı tuz içeriği (%1–4) ve pH (5–5,5–6) değerlerine getirilerek elde edilen model sistemde kekik ve fesleğenin *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* üzerinde antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. pH değeri sabit iken tuz içeriği artırıldığında inhibitör etki artmıştır (Bagamboula ve diğ., 2003).

2.5. “In vitro” ve Gıdalar üzerinde Yapılan Çalışmalar

Gıdalar üzerinde yapılan çalışmalarda patojen mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli konsantrasyonun, laboratuvar ortamında test edilen ve belirlenen konsantrasyondan daha yüksek olması gerektiği belirlenmiştir. Gıda maddesinin besiyeri ortamından daha karmaşık bir gelişme ortamı sunarak, antimikrobiyal bileşiklere karşı mikroorganizmalara daha iyi bir koruma sağladığı tahmin edilmektedir (Smith-Palmer ve diğ., 2001; Gould, 1996; Meyer ve diğ., 2002). Gıdaların katı ya da sıvı besi ortamlarına göre kompleks bir yapıda olması, gıdanın yağ içeriğinin bakteri hücresi üzerinde bir tabaka oluşturarak antimikrobiyal ajandan koruduğu ileri sürülmektedir. Bir diğer yaklaşım ise aktif bileşenlerin yağ/lipit ve sulu faz içerisinde dağılması, gıdanın yağ fraksiyonunun antimikrobiyal ajanı absorplaması ve su fazındaki yağ konsantrasyonunun azalması ile bakterisit etkinin de beraberinde azalmaya neden olmasıdır (Mann ve Markham, 1998; Smith-Palmer ve diğ., 2001; Cutter, 2000).

Defne, karanfil, kekik ve tarçın esansiyel yağları *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella enteritidis* üzerinde laboratuvar koşullarında % 0,1'den daha düşük konsantrasyonlarda inaktivasyon sağlarken, taze peynir üzerinde % 0,5 ile % 1 olmak üzere daha yüksek konsantrasyonlar gerekmektedir (Smith-Palmer ve diğ., 2001)

Kültür ortamında nane (“*mentha piperita*”) esansiyel yağı 30 °C’de 2 gün inkübasyon sonunda *S. enteritidis* ve *L. monocytogenes*’i inhibe etmiştir. Ancak 4 ve 10 °C gibi 2 farklı sıcaklıkta pH 4,5 olan cacık (“*tzatziki*”), pH 5,0 olan “*tarama*” ve pH 6,8 olan kaz ciğeri ezmesi (“*paté*”) gibi mezeler üzerinde nane esansiyel yağının antimikrobiyal etkinliği farklı sonuçlar vermiştir. 10 °C’de muhafaza edilen kaz ciğeri ezmesinde *S. enteritidis* canlı kalırken, tarama ve cacıkta her iki sıcaklık için inhibisyon sağlanmıştır. Benzer şekilde tarama ve cacıkta *L. monocytogenes* gelişimi azalırken, kaz ciğeri ezmesinde artış göstermiştir (Nychas ve Skandamis, 2003).

2.6. Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Fenolik bileşenlerin gösterdiği antimikrobiyal etki mekanizması konsantrasyona bağlı gerçekleşmektedir. Düşük konsantrasyonlarda enerji üretiminde görev alan enzimlere etki ederken, yüksek konsantrasyonlarda protein denaturasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Etki mekanizması ile ilgili bir diğer yaklaşımda mikrobiyal gelişim ve toksin oluşumuna engel olacak şekilde hücre zarının tahrip olduğu ve makromoleküllerin hücre dışına çıkarak hücresel bütünlüğün kaybolduğu ileri sürülmektedir. Hücresel enerji üretimi ve yapısal bileşenlerin sentezinde etkili olan enzim sisteminin hasara uğratılması da hücresel ölümü beraberinde getirmektedir (Kim ve diğ. 2004, Tassaou ve Nychas, 2004, Meyer ve diğ., 2002; Cutter, 2000).

2.7. Toksikolojik özellikler

Fenolik bileşenler bitkisel ürünlerde doğal olarak önemli miktarlarda bulunmaktadır. Çok az sayıda doğal fenol toksik etkiye neden olmakta, bir kısmı hayvanlarda alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. İnsan sağlığı açısından çok az sayıdaki olumsuz vakada aşırı tüketilmiş olması dikkat çekmektedir. Bitkilerde bulunurluklarına göre “yaygın”, “çok yaygın olmayan” ve “nadir” olarak 3 grupta incelemektedir. Toksik etkiye sahip fenoller ise 3. grupta yer almakta olup, bulunma olasılığı oldukça düşüktür (Lopez-Malo ve diğ., 2000).

Bir çok bitki, baharat, esansiyel yağ, ekstrakt ve etken maddesi toksikolojik açıdan araştırılmıştır. Gıdalarda kullanılabilecek nitelikte (food-grade) oldukları belirlenmiş ve GRASS (Generally recognized as safe) statüsüne alınmıştır (Kim ve diğ., 1995; Tassou ve diğ. 2004; Meyer ve diğ., 2002; Hao ve diğ., 1998).

2.8. Baharatların Mikrobiyolojik Kalitesi

Gıda üretiminde kullanılan baharatların mikrobiyolojik kalitesi son ürün açısından büyük önem taşımaktadır. Hijyenik koşullarda üretilmemiş baharatlar kontaminasyon kaynağı olabilmektedirler (Enikova ve diğ., 2004; Aran, 1988). Gıda sektöründe daha ekonomik olmaları, istenilen duyuşsal etkiyi daha düşük miktarlarda sağlamaları nedeniyle esansiyel yağlar ve oleoresinler daha fazla tercih edilmektedirler. Çeşitli distilasyon ve ekstraksiyon yöntemleriyle elde edildikleri için gıdaya böcek vb. zararlı bulaşma riski ortadan kaldırılmakta, mikrobiyal kirlilik ürüne taşınmamaktadır (Lewis, 1984).

Enikova ve arkadaşlarının Bulgaristan orjinli tohum ya da öğütölmüş formdaki kırmızı biber, beyaz biber, kimyon, tarçın, kişniş gibi baharatların mikrobiyolojik kalitesi üzerinde yaptıkları çalışmada *Bacillus* spp. mikroflorada baskın olduğu, maya ve küflerin de yer aldığı saptanmıştır. Patojen saptanmamış olup, kırmızı biber örneklerinin mikrobiyal yükünün yüksek olduğu belirlenmiştir (Enikova ve diğ., 2004).

2.9. Greyfurt Çekirdeği Ekstraktı (GSE)

Greyfurt çekirdeği ve pulpundan elde edilen greyfurt çekirdeği ekstraktı viskoz bir yapıdadır. Acılık ve asitliği gidermek amacıyla ticari olarak satışı sunulan GSE'ye gıda saflığında gliserin katılmaktadır. Polifenolik bileşen içeriği yüksek olup, “quercitin”, “helperidin”, “campherol glycosid”, “neohelperidine”, “naringin”, “apigenin”, “rutinoside”, “poncirin” fenolik bileşenlere örnek verilebilmektedir (Anonymous, 2006).

Heggers ve arkadaşları GSE'nin hücre zarının fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek, mikroorganizma ve sporları inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. STEM (“Scanning Transmission Electron Microscopy”) ile hücre zarının hasar gördüğu, sitoplazmik içeriğin dağıldığı belirlenmiştir (Heggers ve diğ., 2002).

Park ve diğ. (2004), greyfurt çekirdeği ekstraktı ve zeolit içeren kağıt ile ambalajlanan Satsuma mandalina ve armutun 10°C sıcaklıkta depolama süreci içerisinde kalite karakteristiklerini incelemişlerdir. Muhafaza süresi boyunca ağırlık kaybı, pH, toplam asitlik, çözünür katı madde (soluble solid content), mikrobiyal yük ve çürüme izlenmiştir. Antimikrobiyal içeren kağıt ile ambalajlanan mandalinalarda

toplam bakteri, maya ve küf sayıları azalma göstermiş, bozulma/çürüme gecikmiştir. Armutta mikrobiyal yükteki azalma mandalinaya göre daha az gerçekleşmiştir. Çalışma sonucunda armut ve mandalina için antimikrobiyal madde içeren kağıt ile ambalajlamanın diğer kalite parametrelerinde herhangi bir olumsuzluğa neden olmadan mikrobiyal yükü azaltmak uygun bir yöntem olduğu ifade edilmiştir.

Furuhata ve diğ. (2003), gıda sektöründe dikkat çeken ve kullanım alanı bulan greyfurt çekirdeği ekstraktının (GSE) havuz, banyo vb amaçla kullanılan sularda risk oluşturan 26 *Legionella pneumophila* suşu üzerinde antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Disk difüzyon yönteminde oluşan inhibisyon zonları GSE'nin bütün suşlar üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri 98-390 mg/l aralığında belirlenmiş olup, suşların %90'ı için minimum inhibisyon konsantrasyonu 390 mg/l olarak tespit edilmiştir.

Reyes ve diğ. (2003) tarafından dilimlenmiş dana eti yüzeyindeki bakteriyel kontaminasyonun sprey yıkama işlemiyle giderilmesi/azaltılması amacıyla klordioksit (25 ve 40 ppm), ozon (0,25 ve 0,50 ppm), greyfurt çekirdeği ve pulp ekstraktı (Kilol) (400 ve 800 ppm) kullanılmıştır. Dilimler hayvan gübresi/dışkısı veya *E. coli* biyotip 1 veya *Salmonella typhimurium* ile kontamine edilmiş, klordioksit, ozon ve Kilol (R) belirtilen konsantrasyonlarda et dilimlerinin üzerine püskürtme yöntemi ile uygulanmıştır. Her üç uygulama et dilimleri yüzeyindeki toplam bakteri sayımında azalmaya neden olurken, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli seviyede dekontaminasyon sağlayamamıştır. Antibakteriyel etkiyi sağlayan uygulamalar Kilol 800 ppm > Kilol 400 ppm > Klordioksit (40 ppm) olarak sıralanmıştır. Kilol, 800 ppm konsantrasyonunda aerobik mezofilik bakteri, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* biyotip 1 ve *Salmonella typhimurium* sayısında 1,75–2,39 log/ cm² azalmaya neden olmuştur.

Hasat sonrası bozulma reaksiyonlarını geciktirmek amacıyla doğal bir antimikrobiyal olan greyfurt çekirdeği ekstraktı ile muamele edilen, polietilen film ile ambalajlanan meyve ve sebzelerin 10–15 °C'de muhafaza sürecinde kontrole göre üstün renk ve dokuya sahip olduğu tespit edilmiştir. GSE meyve ve sebzelerin bozulma/çürüme reaksiyonlarında rol alan bakteri ve küfleri inhibe etmiştir. Test edilen mikroorganizmalar *Bacillus subtilis*, *Erwinia aroideae*, *E. coli*, *Rhizopus nigricans*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum*, *Trichoderma viride* and *Trichothecium roseum* olup minimum inhibisyon

konsantrasyonları 250–500 ppm aralığında tespit edilmiştir. Bu doğrultuda salatalık, üzüm, patlıcan, salata yeşillikleri ve kivi gibi taze meyve sebzelerin hasat sonrası raf ömrünü uzatmak, bozulmalarını geciktirmek amacıyla kullanılabileceği ifade edilmiştir (Cho ve diğ., 1994).

2.10. Mikroorganizmalar

2.10.1. *Bacillus cereus*

Patojen bakteriler arasında *Bacillus cereus*, Gr(+), sporlu aerobik koşullarda daha iyi gelişebilen fakültatif anaerobik, intoksikasyon ve enfeksiyon etkeni bir bakteridir. Psikrotrofik ve mezofilik türleri vardır (Andersson ve diğ., 1995; Aksu ve Ergün, 1996a; Aksu ve Ergün, 1996b; Turner ve diğ., 1996). Sporların ısıya dirençleri nedeniyle ısıl işlem uygulanan gıdalarda gıda güvenliğini etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Johnson, 1984; Granum, 1994 ve 1997; Notermans ve Batt, 1998).

Doğada yaygın olarak bulunan bu bakteri oluşturduğu toksinlerle gıda zehirlenmelerine neden olduğu gibi gıdaların kokuşma ve bozulmasında da rol oynamaktadır (Turner ve diğ., 1996; Valero ve Salmeron, 2003). Vejetatif hücreleri ısıl işlem ile kolayca inaktive olmaktadır. Ancak sporları ısıya dirençli olup uygun koşullarda gelişerek intoksikasyona neden olabilmektedir (Ultee ve diğ., 2000). Genellikle 10°C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişemeyen mezofilik *B. cereus* suşları olduğu gibi, psikrotrofik suşlar 7°C'nin altındaki sıcaklıklarda canlılığını sürdürebilmekte, özellikle buzdolabında muhafaza edilen ürünler için risk oluşturmaktadır (Valero ve Salmeron, 2003; Dufrenne ve diğ., 1994)

Pirinç ve pirinçli yiyecekler başta olmak üzere, tüketime hazır gıdalar, çiğ veya pişmiş et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, kutulmuş gıdalar, baharatlar, soslar, kremalı tatlılar *B. cereus*'un izole edildiği zehirlenmelerde yer alan çok çeşitli gıdalar arasındadır (Aksu ve Ergün, 1996a; Ultee ve diğ., 2000; Harmon ve Kautter, 1991).

B. cereus'un neden olduğu zehirlenmeler oluşturdukları toksinlere bağlı olarak 2 şekilde gerçekleşmektedir. Birincisi gıdanın tüketilmesinden 1–6 saat içerisinde kısa sürede bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishal gibi semptomlar oluşturan emetik tip gıda zehirlenmesidir. Enterotoksin 121°C'de 90 dakikalık ısıl işleme ve 2-11 arasında değişen pH değerlerine dayanıklılık gösterebilmektedir. Diyaretik tip gıda

zehirlenmesinde ise emetik tipte gözlenen kusma genellikle gözlenmez ve gıdanın alınmasından 6–15 saat sonra karın ağrısı ve ishal gibi semptomlar meydana gelir. Diyaretik tip intoksikasyon etmeni olan toksin ısıya dirençsizdir. Emetik tip zehirlenmelere kıyasla diyaretik zehirlenmeler daha az sıklıkla karşılaşılmakta ve semptomlar daha hafif seyretmektedir (Aksu ve Ergün, 1996a; Ultee ve diğ., 2000).

2.10.2 *Escherichia coli* O157:H7

Yeni gıda kaynaklı patojenler arasında değerlendirilen *Escherichia coli* O157:H7 Enterobacteriaceae ailesi içerisinde bulunan, Gr (-), fakültatif anaerob, sporsuz, çubuk şeklinde bir bakteridir. Enterohemorajik *E. coli* O157:H7, 1982 yılında gıda patojeni olarak tanınmış, insan sağlığını tehdit eden mikroorganizmalardan biri olduğu kabul edilmiştir. Oluşturduğu verotoksinler hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombotik trombositopenik purpura gibi hastalıklara neden olmaktadır (Takikawa ve diğ., 2002; Bell ve Kyriakides, 2002a). Aside dirençli olması sindirim sisteminde canlılığını korumasını sağlar ve mevcut salgınlardan elde edilen verilere göre, çok az sayıdaki hücre (<100) zehirlenmeye sebebiyet verdiği bildirilmektedir (Takikawa ve diğ., 2002; Friedman ve diğ., 2004; Bell ve Kyriakides, 2002a).

Pastörize edilmemiş süt ürünleri, meyve suları ile yetersiz pişirilmiş et ürünleri, iyi yıkanmamış salatalar, sular riskli gıdalar olup, zehirlenme vakalarında *E. coli* O157:H7'nin izole edildiği gıdalar elma şırası, kıyma, kanatlı etleri, süt, hamburger, jambon ve peynirli sandviç gibi ürünlerdir (Kim ve diğ., 2004).

Ürettiği toksin *Shigella dysenteria* tip I tarafından üretilen toksine benzerliğinden dolayı Shiga-benzeri toksin olarak adlandırılır. Bağırsaklarda aktif olan bu toksinler, endotel hücrelere bağlanarak hemolitik kolite neden olmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002a)

A.B.D.'nde *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu yılda yaklaşık 20000 adet zehirlenme vakası ve 250 adet HUS ve çeşitli komplikasyonlara bağlı ölüm rapor edilmektedir (Temelli, 2002).

Optimum gelişme sıcaklığı 37°C olan patojen bakteri, 7–10°C'lerden 50°C'lere kadar geniş bir aralıkta gelişebilmektedir. En iyi pH 7,0'de gelişme göstermesine rağmen pH 4,5-9,0 aralığında da gelişme gösterdiği bildirilmektedir. Ek olarak, 0.95 (a_w) ve altındaki su aktivitesine sahip, pH 4,4'ten daha asidik gıdalarda

gelişebilmekte, % 6,5 gibi orta seviyede tuzda canlılığını koruyabilmektedir (Bell ve Kyriakides, 2002a; Temelli, 2002).

2.10.3. *Salmonella enteritidis*

S. enteritidis Gr(-), fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, enfeksiyon etkeni bir bakteridir. Kontamine gıdanın tüketiminin ardından 12–72 saat içerisinde ishal, karın ağrısı, kusma ve ateş gibi semptomlara neden olmaktadır. İyileşme süreci 2–7 gün olup, bazı vakalar ölümle sonuçlanabilmektedir. Optimum gelişme sıcaklığı 5,2–46,2 °C olup, yüksek su aktivitesine (0,98) sahip gıdalarda ısıl işlem ile kolaylıkla inaktive olabilmektedir. Ancak düşük su aktivitesine sahip, yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda daha yüksek sıcaklıklar gerekebilmektedir. pH: 3,8- 9,5 gibi geniş bir aralıkta canlılıklarını koruyabilmektedir (Bell and Kyriakides, 2002b.).

Çiğ veya yeterince ısıl işlem uygulanmamış yumurtalar ile tavuk, hindi gibi kanatlı et ürünleri *Salmonella enteritidis*'in sıklıkla izole edildikleri gıdalar arasındadır (Doyle ve diğ. 1997; Blackburn ve McClure, 2002; Smith-Palmer ve diğ. 2001).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYALLER

3.1.1. Bakteri Kùltürleri

Bu alışmada, *Bacillus cereus* DSMZ 4312 (emetik tip), *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 ve *Salmonella enteritidis* KUKEN 369 suşları kullanılmıştır. Stok kùltürler Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck KgaA, Darmstadt, Almanya)'da +4°C'de muhafaza edilmiştir, 35 °C'de 24 saat inkùbe edilerek tazelenmiştir.

3.1.2. Kùltür Ortamları

Deneyisel alışmalar boyunca besiyeri olarak Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck KgaA, Darmstadt, Almanya) ve Tryptic Soy Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.3. Greyfurt ekirdeği Ekstraktı (GSE)

Çalışmada kullanılan greyfurt çekirdeği ekstraktı (GSE) ticari olarak Citril 200 adı altında satılmakta olup Peyma-Chr.Hansen's Peynir Mayası San. ve Tic. A.ř. (İstanbul) firmasından temin edilmiştir. Hesaplamalarda Citril 200'ün % 60 GSE içerdiği dikkate alınmış, çalışmalarda GSE konsantrasyonları verilmiştir.

3.1.4. Esansiyel Yağ ve Oleoresinler

Maydanoz, kimyon esansiyel yağları ve zencefil, paprika, kimyon, maydanoz oleoresinleri IFF Aroma Esans Sanayi ve Ticaret A.ř. (Gebze-Kocaeli) firmasından temin edilmiştir. Òrnekler orjinal ambalajları içinde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.5. Gıda Òrneęi

Gıda òrneęini hazırlamak için kullanılan yağsız kıyma, domates salçası, tuz ve karabiber İstanbul'da çeşitli marketlerden temin edilmiştir.

3.2. METOTLAR

3.2.1. Kağıt Disk Yöntemi ile İnhibisyon Zonlarının Belirlenmesi

TSA'da bulunan *B. cereus*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* stok kültürlerinden öze ile TSA'ya öze ile aşılama yapılmıştır. Aşılanan örnekler 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteriyel süspansiyonun türbiditesi pepton çözeltilisinde McFarland standardı ile karşılaştırılarak 10^5 – 10^6 kob/ml seviyelerine getirilmiş, dökme plak yöntemiyle 1 ml bakteri ekimi yapılmıştır. Katılaşıp agar üzerine 3 adet 6 mm çapında hazırlanan steril Whatman Filter No:1 filtre kağıdı pens yardımı ile yerleştirilmiştir. Viskoz bir yapıda olan greyfurt çekirdeği ekstraktının steril su ile hazırlanan % 0,3 (v/v)'lük stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan GSE stok çözeltisinden, oleoresin ve esansiyel yağlardan otomatik pipet ile 10 µl filtre kağıdı üzerine eklenmiştir. Kağıt diskin test edilen materyali emmesi için petrilere 20 dakika bekletilmiştir. 35 °C'de 24 saat düz olarak inkübasyonun ardından kağıt disk etrafında oluşan zon ölçülmüştür (Sağdıç ve Özcan, 2003).

3.2.2. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Antimikrobiyal etkisi araştırılan maydanoz esansiyel yağının TSA ile (62,5-125-250-500-1000-1500-2000-2500-3000-4000 ppm) konsantrasyonları, kimyon esansiyel yağının (62,5-125-250-500-1000-1500-2000-2500-3000 ppm) ve GSE için ise (9,38-18,75-37,50-75-150-300-600 ppm) konsantrasyonları hazırlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan TSA 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, 50 °C'ye getirilen agar petrilere eşit miktarda dağıtılmıştır. Mc Farland standardı ile yaklaşık 10^3 kob/ml seviyesinde 100 µl test kültürü yayma plak yöntemi ile inokule edilmiştir. 35 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından mikrobiyal üremenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) olarak belirlenmiştir. (Ahn ve diğ., 2004; Negi ve diğ., 1999; Bagamboula ve diğ., 2003).

3.2.3. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Yağın antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini belirlemek üzere % 0, 10 ve 20 ayçiçek yağı ve 0-37,5-150-600 ppm GSE konsantrasyonlarında TSB hazırlanmıştır. Emülsiyon oluşumu için % 1,5 (wt/vol) oranında Tween 20 kullanılmıştır. Belirlenen

yağ ve GSE konsantrasyonuna sahip TSB'ler 20'şer ml tüplere dağıtılmıştır. Sterilizasyonun (121 °C, 15 dak.) ardından oda sıcaklığına gelen tüplere Mc Farland standardı ile ayarlanan inokulumdan $\sim 10^3$ kob/ml olacak şekilde 1 ml ekilmiştir. İnkübasyonun (35 °C, 24 saat) ardından besiyerine dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır.

3.2.4. Tween 20'nin Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini belirlemek üzere % 0 ve % 1,5 Tween 20 varlığında %0 ve % 20 yağ içeren TSB'nin 0 ile 600 ppm GSE konsantrasyonları hazırlanmış, 20 ml'lik tüplere dağıtılmıştır. Madde 3.2.2'deki yöntem *S. enteritidis* için aynen tekrarlanmıştır.

3.2.5. Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Yağın antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini belirlemek üzere % 0, 10 ve 20 ayçiçek yağı ve 0-18,75-75-300 ppm konsantrasyonlarında GSE içeren TSB hazırlanmıştır. Belirlenen yağ ve GSE konsantrasyonuna sahip TSB'ler 20'şer ml tüplere dağıtılmıştır. Sterilizasyonun (121 °C, 15 dak.) ardından oda sıcaklığına gelen tüpler karıştırılmış, McFarland standardı ile ayarlanan inokulumdan yaklaşık 10^3 kob/ml seviyesinde 1'er ml ekim yapılmıştır. İnkübasyonun (35 °C / 24 saat) ardından besiyerine dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır.

3.2.6. Gıda Örneğinin Hazırlanması

Kavrulmuş yağsız kıyma 40 ml'lik cam kavanozlara 12,5 g tartılarak eklenmiştir. Domates salçası (%3,25), tuz (% 1,3) ve karabiber (% 0,15) ilavesi ile salçalı su hazırlanmış, 10 g olmak üzere kıymaların üzerine eşit miktarda dağıtılmıştır. % 1,8 konsantrasyonda hazırlanan potasyum sorbat ve GSE stok çözeltilerinden 2,5 ml eklenerek 1800 ppm GSE ve potasyum sorbat konsantrasyonuna sahip örnekler elde edilmiştir.

3.2.7. Gıda Matriksinde GSE ve Potasyum Sorbatın İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması

Hazırlanan numuneler sterilizasyonun (121 °C, 15 dak.) ardından oda sıcaklığına getirilmiş, kıymalı sos steril stomacher torbalarına aktarılmıştır. McFarland standardı ile karşılaştırılarak 10^5 – 10^6 kob/ml seviyesinde 1 ml bakteri ekilmiştir. Bakterinin gıdaya iyice nüfuz etmesini sağlayacak şekilde “stomacher”da (Stomacher 400 Lab Blender, England) 120 sn homojenize edilmiştir. Soğutmalı etüvde 10 °C’de 5 gün süre ile muhafaza edilmiş, 0, 1, 3, 5. günlerde bakteriyel gelişim izlenmiştir. Stomacher torbasındaki numune üzerine 225 ml steril % 0,1 (w/v) peptonlu su eklenerek, “stomacher”da 120 sn homojenize edilmiş, seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her örnek için uygun dilüsyonlarda dökme plak yöntemiyle TSA’ya paralel ekim yapılmıştır. İnkübasyonun (35 °C, 24 saat) ardından sayım yapılmıştır.

3.2.8. İstatistiksel Deneme Deseni

Denemeler iki tekrarlı ve iki paralelli olarak yürütülmüştür. Verilerin istatistiksel analizi iki yollu ANOVA yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Model sistemde ortamın yağ içeriği ve GSE konsantrasyonları ve hem yağ hem de GSE’nin etkileşiminin mikrobiyal gelişim üzerindeki etkisi faktöriyel desen kullanılarak belirlenmiştir. Tek yollu anova ile model sistemde yağ ve konsantrasyonlar içerisindeki farklılıklar, gıda örneğinde ise antimikrobiyaller arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir. Bu amaçla “Minitab® for Windows Release 1.12” programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kağıt Disk Yöntemi ile Elde edilen İnhibisyon Zonları

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* ve *E. coli* O157:H7 bakterilerinin ekildiği petrilerde kağıt diskin etrafında oluşan zon ölçülmüş olup, ortalamaları Tablo 4.1’de verilmektedir

Tablo 4.1. GSE, Esansiyel Yağ ve Oleoresinlerin Oluşturdukları Ortalama İnhibisyon Zonları (mm)

Bitkisel Materyal	Bakteriler		
	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> 0157:H7
GSE	1,7 ± 0,08	5,7 ± 0,19	2,5 ± 0,25
Kimyon E/O (*)	3,0 ± 0,67	10,7 ± 0,60	11,2 ± 0,17
Kimyon O/R(**)	-(***)	-	-
Maydanoz E/O	1,6 ± 0,17	4,2 ± 0,29	3,4 ± 0,23
Maydanoz O/R	-	-	-
Zencefil O/R	-	1,2 ± 0,24	-
Paprika O/R	-	-	-

(*) Esans Yağı; (**) Oleoresin; (***) Zon oluşumu gözlenmemiştir

GSE, kimyon ve maydanoz esansiyel yağı üç bakteri suşu için 1,6-11,2 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluştururken, kimyon, maydanoz ve paprika oleoresinlerinin zon oluşturmadığı tespit edilmiştir. Kimyon esansiyel yağı *S. enteritidis*, *B. cereus* ve *E. coli* 0157:H7 için en geniş inhibisyon zonlarını oluşturmuştur. *S. enteritidis*, *B. cereus* üzerinde GSE, maydanoz esansiyel yağına göre, *E. coli* 0157:H7 üzerinde ise maydanoz esansiyel yağı GSE’ye göre daha geniş zonlar oluşturmuştur.

Karabiber, kırmızıbiber, küçük hindistan cevizi (“nutmeg”) ve karanfil oleoresinlerinin laktik asit bakterileri üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 400 ppm dozlarında çok az inhibisyon sağladıkları ya da hiç sağlamadıkları belirlenmiştir. Akbiber, sarımsak, küçük hindistan cevizi, kişniş ve diğer bazı baharatların etkilerinin *Lactobacillus plantarum* gelişimi ve laktik asit oluşumu üzerinde araştırıldığı bir diğer çalışmada, doğal toz halinde kullanılan baharatların stimulatif etki gösterdiği, ancak aynı dozlardaki oleoresinlerinin herhangi bir etki

göstermediği saptanmıştır (Karapınar ve Aktuğ, 1986b). Besiyerinde yapılan çalışma, sosis üzerinde yinelendiğinde de aynı sonuç elde edilmiştir. Bu araştırmaların sonuçları dikkate alındığında, oleoresinlerin mikroorganizma gelişimi üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etkiye sahip olmadığı, bu açıdan inhibitif veya stimülatif etkilerinin istenmediği durumlarda gıdalara lezzet vermek amacı ile kullanılabileceği ifade edilmiştir (Karapınar ve Aktuğ, 1986b).

Bagamboula ve diğ. (2003) tarafından *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* ve *E. coli* suşları üzerinde çeşitli baharat ve bitkisel kaynaklı ürünlerin etkilerinin incelendiği çalışmada agar dilüsyon yöntemi ile %1 (w/vol) seviyesinde sıvı ve katı besi ortamına eklenen zencefil, paprika ve maydonoz mikrobiyal gelişim üzerinde inhibitör etki göstermemiştir

Kimyon (*Cuminum nigrum L*) metanol ve aseton çözgenleri ile ekstrakte edildiğinde HPLC ve LC-MS ile polifenolik bileşen içeriğinin “gallic acid”, “protocatechuic acid”, “caffeic acid”, “ellagic acid”, “ferulic acid”, “quercetin” ve “kaempferol” den meydana geldiği belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel etki değerlendirilmiş, en fazla hassasiyeti (İnhibisyon zonu: >20 mm) *B. subtilis*, *B. cereus* ve *S. aureus* suşları göstermiştir. *L. monocytogenes*, *Enterobacter spp.* için 5-20 mm aralığında inhibisyon zonlarının oluştuğu, Gr (-) özellikte olan *E. coli* ve *Y. enterocolitica* için ise zon oluşmadığı gözlenmiştir (Ani ve diğ., 2006).

Çeşitli baharatların ve aseton ekstraktlarının *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeuriginosa* bakterileri üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada, kimyon esansiyel yağının *B. cereus* için oluşturduğu zon 20,1 mm olarak tespit edilmiştir. Gr (-) olan *E. coli* ve *S. typhi* bakterileri için inhibisyon zonu oluşmadığı gözlenmiştir. Siyah kimyon ise 2 µl seviyesinde *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis* olmak üzere Gr (+) bakteriler üzerinde tamamiyle inhibisyon sağlarken, *S. typhi*, *P. aeuriginosa* için inhibisyon sağlayamamıştır (Singh ve diğ., 2005). Jirovetz ve diğ. (2005) hidrodistilasyon ile elde ettikleri kimyon esansiyel yağının çeşitli küf, maya ve bakteri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Gr (-) olan *Salmonella abony*, *P. aeuriginosa* bakterileri için inhibisyon zonu gözlenmemiş olup, en yüksek inhibisyon zonu (30–45 mm) *A. niger* küfünde elde edilmiştir. *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus*, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *E. coli* bakterileri için 10–35 mm arasında değişen inhibisyon zonları elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda Gr (+) bakterilerin bitkisel kaynaklı antimikrobiyallere karşı Gr (-) bakterilere göre daha hassas olduğu belirtilmektedir (Kim ve diğ., 1995; Bagamboula ve diğ., 2003; Lemay ve diğ., 2002; Nasar-Abbas ve Halkman, 2004; Skocibusic ve Bezic, 2004). Gr (-) bakterilerin daha dirençli olmaları sahip oldukları dış membranın hidrofilik özellikte olup güçlü bir bariyer gibi davranış göstermesi ile açıklanmaktadır (Yuste ve Fung, 2002; Skocibusic ve Bezic, 2004). Greyfurt çekirdeği ekstraktı ve maydanoz esansiyel yağının oluşturduğu zonlar her üç mikroorganizma için kıyaslandığında Gr (+) bir bakteri olan *B. cereus*'un Gr (-) olan *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis*'e göre daha hassas olduğu gözlenmektedir. Bu açıdan elde edilen sonuçlar diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

4.2. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Antimikrobiyal etki göstermeyen oleoresinler elenerek, maydanoz esansiyel yağı, kimyon esansiyel yağı ve greyfurt çekirdeği ekstraktı ile çalışmalara devam edilmiştir. Agar besi ortamında seri dilüsyonları hazırlanarak üremenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon MIC değeri olarak tespit edilmiştir.

4.2.1. Maydanoz Esansiyel Yağı

Maydanoz esansiyel yağı ile yapılan çalışma Tablo 4.2'de verilmektedir. Her üç bakteri suşu için 62,5-1000 ppm aralığındaki konsantrasyonlarda maydanoz esansiyel yağının inhibisyona neden olmadığı belirlenmiş, bu nedenle kimyon ve GSE'den farklı olarak daha yüksek konsantrasyonlar (1000-4000 ppm) denenmiştir. *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 için bu konsantrasyon aralığındaki bütün petrilere üreme gözlenmiştir. *B. cereus* ise 2000 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda maydanoz esansiyel yağı içeren petrilere gelişmemiştir. Böylece inhibisyon sağlayan en düşük maydanoz esansiyel yağı konsantrasyonu *B. cereus* için 2000 ppm, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* için ise >4000 ppm olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Maydanoz Esansiyel Yağının Agar Dilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Maydanoz E/O Konsantrasyon (ppm)	Bakteriler		
	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
62,5	+(*)	+	+
125	+	+	+
250	+	+	+
500	+	+	+
1000	+	+	+
1500	+	(**)	+
2000	+	-(***)	+
2500	+	-	+
3000	+	-	+
4000	+	-	+

(*) üreme var; (**) denenmemiştir; (***) üreme yok

4.2.2. Kimyon Esansiyel Yağı

Kimyon esansiyel yağı ile yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 4.3'te verilmektedir. *B. cereus* 1000 ppm ve üzerindeki kimyon esansiyel yağı içeren petrilerde inhibe edilmiştir. *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 inhibisyonu için 2500 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlar gerekmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kimyon esansiyel yağının MIC değeri *B. cereus* için 1000 ppm, *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 için ise 2500 ppm olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. Kimyon Esansiyel Yağının Agar Dilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kimyon E/O Konsantrasyon (ppm)	Bakteriler		
	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
62,5	+(*)	+	+
125	+	+	+
250	+	+	+
500	+	+	+
1000	+	-	+
1500	+	-	+
2000	+	-	+
2500	-(**)	-	-
3000	-	-	-

(*) üreme var; (**) üreme yok

4.2.3. Greyfurt Çekirdeği Ekstraktı

Greyfurt çekirdeği ekstraktı 37,50–600 ppm aralığında her üç bakteri için inhibisyon sağlamış, petrilere üreme gözlenmemiştir. Bu nedenle kimyon ve maydanoz esansiyel yağından farklı olarak 37,5 ppm'den daha düşük konsantrasyonlar denenmiştir. *B. cereus* ve *E. coli* O157:H7 çalışılan en düşük konsantrasyon olan 9,38 ppm'de inaktive edilmiş, petrilere üreme saptanmamıştır. *S. enteritidis* ise 18,75 ppm GSE konsantrasyonunda inhibe olurken, 9,38 ppm GSE konsantrasyonu inhibisyon için yeterli olmamıştır. Bu çalışma ile greyfurt çekirdeği ekstraktının MIC değeri *S. enteritidis* için 18,75 ppm olarak belirlenirken, *B. cereus* ve *E. coli* O157:H7 için MIC değerinin < 9,38 ppm olduğu tespit edilmiştir. Greyfurt çekirdeği ekstraktı ile yapılan çalışmanın sonuçları Tablo 4.4'de verilmektedir.

Tablo 4.4. Greyfurt Çekirdeği Ekstraktının Agar Dilüsyon Yönteminde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

GSE Konsantrasyon (ppm)	Bakteriler		
	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
9,38	+	-	-
18,75	-	-	-
37,50	-	-	-
75	-	-	-
150	-	-	-
300	-	-	-
600	-	-	-

(*) üreme var; (**) üreme yok

4.2.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MIC)

GSE, maydanoz ve kekik esansiyel yağlarının *S. enteritidis*, *B. cereus* ve *E. coli* O157:H7 için agar dilüsyon yöntemi ile belirlenen MIC değerleri Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Agar Dilüsyon Yönteminde Belirlenen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

Bakteriler	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)		
	Kimyon	Maydanoz	GSE
<i>S. enteritidis</i>	2500 ppm	>4000 ppm	18,75 ppm
<i>B. cereus</i>	1000 ppm	2000 ppm	<9,38 ppm
<i>E. coli</i> O157:H7	2500 ppm	>4000 ppm	<9,38 ppm

Kağıt disk yönteminde elde edilen inhibisyon zonlarından gözlemlendiği gibi agar dilüsyon yönteminde de *B. cereus* çalışılan antimikrobiyallere karşı en hassas mikroorganizma olmuştur. Kimyon ve maydanoz esansiyel yağı için *E. coli* ve *S. enteritidis* benzer davranış göstermiş, ancak *S. enteritidis*'i inhibe etmek için daha yüksek GSE konsantrasyonu gerekli olmuştur.

Çok sayıda baharatın etanol ekstraktlarının patojenik *E. coli* suşları üzerinde etkisinin incelendiği çalışmada, % 0,01-0,1 konsantrasyonunda kimyon inhibisyon sağlayamamıştır (Takikawa ve diğ., 2002).

De ve diğ.(1999)'nin yaptığı çalışmada maydanozun etanol ekstraktı 1, 25 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. cerevisiae* gelişimini inhibe etmemiştir. Maydanoz için MIC >100 mg/ml olarak belirlenirken, *B. subtilis* için kimyon minimum inhibisyon konsantrasyonu 25 mg/ml olarak belirlenmiştir. *E. coli* ve *S. cerevisiae* üzerinde çalışılan konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermediğinden kimyon MIC değeri >100 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Kağıt disk yönteminde kimyon en geniş inhibisyon zonlarını oluştururken, agar dilüzyon yönteminde ise kimyon için oldukça yüksek MIC değerleri saptanmıştır.

Kağıt disk yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonlarının çapları kültür ortamında elde edilen sonuçları birebir yansıtmayabilmektedir. Genellikle test edilen bir mikroorganizma için düşük bakteriyostatik aktiviteye sahip bir bileşen için minimum inhibisyon konsantrasyonun yüksek olması ve kağıt disk yönteminde çok küçük bir inhibisyon alanı oluşturması ya da zon oluşturmaması beklenmektedir. Güçlü bir antimikrobiyal için düşük MIC değeri, geniş inhibisyon zon çapları elde edilmektedir (Kim ve diğ. 2004).

Kim ve diğ. (2004) bazı esansiyel yağlardan elde edilen bileşenlerin *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 patojenleri üzerindeki etkisi inceledikleri çalışmada, küçük inhibisyon zonu oluşturan “citral” sıvı kültür ortamında *E. coli* O157:H7 üzerinde yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Diğer taraftan geniş inhibisyon zonu oluşturan “terpineol” sıvı kültür ortamında *S. typhimurium*'u inhibe edebilmek için yüksek konsantrasyonlar gerektirmiştir. Bu nedenle kağıt disk yöntemi ile sıvı kültür metotlarında elde edilen bakteriyostatik sonuçlar farklılık gösterebildiği rapor edilmektedir (Kim ve diğ. 2004).

4.3. Tween 20 Varlığında Ortamın Yağ İçeriğinin GSE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Agar dilüsyon yöntemi ile yüksek MIC değerleri saptanan maydanoz ve kimyon elenerek, yağ içeriğinin mikrobiyal gelişim üzerindeki etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmada GSE araştırılmıştır.

4.3.1. *Bacillus cereus*

Oluşturulan model sistemde elde edilen *B. cereus* sayımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yağ ve GSE konsantrasyonlarının bakteri gelişimi üzerinde etkisinin önemli düzeyde ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür.

Kontrolde (0 ppm GSE) besi ortamına eklenen %10 ve %20 yağ düzeyinin mikrobiyal gelişimi teşvik ettiği, ancak % 10 ve %20 yağ konsantrasyonları arasında %95 güven aralığında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde çalışılan (75, 150 ve 600 ppm) GSE konsantrasyonlarında yağ içeriğinin bakteriyel gelişim üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Yüksek GSE konsantrasyonlarında (150 ve 600 ppm) *B. cereus* gelişimi tamamen engellenmiştir.. Tablo 4.6'da yağ ve GSE varlığında gelişme gösteren *B. cereus* sayımları verilmektedir.

Tablo 4.6. Tween 20 Varlığında Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarında *B. cereus* Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)

Yağ	GSE konsantrasyonu			
	0 ppm	37,50 ppm	150 ppm	600 ppm
% 0 yağ	6,36 ^{ay}	6,75 ^{ax}	- (*)	- ^{bx}
% 10 yağ	7,13 ^{bxz}	7,55 ^{ax}	- ^{cx}	- ^{cx}
% 20 yağ	6,69 ^{ayz}	7,56 ^{ax}	- ^{bx}	- ^{bx}

x-y: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p < 0,05$).

a-c: Satır içerisine aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p < 0,05$).

(*) üreme gözlenmemiştir

4.3.2. *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 çalışılan GSE konsantrasyonlarında (37,5-150-600 ppm) inaktive edilememiş, 10^8 kob/ml seviyelerinde canlılığını korumuştur. İstatistiksel olarak veriler incelendiğinde mikrobiyal gelişimin yağdan etkilenmediği, GSE'nin bakteri gelişimi üzerinde etkisinin önemli düzeyde ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür.

Yağ (%10) içeren model sistemde GSE 600 ppm düzeyinde inhibitör etki göstererek, *E. coli* O157:H7 populasyonunda ~0,6 log kob/ml azalma sağlamıştır. Mikrobiyal populasyon, 37,5-150 ppm GSE konsantrasyonlarında %95 güven aralığında kontrolden farklı olmadığı belirlenmiştir.

Çalışılan %20 yağ düzeyinde 150 ppm ve 600 ppm GSE konsantrasyonlarının bakteriyel gelişim üzerindeki etkisi kontrol ve 37,5 ppm düzeyinden farklı bulunmuştur ($p<0,05$)

Tablo 4.7’de yağ ve GSE varlığında gelişme gösteren *E. coli* O157:H7 sayım sonuçları verilmektedir.

Tablo 4.7. Tween 20 Varlığında Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarında *E. coli* O157:H7 Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)

Yağ	GSE konsantrasyonu			
	0 ppm	37,50 ppm	150 ppm	600 ppm
% 0 yağ	8,73 ^{ax}	8,89 ^{ax}	8,81 ^{ax}	8,57 ^{ax}
% 10 yağ	8,83 ^{ax}	8,85 ^{ax}	8,96 ^{ax}	8,37 ^{bx}
% 20 yağ	8,78 ^{ax}	8,93 ^{ax}	8,77 ^{abx}	8,28 ^{abx}

x: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p<0,05$).

a-b: Satır içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p<0,05$).

4.3.3. *Salmonella enteritidis*

S. enteritidis çalışılan GSE konsantrasyonlarında (37,5-150-600 ppm) inaktive edilememiş, 10^8 kob/ml seviyelerinde canlılığını korumuştur. İstatistiksel olarak veriler incelendiğinde ~ % 95 güven aralığında mikrobiyal gelişimin yağ ve GSE’den etkilenmediği gözlenmiştir. Tablo 4.8’de yağ ve GSE varlığında gelişme gösteren *S. enteritidis* sayım sonuçları verilmektedir.

Tablo 4.8. Tween 20 Varlığında Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarında *S. enteritidis* Sayıları (log₁₀ kob/ml)

Yağ	GSE konsantrasyonu			
	0 ppm	37,50 ppm	150 ppm	600 ppm
% 0 yağ	8,97 ^{ax}	8,94 ^{ax}	8,91 ^{ax}	8,60 ^{ax}
% 10 yağ	9,05 ^{ax}	9,10 ^{ax}	8,92 ^{ax}	8,87 ^{ax}
% 20 yağ	8,98 ^{ax}	9,51 ^{ax}	9,27 ^{ax}	8,43 ^{ax}

x: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

a: Satır içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

4.4. Tween 20'nin Antimikrobiyal Aktivite Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

Emülsiyon oluşumu amacıyla yağ içeren sıvı kültür ortamlarına Tween 20 (polyoxiethylene (2) sorbitan monolaurate)'nin ilave edildiği koşullarda antimikrobiyal etkisinin gözlenmemesi üzerine Tween 20'nin antimikrobiyal aktivite üzerinde bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Esansiyel yağ, oleoresin ve GSE'ye en dirençli olan *S. enteritidis* seçilerek Tween 20 kullanılmadan ve %1,5 Tween 20 varlığında antimikrobiyalin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da verilmektedir.

Tablo 4.9. Emülgatör Olarak Tween 20'nin Kullanıldığı ve Kullanılmadığı Besi Ortamında *S. enteritidis* Gelişimi (kob/ml)

Tween 20 (%)	Yağ (%)	GSE	
		0 ppm	600 ppm
0	0	9,12	- (*)
0	20	8,99	-
1,5	0	8,83	8,83
1,5	20	8,76	8,98

(*) üreme gözlenmemiştir

GSE ve Tween 20 için antagonistik bir etki belirlenmiştir. Tween 20 varlığında 600 ppm GSE mikrobiyal populasyon üzerinde bakterisit etki göstermemektedir. Emülgatör olarak Tween 20 kullanılmadığında ise 600 ppm GSE mikrobiyal populasyonu tamamen yok etmektedir.

Esansiyel yağlar gibi suda çözünmeyen etken maddeler ile çalışırken hidrofobik moleküllerin çözünürlüğünü arttırmak, antimikrobiyal maddenin bakteriyel hücreye

nüfuz etmesini sağlamak üzere emülgatör özellik gösteren bileşikleri kullanılması gerekmektedir (Kim ve diğ., 1995).

Konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda Tween 20 ve Tween 80 emülsiyon oluşumu için ortama ilave edilmekte (Mann ve Markham, 1998; Mau ve diğ., 2001; Bagamboula ve diğ., 2003), bazı çalışmalarda ise kullanılmamaktadır (Smith-Palmer ve diğ., 2001; Takikawa ve diğ., 2002; Ahn ve diğ., 2004).

Tween 20, Tween 80 (polysorbate 80), etanol ve DMSO (dimethylsulfoxide) bu amaçla en çok kullanılan emülsifiye edici maddelerdir. Ancak bu maddeler test sisteminin fizikokimyasal özelliklerinde değişikliğe neden olarak antimikrobiyal etkinin artması ya da azalmasına neden olabilmektedir. Tween 20, Tween 80 gibi non-iyonik sörfektanların oluşturduğu misellerin içinde lipofilik moleküller tutulmakta, süspansiyon içerisinde kısmi olarak dağılmaktadır. Miseller içerisinde tutulan antimikrobiyal madde mikroorganizma üzerinde etki göstermemekte, inhibisyon sağlayamamaktadır. Emülsifiye edicinin konsantrasyonu arttıkça etki daha belirgin hale gelmektedir. Çay ağacı yağının (tea tree oil) antimikrobiyal etkisinin incelendiği çalışmada Tween varlığında antimikrobiyal etkide azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu dezavantajları elimine etmek, yağ-su emülsiyonlarını stabilize etmek amacı ile düşük konsantrasyonlarda bakteriyolojik agar kullanımı alternatif olarak önerilmiştir (Mann ve Markham, 1998).

Kim ve arkadaşları kağıt disk yöntemi ile *E. coli*, *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ve *Vibrio vulnificus* üzerinde 11 esansiyel yağ bileşeninin antimikrobiyal etkisini belirlemek üzere inhibisyon zonları ölçmüşlerdir. Hidrofobik bileşenlerin çözünürlüğünü arttırmak ve bakteriyel hücre zarına geçişine yardımcı olmak amacıyla % 2 Tween 20 kullanılmıştır. Tween 20'nin etkisini belirlemek üzere kontrole % 2 Tween 20 çözeltisi eklenmiş olup, *L. monocytogenes* için 0,7-0,8 cm zon oluşumu tespit edilmiştir. Diğer suşlar için ise zon gözlenmemiştir (Kim ve diğ., 2004).

Jong-Soo ve diğ. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada ise Tween 80'in kullanım konsantrasyonuna bağlı olarak *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesini arttırdığı belirtilmektedir. Tween 80 ve nisin birlikte kullanıldığı koşullarda sütte *L. monocytogenes* üzerindeki inhibitör etkinin güçlendiği saptanmıştır (Jung ve diğ., 1992). Bu çalışmalardan farklı olarak Juven

ve diğ. (1994) ise ortamda Tween 80 konsantrasyonu düştükçe timol ve kekik (“thyme”) yağının *S. typhimurium* sayısında azalmaya neden olduklarını gözlemişlerdir.

4.5. Ortamın Yağ İçeriğinin GSE’nin Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Emülsiyon oluşumu için sıvı besi ortamına katılan Tween 20’nin antagonistik etkisinin belirlenmesi üzerine, Madde 4.3’te verilen metot tekrarlanmış ancak ortama Tween 20 eklenmeden ortamın yağ içeriğinin ve GSE konsantrasyonlarının antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla GSE’ye en dirençli olan *S. enteritidis* bakterisi ile en %20 yağ içeren sıvı besi ortamında 600 ppm seviyesinde tamamiyle inhibisyon elde edilmişti. Bu nedenle Tween 20 içermeyen koşullarda daha düşük konsantrasyonlarla çalışılmıştır (18,75, 75, 300 ppm).

4.5.1. *Bacillus cereus*

Greyfurt çekirdeği ekstraktı çalışılan en düşük GSE konsantrasyonu olan 18,75 ppm seviyesinden itibaren *B. cereus* gelişimini tamamen inhibe etmiştir. GSE’nin istatistiksel olarak % 95 önem düzeyinde mikrobiyal gelişim üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu denemede yağ ve GSE varlığında gelişme gösteren *B. cereus* sayımları Tablo 4.10’da gösterilmektedir.

Tablo 4.10. Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarında *B. cereus* Sayıları (log₁₀ kob/ml)

Yağ	GSE konsantrasyonu			
	0 ppm	18,75 ppm	75 ppm	300 ppm
% 0 yağ	6,66 ^{ax}	- (*) ^{bx}	- ^{bx}	- ^{bx}
% 10 yağ	7,51 ^{ax}	- ^{bx}	- ^{bx}	- ^{bx}
% 20 yağ	7,47 ^{ax}	- ^{bx}	- ^{bx}	- ^{bx}

x: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

a-b: Satır içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

(*) üreme gözlenmemiştir

4.5.2. *Escherichia coli* O157:H7

Elde edilen sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde GSE ve yağın mikrobiyal populasyon üzerinde etkili olduğu, GSE ve yağ arasında bir interaksiyon olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.11).

Yüksek GSE konsantrasyonunda yağın olumsuz etkisi gözlenmemiş, tamamen inhibisyon sağlanmıştır. Kontrol, 18,75 ve 75 ppm GSE içeren tüplerde yağın etkisi belirgin olup, önemli düzeyde kontolden farklı ($p<0,05$) bulunmuştur. Yağ içermeyen tüpte 75 ppm'de mikrobiyal gelişim gözlenmezken, %10 ve %20 yağ içeren sıvı besi ortamında *E. coli* O157:H7 $\sim 10^5$ - 10^6 kob/ml seviyelerinde canlılığını devam ettirmiştir. Bulgular değerlendirildiğinde ortamın yağ içeriğinin inhibitör etkiyi azalttığı, kontrol, 18,75 ve 75 ppm GSE konsantrasyonuna sahip TSB ortamında belirgin ($p<0,05$) bir şekilde görülmektedir. Elde edilen bakteri sayıları incelendiğinde 18,75 ppm GSE konsantrasyonunda %10 ve %20 yağ düzeyleri arasında fark tespit edilmemiştir. İstatistiksel olarak 75 ppm GSE seviyesinde yağ düzeyleri arasında (%10 ve %20) farkın önemli olduğu, % 20 yağ içeren model sistemde GSE'nin inhibitör etkisinin %10 yağ içeren model sisteme göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir. En yüksek GSE (300 ppm) konsantrasyonunda ise yağ düzeyleri etkili olmayıp tamamen inhibisyon sağlanmıştır.

Tablo 4.11. Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarında *E. coli* O157:H7 Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)

Yağ	GSE konsantrasyonu			
	0 ppm	18,75 ppm	75 ppm	300 ppm
% 0 yağ	8,74 ^{ax}	1,07 ^{by}	- (*) ^{cz}	- ^{cx}
% 10 yağ	8,89 ^{ax}	8,94 ^{ax}	6,74 ^{bx}	- ^{cx}
% 20 yağ	8,87 ^{ax}	7,73 ^{ax}	5,66 ^{by}	- ^{cx}

x-y: Sütun içerisine aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p<0,05$).

a-c: Sütun içerisine aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p<0,05$).

(*) üreme gözlenmemiştir

4.5.3. *Salmonella enteritidis*

E. coli O157:H7'de olduğu gibi elde edilen sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hem GSE hem de yağın mikrobiyal populasyon üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Yağ GSE'nin etkisini azaltarak mikrobiyal gelişimi teşvik

etmiştir. Yüksek GSE konsantrasyonunda (300 ppm) yağın olumsuz etkisi belirgin olmayıp, tamamen inhibisyon sağlanmıştır. Yağ içeriği 18,75 ve 75 ppm’de önemli düzeyde farklı ($p<0,05$) bulunmuştur. Yağ içermeyen tüpte 75 ppm’de mikrobiyal gelişim gözlenmezken, %10 ve %20 yağ içeren sıvı besi ortamında $\sim 10^5$ - 10^6 kob/ml seviyelerinde canlılıklarını devam ettirmişlerdir. İstatistiksel olarak yağ düzeyleri arasında (%10 ve %20) 18,75 ppm GSE içeren model sistemde fark görülmezken, 75 ppm GSE konsantrasyonunda %20 yağ varlığında elde edilen bakteri sayımlarının %10’ a göre daha az olduğu belirlenmiştir. Ortamın yağ içeriği inhibitör etkiyi azaltarak, mikrobiyal gelişimi teşvik etmiş olup, kontrol, 18,75 ve 75 ppm GSE konsantrasyonuna sahip tüplerde elde edilen sonuçlarda etkisi belirgin ($p<0,05$) bir şekilde görülmektedir. GSE varlığında gelişme gösteren *S. enteritidis* sayım sonuçları Tablo 4.12’de gösterilmektedir.

Tablo 4.12. Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarında *S. enteritidis* Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)

Yağ	GSE konsantrasyonu			
	0 ppm	18,75 ppm	75 ppm	300 ppm
% 0 yağ	9,47 ^{ax}	7,19 ^{by}	- (*) ^{cz}	- ^{cx}
% 10 yağ	9,21 ^{ax}	8,86 ^{ax}	6,59 ^{bx}	- ^{cx}
% 20 yağ	8,97 ^{ax}	9,51 ^{ax}	5,45 ^{by}	- ^{bx}

x-y: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p<0,05$).

a-c: Satır içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir ($p<0,05$).

(*) üreme gözlenmemiştir

4.6. Gıda Matriksinde GSE ve Potasyum Sorbatın İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması

Deneyde 2 tip antimikrobiyal (1800 ppm GSE, 1800 ppm Potasyum Sorbat) ve kontrol olmak üzere 3 farklı işlem, 1 sıcaklık (10°C) ve 4 farklı süre (0, 1, 3, 5 gün) uygulanmıştır.

Mikrobiyal faaliyetin en aza indirilmesini sağlamak, raf ömrü boyunca ürünün duyuşal özelliklerini korumak için gıdaların önerilen düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi önemli olup, tüketime hazır gıdalar için -1 ve +7 °C arasındaki sıcaklıklar önerilmektedir (FDA, 2001b; Aran, 1991). Ancak yapılan çalışmalar ev tipi ve ticari tip soğutucularda istenen sıcaklıkların sağlanamadığını, üretim, sevkiyat ve satış

koşullarında ürünlerin sıcaklık dalgalanmalarına maruz kaldığını göstermektedir (Rose, 1986). Uygun olmayan muhafaza koşulları dikkate alınarak GSE ve potasyum sorbatın inhibisyon etkisini gözlemleyebilmek amacıyla yapılan çalışmada kıymalı sos örnekleri 10°C’de muhafaza edilmiştir.

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan potasyum sorbat GSE’nin antimikrobiyal etkisini karşılaştırabilmek amacıyla seçilmiş olup GSE ile aynı konsantrasyonda Türk Gıda Kodeksi’nde izin verilen limitler dahilinde kullanılmıştır.

Kıymalı sos örneğinin pH ölçüm değerleri Tablo 4.13’ te verilmektedir. Potasyum sorbat ilavesinin ortam pH’sını ortalama 0,18 birim, GSE’nin ise 0,03 birim düşürdüğü gözlenmektedir.

Tablo 4.13. Örneklerin pH değerleri

Örnek	pH
Kontrol	5,80
Potasyum sorbat	5,62
GSE	5,77

4.6.1. *Bacillus cereus*

Başlangıç *B. cereus* inokulum düzeyi 4,03 log kob/g olan kıymalı sos örnekleri 10 °C’de 5 gün boyunca muhafaza edilmiştir. Tablo 4.14’te 1, 3 ve 5. gün sonunda elde edilen bakteri sayıları verilmektedir.

Tablo 4.14. GSE ve potasyum sorbatın 10 °C’de muhafaza edilen kıymalı sos örneğinde *B. cereus* gelişimi üzerinde etkileri

Antimikrobiyal	Gün		
	1	3	5
Kontrol	4,02 ^x	4,99 ^x	6,55 ^x
1800 ppm Potasyum sorbat	3,91 ^x	3,63 ^y	3,74 ^y
1800 ppm GSE	3,51 ^y	3,40 ^y	5,65 ^x

x-y: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

Bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde antimikrobiyal uygulamalarının *B.cereus* sayısı üzerinde etkili olduğu görülmüştür (p< 0,05). Belirlenen ortalama değerler karşılaştırıldığında her bir antimikrobiyal uygulama diğerinden farklı bulunurken, potasyum sorbat uygulamasının inhibitör etkisinin GSE ve kontrolden önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir. Başlangıç inokulum düzeyi 4,03 log kob/g olan 1800 ppm potasyum sorbat içeren gıda örneğinde 5. gün sonunda *B.*

cereus 3,74 log kob/g seviyelerinde tespit edilmiştir. Ancak bakteri sayıları dikkate alındığında 1800 ppm düzeyinde potasyum sorbat ve GSE uygulamalarının *B. cereus* gelişiminin kontrol altına alınması açısından yeterli olmadığı görülmektedir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde tüketime hazır gıdalarda *B. cereus* için yasal limit 2 log kob/g (m)- 3 log kob/g (M) olarak tanımlanmış olup, 10 °C’de 5 gün boyunca muhafaza edilen kıymalı sos örneklerinde araştırılan antimikrobiyallerin yeterli olmadığı kanısına varılmıştır.

4.6.2. *Escherichia coli* O157:H7

Başlangıç *E. coli* O157:H7 inokulum düzeyi 4,73 log kob/g olan 10 °C’de muhafaza edilen kıymalı sos örneklerinin, 1, 3 ve 5. gün sonunda elde edilen bakteri sayıları Tablo 4.15’te verilmektedir.

Tablo 4.15. GSE ve potasyum sorbatın 10 °C’de muhafaza edilen kıymalı sos örneğinde *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerinde etkileri

Antimikrobiyal	Gün		
	1	3	5
Kontrol	4,69 ^x	5,50 ^x	6,50 ^x
1800 ppm Potasyum sorbat	4,15 ^y	4,18 ^y	4,21 ^y
1800 ppm GSE	4,79 ^x	5,63 ^x	6,82 ^x

x-y: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

Antimikrobiyal uygulamaları sonucunda elde edilen *E. coli* O157:H7 seviyeleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 1800 ppm düzeyinde potasyum sorbat ve GSE uygulamalarının kontrolden önemli düzeyde farklı olduğu görülmüştür (p< 0,05). Belirlenen ortalama değerler karşılaştırıldığında her bir antimikrobiyal uygulama diğerinden farklı bulunurken, potasyum sorbat uygulamasının inhibitör etkisinin GSE ve kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir. Başlangıç inokulum düzeyi 4,73 log kob/g olan 1800 ppm potasyum sorbat içeren gıda örneğinde 5. gün sonunda 0,52 log kob/g azalma tespit edilmiştir. Bakteri sayıları dikkate alındığında potasyum sorbat uygulamalarının *E. coli* O157:H7 gelişiminin kontrol altına alınması açısından yeterli olmadığı görülmektedir.

GSE uygulaması *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerinde inhibitör etki göstermediği belirlenmiştir. İstatistiksel olarak 1800 ppm GSE, kontrolden farklı olup, sayımlar sonucunda bakteri sayıları kontrolden daha yüksek bulunmuştur.

4.6.3. *Salmonella enteritidis*

Tablo 4.16’da başlangıç *S. enteritidis* inokulum seviyesi 5,47 log kob/g olan 10 °C’de muhafaza edilen kıymalı sos örneklerinin, 1, 3 ve 5. gün sonunda bakteri sayılarındaki değişimler verilmektedir.

Tablo 4.16. GSE ve potasyum sorbatın 10 °C’de muhafaza edilen kıymalı sos örneğinde *S. enteritidis* gelişimi üzerinde etkileri

Antimikrobiyal	Gün		
	1	3	5
Kontrol	6,29 ^y	8,26 ^x	8,90 ^x
1800 ppm Potasyum sorbat	5,52 ^y	5,76 ^y	5,89 ^y
1800 ppm GSE	7,58 ^x	8,93 ^x	9,13 ^x

x-y: Sütun içerisinde aynı harfi taşıyan ortalamalar birbirinden istatistiksel olarak farklı değildir (p< 0,05).

İstatistiksel olarak değerlendirilen veriler sonucunda antimikrobiyal uygulamalar arasında farklılık önemli bulunmuştur (p< 0,05). Tablo 4.16 incelendiğinde her bir antimikrobiyal uygulama diğerinden farklı bulunurken, potasyum sorbat uygulamasının inhibitör etkisinin GSE ve kontrolden farklı olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve 1800 ppm GSE içeren örneklerle göre *S. enteritidis* gelişimi üzerinde 1800 potasyum sorbat ilavesinin inhibisyon etkisinin önemli olduğu gözlenmektedir.

Başlangıç inokulum seviyesi 5,47 log kob/g olup kontrol ve GSE içeren örneklerde 5 günün sonunda bakteri sayısı ~9 log kob/g düzeyine yükselirken potasyum sorbat uygulamasında 0,42 log kob/g artış görülmüş, ancak ~5 log kob/g seviyesi korunmuştur.

In vitro çalışmalarda etki gösteren konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonda kullanılmasına rağmen GSE bakteri gelişimi üzerinde etki gösterememiştir. Yapılan araştırmalarda yağ, protein, tuz ve su içeriği, pH gibi gıdanın bileşimi ile ilgili faktörler, gıdanın katı ya da sıvı yapıda olması antimikrobiyal aktivite üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle gıda maddesinin besiyeri ortamından daha karmaşık bir gelişme ortamı sunduğu, antimikrobiyal bileşiklere karşı mikroorganizmalara daha iyi bir koruma sağladığı ifade edilmektedir (Smith-Palmer ve diğ., 2001; Gould, 1996; Meyer ve diğ., 2002).

Gıdanın yağ içeriği ile ilgili olarak ileri sürülen yaklaşımlardan biri bakteri hücresi üzerinde oluşan yağ ceketinin antimikrobiyal bileşenin hücre içine nüfuz etmesine

engel olduğudur. İleri sürülen bir değer yaklaşım yağ/lipit ve sulu faz içerisinde aktif bileşenlerin dağılması, gıdanın yağ fraksiyonunun antimikrobiyal bileşeni absorplaması ve su fazında antimikrobiyal konsantrasyonunun azalması ile inhibitör etkinin de azalmasıdır (Mann ve Markham, 1998; Smith-Palmer ve diğ., 2001; Cutter, 2000).

Bhatti ve diğ.(2004) yağsız (%0,1 yağ), yarım yağlı (%2,0 yağ), and tam yağlı (%3,5 yağ) olmak üzere farklı yağ içeriğine sahip süt örnekleri üzerinde nisin antilisterial etkisini inceledikleri araştırmada en yüksek inhibitör etkiyi yağsız sütte elde etmişlerdir. Yağsız sütte 5°C sıcaklıkta 12 gün sonunda 10^4 kob/ml seviyesindeki mikrobiyal yük <10 kob/ml seviyelerine düşmüştür. Tam yağlı süt örneğinde ise mikrobiyal yükün başlangıçta % 2’lik bir azalma gösterdiği belirlenmiş, ancak daha sonra mikrobiyal yükte artış olduğu saptanmıştır.

Defne, karanfil, tarçın ve kekik esansiyel yağlarının *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis* ile inokule edilen tam yağlı ve yarım yağlı beyaz peynir üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Yarım yağlı beyaz peynir için her 4 esansiyel yağ %1 konsantrasyonda *L. monocytogenes*’i inhibe ederken, sadece karanfil esansiyel yağı tam yağlı peynirde aynı etkiyi gösterebilmiştir. Besi ortamında kekik esansiyel yağı *S. enteritidis* tamamen inhibisyon sağlarken, tam yağlı beyaz peynirde bu etki gözlenememiştir. (Nychas ve Skandamis, 2003; Smith-Palmer ve diğ., 2001).

Bir diğer çalışmada besi ortamına eklenen %20 mısır yağının %0,1 konsantrasyonundaki biberiye ekstraktının *S. aureus* üzerinde inhibisyon etkisinde azalmaya neden olmuştur (Farbood ve diğ.,1976).

Antimikrobiyal etki gösteren bileşenlerin bakterinin hücre zarındaki proteinlerle kompleks oluşturarak hücre zarının işlevini olumsuz etkilediği, ancak gıdanın bileşiminde bulunan proteinler ile antimikrobiyal bileşenin kompleks oluşturması durumunda antimikrobiyal etkinin azalmasına neden olabileceği ileri sürülmektedir (Smith-Palmer ve diğ., 2001).

Kullanılan model gıda örneğinin protein, yağ ve su içeriği yüksek bir et ürünü olması nedeniyle in vitro çalışmada yüksek antimikrobiyal etki gösteren GSE’nin etkin olmadığı düşünülmektedir. In vitro yapılan çalışmalarda GSE *B. cereus*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis* üzerinde inhibisyon sağlamasına rağmen, kıymalı sos örneğinde etkin olamamıştır.

Patojen mikroorganizmalar içerisinde *B. cereus* için 1800 ppm GSE uygulamasında 1 ve 3. gün elde edilen bakteri sayısı %95 önem düzeyinde kontrolden farklı olup, daha düşük sayıdadır. Ancak 5. günün sonunda bakteri gelişimi hızlanarak kontrolden istatistiksel olarak farklılık gösterememiştir. *E. coli* O157:H7 belirlenen sürelerde kontrolden farklılık göstermezken, *S. enteritidis* 1. gün artış göstererek kontrolden farklı bulunmuş, 3. ve 5. günlerde kontrolden ile istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.

Piliç eti yüzeyine seçilen kimyasalların (“Trisodium phosphate”(TSP), “cetylpyrinidium chloride”(CPC), laktik asit ve GSE) sprey ile uygulanması ile *S. typhimurium* gelişiminin kontrol altına alınmasını amaçlandığı çalışmada uygulamaların her biri istatistiksel olaraktan kontrolden farklı bulunmuştur. GSE %0,1 ve % 0,5 düzeyinde *S. typhimurium* popülasyonunda 1,6-1,8 log azalma sağladığı saptanmıştır (Xiong, H. ve diğ., 1998)

Çalışılan her üç patojen mikroorganizma için potasyum sorbat kontrolden ve 1800 ppm GSE uygulamasından istatistiksel olarak farklı bulunmuş, bakteri sayılarında azalma sağlanmıştır.

5. SONUÇ

Bu çalışmada bitkisel kaynaklı ekstrakt, esansiyel yağ ve oleoresinin *B. cereus*, *S. enteritidis* ve *E. coli* O157:H7 suşları üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Kağıt disk metodu ile maydanoz, kimyon esansiyel yağları ve zencefil, paprika, kimyon, maydanoz oleoresinleri ve greyfurt çekirdeği ekstraktının oluşturdukları inhibisyon zonları değerlendirildiğinde oleoresinlerin çalışılan mikroorganizmalar için etkili olmadığı belirlenmiştir. *S. enteritidis* ve *B. cereus* için oluşan zon büyüklükleri kimyon esansiyel yağı > GSE > maydanoz esansiyel yağı olarak belirlenirken, *E. coli* O157:H7 için ise sıralama kimyon esansiyel yağı > maydanoz esansiyel yağı > GSE olarak gerçekleşmiştir.

Agar dilüsyon yönteminde en düşük MIC değerleri GSE için saptanmış, bunu kimyon ve maydanoz esansiyel yağı izlemiştir. Yüksek MIC değerleri saptanan maydanoz ve kimyon elenerek, yağ içeriğinin mikrobiyal gelişim üzerindeki etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmada GSE araştırılmıştır.

Kağıt disk ve agar dilüsyon yöntemleri ile en güçlü mikrobiyal inhibisyonu sağlayan GSE'nin Tween 20 varlığında antimikrobiyal özellik gösteremediği saptanmıştır. Tween 20 ve GSE için antagonistik bir etki söz konusu olduğu belirlenmiştir.

Farklı yağ düzeylerine sahip oluşturulan model sistemde düşük GSE konsantrasyonlarında yağ içeriğinin antimikrobiyalin etkinliğini azalttığı belirlenmiştir. Ancak yüksek GSE konsantrasyonlarında tamamen inhibisyon sağlandığından yağın olumsuz etkisi tespit edilmemiştir.

Bakterilerin antimikrobiyallere gösterdiği hassasiyet *B. cereus* > *E. coli* O157:H7 $\geq$ *S. enteritidis* şeklinde gerçekleşmiştir. Gr (+) bir bakteri olan *B. cereus* kullanılan antimikrobiyallerden en fazla etkilenen mikroorganizma iken, Gr (-) olan *E. coli* O157:H7 ve *S. enteritidis*'in inhibisyonu için daha yüksek GSE konsantrasyonları gerekli olmuştur.

Bakteri sayıları dikkate alındığında 1800 ppm düzeyinde potasyum sorbat ve GSE uygulamalarının *B. cereus* gelişiminin kontrol altına alınması açısından yeterli olmadığı görülmektedir.

Kıyma sosuna ilave edilen 1800 ppm potasyum sorbat 10°C'de 5 gün boyunca inkübe edilerek 1, 3 ve 5. günlerde her üç patojen mikroorganizma için belirlenen sayım sonuçları istatistiksel olarak kontrolden farklı bulunmuştur. Çalışılan potasyum sorbat kontrolden ve 1800 ppm GSE uygulamasından istatistiksel olarak farklı bulunmuş, bakteri sayılarında kontrol ve GSE'ye göre azalma sağlanmıştır. GSE ise in vitro çalışmalarda yüksek antimikrobiyal etki göstermesine rağmen gıda matriksinde 1800 ppm inhibitör etki gösterememiştir.

İstatistiksel olarak 1800 ppm potasyum sorbat uygulaması kontrol ve GSE'den farklı bulunmuş olsa da bakteri sayıları dikkate alındığında çalışmada kullanılan patojenlerin gelişiminin kontrol altına alınması için yeterli olmadığı görülmektedir.

KAYNAKLAR

- 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** (1), 148–155.
- Ahn, J., Grün, I.U., and Fernando, L.N.,** 2002. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, **67** (4), 1364–1369.
- Aksu, H. ve Ergün, Ö.,** 1996a. Gıda maddelerinde *Bacillus cereus*'un varlığı. *Kökem Dergisi*, **19** (2), 41–47.
- Aksu, H. ve Ergün, Ö.,** 1996b. *Bacillus cereus* ve gıda zehirlenmeleri. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*, 47–49.
- Aran, N.,** 1988. Baharatın antimikrobiyal etkileri, 20. *Diyabet ve Beslenme Günleri*, İstanbul, 16-18 Haziran, 5. *Diyabet Yıllığı*, 383-387.
- Aran, N.** 1991. Soğutulmuş ve dondurulmuş gıdaların mikrobiyolojik değerlendirilmeleri. *Gıda Sanayii*, **23**, 38-46.
- Armando, C., Maythe, S. and Beatriz, N.P.,** 1998. Antioxidant activity of grapefruit extract on vegetable oils. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **77**, 463–467.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J.,** 2003. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection*, **66** (4), 668-673.
- Bell, C. and Kyriakides, A.,** 2002a. Pathogenic *Escherichia coli* in *Foodborne pathogens, Hazards, Risk Analysis and Control*, Ch 10, Eds. Blackburn, C. W. & McClure, P. J. CRC Press LLC and Woodhead Publishing Ltd, Cambridge England.
- Bell, C. and Kyriakides, A.,** 2002b. *Salmonella* in *Foodborne pathogens, Hazards, Risk Analysis and Control*, Ch 11, Eds. Blackburn, C. W. & McClure, P. J. CRC Press LLC and Woodhead Publishing Ltd, Cambridge England.
- Beuchat, L.R. and Golden, D. A.,** 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 134-142.

- Bhatti, M., Veeramachaneni, A. and Shelef, L.A.**, 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk, *International Journal of Food Microbiology*, **97** (2), 215-219.
- Cavanagh, H.M.A. and Wilkinson, J.M.**, 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, **16**, 301-308.
- Cho, S.H., Chung, J.H., Ryu, H.C.**, 1994. Effects of natural antimicrobial agent on postharvest decay in fruits and vegetables under natural low temperatures. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition*, **23** (2), 315-321.
- Cutter, C.N.**, 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, **63** (5), 601-607.
- Davidson, P.M. and Harrison, M.A.**, 2003. Microbial Adaptation to Stresses by Food Preservatives in *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, Ch 3, Eds. P. Davidson, M. and Harrison, M.A., CRC Press, (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)
- Davidson, P.M. and Naidu, E.S.**, 2000. Phyto-Antimicrobials in *Natural Food Antimicrobial Systems*, Eds. Naidu A.S., CRC Press, (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)
- Davidson, P.M. and Parish, M.E.**, 1989. Methods of testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 148-155.
- De, M., De, A.K. and Banerjee, A.B.**, 1999. Antimicrobial screening of some Indian Spices. *Phytotherapy Research*, **13**, 616-618.
- Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T. and Notermans, S.**, 1994. Characteristics of *B. cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, **23**, 99-109.
- Eilers, J.R.**, 1990. New foods provide new food safety challenges. *Food Processing*, **6**, 104-108.
- Enikova, R., Radoilska, E., Petkov, N. And Simevo, B.**, 2004. Microflora and measuring of vegetal spices. *Khranitelno vkusova Promishlenost*, **6**, p 11-16.
- FDA**, 2001. Aerobic Plate Count: Bacteriological Analytical Manual, <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.
- FDA**, 2001b. Food Code. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fc01-toc.html>, 13 Nisan 2005.

- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E. and Mandrell, R.E.,** 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6042-6048.
- Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M., and Fukuyama, M.,** 2003. Inactivation of *Legionella pneumophila* from whirlpool bath waters by grapefruit seed extract. *Biocontrol Science*, 8 (3), p.129-132.
- Gould, G.W.,** 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 82-86.
- Gould, G.W.,** 1999. New Methods of Food Preservation. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Granum, P.E.,** 1997. *Bacillus cereus*, in *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, pp. 327-336, Eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J., ASM Press, Washington DC.
- Gurdip, S., Sumitra, M., Catalan, C.; Lampasona, M.P.,** 2005. Chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal*, 20 (1), 1-6.
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M.P.,** 1998. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology*, 15, 367-378.
- Harmon, S.M., Kautter, D.A.,** 1991. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *Journal of Food Protection*, 54 (5), 372-374.
- 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 (3), 333-340.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A. S., Georgiev, E. V. and Damionova, S.T.,** 2005. Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds from Bulgaria that had been stored for up to 36 years. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 305-310.
- Jong-Soo, M., Miyamoto, T., Kataoka, K., Araki, M., Yoneya, T. and Sewaki, T.,** 1999. Antibacterial action of an antimicrobial substance from *Lactobacillus amylovorus* IMC-1 against foodborne spoilage and pathogenic organisms (Alınmıştır: FSTA, Current 1990-2000/05, Accession number 2000-05-A0744).

- Jung, D.S., Bodyfelt, F.W. and Daeschel, M.A., 1992.** Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk, *Journal of Dairy Science*, **75** (2), 387-393.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H., 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents, *Journal of Applied Bacteriology*, **76** (6), 626-631.
- Karapınar, M. ve Aktuğ, Ş.E., 1986a.** Baharatların antimikrobiyal etkileri I. Bitkinin yaprak veya çiçek kısmından köken alan baharatlar, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, **B4**(2), 115-126.
- Karapınar, M. ve Aktuğ, Ş.E., 1986b.** Baharatların laktik asit bakterilerinin üremesi ve laktik asit oluşturmaları üzerine inhibitif ve stimülatif etkileri. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, **B4** (1), 79-85.
- Kim, H.O., Park, S.W., Park, H.D., 2004.** Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology*, **21**, 105-110.
- Kim, J., Marshall, M.R. and Wei, C., 1995.** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **43**, 2839-2845.
- Korukluoğlu, M., Sertel, S., Karakaş, R., 2005.** *Salmonella* ve *Shigella*'nın gelişmesini engelleyen tıbbi bitkiler ve esansiyel yağlar, *Gıda Kongresi 2005*. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir, 19-21 Nisan, s. 334-337.
- Lahlaou, M., 2004.** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, **18**, 435-448.
- Lambert, R.J.W. and Pearson, J., 2000.** Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 784-790.
- Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Gariepy, 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.
- Lewis, L. S., 1984.** Spices and Herbs for the Food Industry, Food trade Press, Oprington, England.

- Lis-Balchin, M. and Deans, S.G.**, 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, **82**, 759-762.
- Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M. and Guerrero, S.**, 2000. Natural Antimicrobials from Plants, *In Minimally Processed Fruits and Vegetables : fundamental aspects and applications*, pp. 237-263, Eds. Alzamora, S.M., Tapia, M.S. and López-Malo, A., Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland.
- Mandal, S.C., Nandy, A., Pal, M. and Saha, B.P.**, 2000. Evaluation of antibacterial activity *Asparagus racemosus* willd. root. *Phytotherapy Research*, **14**, 118-119.
- Mann, C.M. and Markham, J.L.**, 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 538-544.
- Mau, J., Chen, C. and Hsieh, P.**, 2001. Antimicrobial effect of extracts from chinese chieve, cinnamon, and corni fructus. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 183-188.
- Marwan, A. G. and Nagel, C.W.**, 1986. Quantitative determination of infinite inhibition concentration of antimicrobial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, **51** (3), p. 559-561.
- Meyer, A.S., Nielsen, S.P., Lyngby and Holm, F.**, 2002. Natural food preservatives in *Minimal Processing Technologies in the Food Industry*, Ch 6, Eds. Ohlsson, I. & Bengtsson N., CRC Press.
- De, M., De, A.K. ve Banerjee, A.B.**, 1999. Antimicrobial screening of some Indian Spices. *Phytotherapy Research*, **13**, 66-618.
- Nasar-Abbas, S.M. and Halkman, K.**, 2004. Antimicrobial effect of water extract of sumac on the growth of some food borne bacteris including pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 63-69.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, L., Jagan Mohan Rao, L. and Sakariah, K.K.**, 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: A byproduct from curcumin manufacture, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 4297-4300.
- Nychas, G.J.E. and Skandamis, P.N.**, 2003. Antimicrobials from herbs and spices in *Natural Antimicrobials for Minimal Processing of Foods*, Ch 9, Eds. Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N & Tassou, C.C., CRC Press (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)

- Park, W.p., Jung, J.H., Cho, S.H. and Kim, C.H.**, 2004. Quality characteristics of unshiu orange and pear packaged with paper incorporated with antimicrobial agents. *Journal of the Korean Society of Food science and Nutrition*, **33**(10), p. 1715-1719.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Courtens, T. and Debevere, J.**, 2005. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiology*, **22**, 189-197.
- Reagor, L., Gusman, J., McCoy, L., Carino, E. and Heggers, J.P.**, 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An in vitro agar assay. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **8** (3), 325-332.
- Reyes, J.E., Aquirre, C., Vargas, C., Petzold, G., Valencia, C. and Luarte, F.**, 2003. Efficacy of washing by spraying with chlorine dioxide, ozone or Kilol(R) for reduction of bacterial contamination of pieces of beef. *Alimentaria*, **344**, 17-21.
- Rose, S. A.** 1986. Microbiological studies on delicatessen salads, Campden Food Preservation Research Association, England.
- Sağdıç, O. and Özcan, M.**, 2003. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, **14**, 141-143.
- Shelef, L.A.**, 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, **6**, 29-44.
- Singh, G., Marimuthu, P., Murali, H.S. and Bawa, A.S.**, 2005. Antioxidative and antibacterial potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. *Journal of Food Safety*, **25**, 130-145.
- Skandamis, P.N., Davies, K. W., McClure, P.J., Koutsoumanis, K. and Tassou, C.**, 2002. A vitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. *Food Microbiology*, **19**, 405-421.
- Skocibusic, M. and Bezic, N.** 2004. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, **18**, 967-970.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L.**, 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, **18**, 463-470.
- Şahin, A.**, 2000. Bazı baharat esans yağları, sodium asetat ve sodium laktatın *Bacillus cereus* gelişimi üzerine etkisi, *Yüksek Lisans Tezi* , İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Takikawa, A., Keiko, A., Yamamoto, M., Ishimaru, S., Yasui, M, Okubo, Y. and Yokoigawa, K.,** 2002. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* 0157. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94** (4), 315-320.
- Tassaou, C.C., Nychas, J.E. and Scandamis P.N.,** 2004. Herbs and spices, in Handbook of Herbs and Spices, ch 3, Eds. Peter, K. V., Woodhead Publishing Ltd., England.
- Tassou, C.C., Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N.,** 2004. Herbs and spices and antimicrobials in *Handbook of Herbs and Spices*, vol 2, Ch. 9, Woodhead Publishing Ltd. (<http://www.foodnetbase.com/ejournals/books>)
- Temelli, S.,** 2002. Gıda zehirlenmesine neden olan *E. coli* O157:H7 ve önemi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Hekimliği Dergisi*, **21**, p. 133-138.
- Turner, B.E., Foegeding, P.M., Larick, D.K. and Murphy, A.H.,** 1996. Control of *Bacillus cereus* spores and spoilage microflora in sous vide chicken breast. *Journal of Food Science*, **61** (1), 217-224.
- Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G. and Smid, E.J.,** 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, **63** (5), 620-624.
- Üner, Y., Aksu, H.ve Ergün, Ö.,** 2000. Baharatın çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkileri, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **26** (1), 1-10.
- Valero, M. and Salmeron, M.C.,** 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, **85**, 73-81.
- Xiong, H., Li, Y., Slavik, M.F. and Walker, J.T.,** 1998. Spraying chicken skin with selected chemicals to reduced attached *S. typhimurium*. *Journal of Food Protection*, **61** (3), 272-275.
- Yuste, J. and Fung, D.Y.C.,** 2003. Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* ve *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinamon, by conventional media and thin agar layer method. *Food Microbiology*, **20**, 365-370.
- Yuste, J. and Fung, D.Y.C.,** 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. *Journal of Food Protection*, **65** (10), 1663-1666.

Ek A. Varyans Analizi Sonuçları

Tablo A.1. Tween 20 varlığında *B. cereus* gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-37,5-150-600 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
GSE	3	215,049	71,683	2366,10	0,000
Yağ	2	0,663	0,332	10,95	0,002
GSE*Yağ	6	0,747	0,124	4,11	0,018
Hata	12	0,364	0,030		
Genel Toplam	23	216,823			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.2. Tween 20 varlığında *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-37,5-150-600 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
Yağ	2	0,0211	0,0105	0,49	0,624
GSE	3	0,9056	0,3019	14,07	0,000
GSE*Yağ	6	0,0951	0,0158	0,74	0,629
Hata	12	0,2574	0,0215		
Genel Toplam	23	1,2792			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.3. Tween 20 varlığında *S. enteritidis* gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-37,5-150-600 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
Yağ	2	0,0211	0,0105	0,49	0,624
GSE	3	0,9056	0,3019	14,07	0,000
GSE*Yağ	6	0,0951	0,0158	0,74	0,629
Hata	12	0,2574	0,0215		
Genel Toplam	23	1,2792			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.4. *B. cereus* gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-18,75-75-300 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
GSE	3	3,28961	1,09654	1,5E+04	0,000
Yağ	2	0,00067	0,00034	4,76	0,030
GSE*Yağ	6	0,00203	0,00034	4,76	0,010
Hata	12	0,00085	0,00007		
Genel Toplam	23	3,29316			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.5. *E. coli* O157:H7 gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-18,75-75-300 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
GSE	3	250,639	83,546	1246,57	0,000
Yağ	2	58,194	29,097	434,15	0,000
GSE*Yağ	6	63,483	10,581	157,87	0,000
Hata	12	0,804	0,067		
Genel Toplam	23	373,121			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.6. *S. enteritidis* gelişimi üzerinde farklı yağ (%0-10-20) ve GSE (0-18,75-75-300 ppm) konsantrasyonlarının etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
GSE	3	329,804	109,935	3444,43	0,000
Yağ	2	19,813	9,906	310,38	0,000
GSE*Yağ	6	35,271	5,879	184,18	0,000
Hata	12	0,383	0,032		
Genel Toplam	23	385,271			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.7. Kıymalı sos örneğinde GSE ve potasyum sorbatın *B. cereus* üzerinde inhibisyon etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
Antimikrobiyal	2	4,5098	2,2549	55,37	0,000
Gün	3	7,9551	2,6517	65,12	0,000
Antimikrobiyal*Gün	6	6,2950	1,0492	25,76	0,000
Hata	12	0,4887	0,0407		
Genel Toplam	23	19,2485			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.8. Kıymalı sos örneğinde GSE ve potasyum sorbatın *E. coli* O157:H7 üzerinde inhibisyon etkilerinin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
Antimikrobiyal	2	18,3325	9,1663	103,91	0,000
Gün	3	26,6788	8,8929	100,81	0,000
Antimikrobiyal*Gün	6	15,5474	2,5912	29,37	0,000
Hata	12	1,0586	0,0882		
Genel Toplam	23	61,6173			

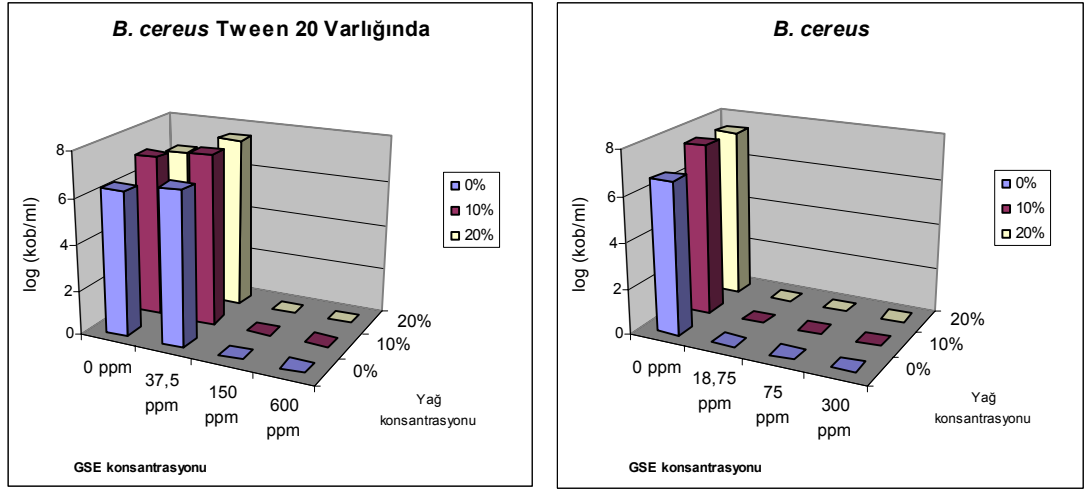
*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

Tablo A.9. Kıymalı sos örneğinde GSE ve potasyum sorbatın *S. enteritidis* üzerinde inhibisyon etkilerinin varyans analizi sonuçları

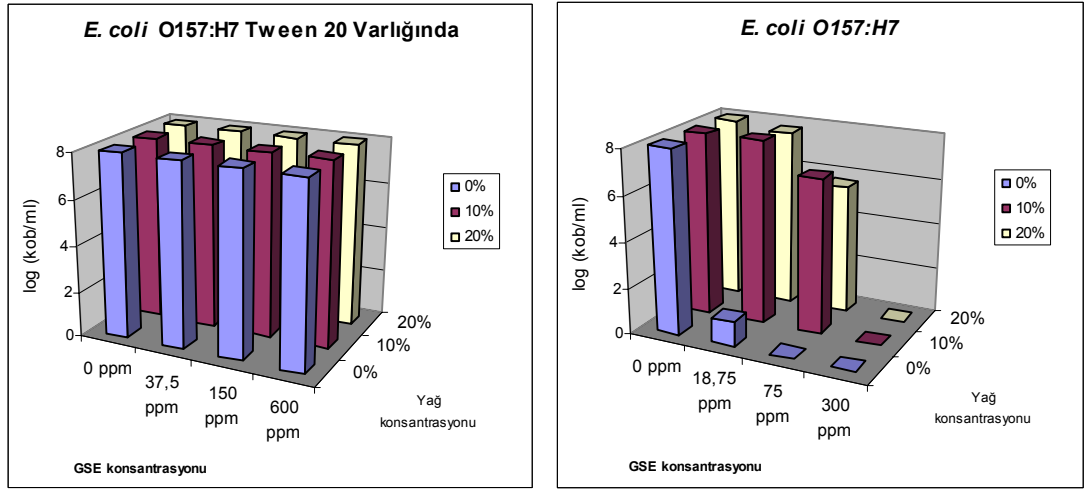
Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P*
Antimikrobiyal	2	20,2840	10,1420	310,03	0,000
Gün	3	27,3177	9,1059	278,36	0,000
Antimikrobiyal*Gün	6	10,8315	1,8052	55,19	0,000
Hata	12	0,3925	0,0327		
Genel Toplam	23	58,8258			

*p<0.05 olasılık düzeyinde önemlidir.

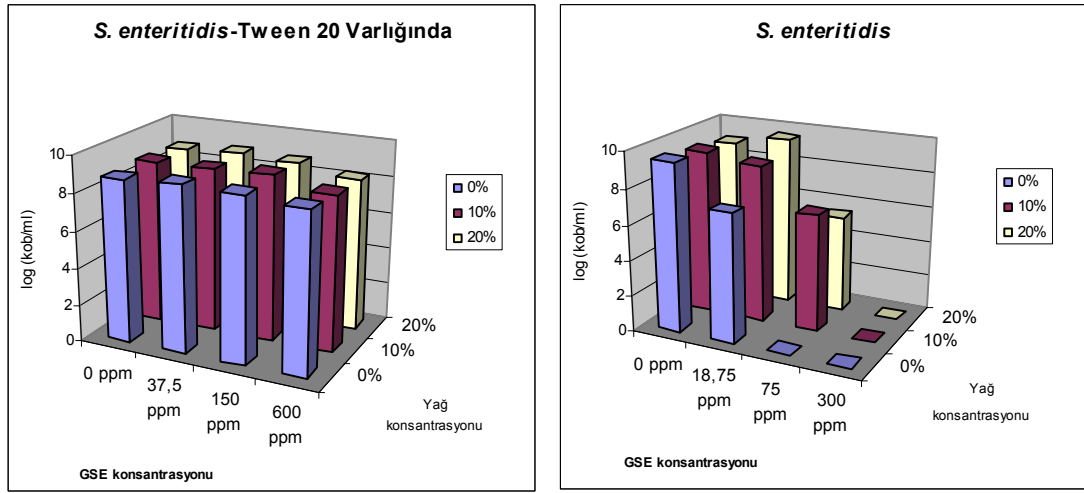
Ek B. Bakteri Gelişimi Üzerinde Tween 20'nin Etkisi



Şekil B.1. Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarına Sahip Model Sistemde Tween 20 Kullanılması ve Kullanılmaması Durumunda *B. cereus* Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)



Şekil B.2. Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarına Sahip Model Sistemde Tween 20 Kullanılması ve Kullanılmaması Durumunda *E. coli* O157:H7 Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)



Şekil B.3. Farklı Yağ ve GSE Konsantrasyonlarına Sahip Model Sistemde Tween 20 Kullanılması ve Kullanılmaması Durumunda *S. enteritidis* Sayıları ($\log_{10}$ kob/ml)

ÖZGEÇMİŞ

Elvan Şahin 1980 yılında Bursa’da dünyaya geldi. Orta Öğrenimini Yalova’da Yalova Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde tamamladı. 1997 yılında girdiği İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Halen 2002 yılında girdiği İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği programında yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.