

**Gıdalarda Doğal Antimikrobiyallerin Kullanıldığı Biyoaktif  
Koruma Sistemleri Geliştirilmesi**

**Proje No: 104O543**

Doç. Dr. F. Banu Özen  
Yrd. Doç. Dr. Ferda Soyer Dönmez  
Doç. Dr. Yeşim Ekinci

Aralık 2009  
URLA, İZMİR

## Önsöz

Bu rapor 'Gıdalarda Doğal Antimikrobiyallerin Kullanıldığı Biyoaktif Koruma Sistemlerinin Geliştirilmesi' başlıklı TÜBİTAK-TOVAG 104O543 No'lu araştırma projesinin sonuçlarını içermektedir. Bu proje ile doğal kaynaklı, değişik antimikrobiyal maddelerin çeşitli şekillerde gıdalara uygulanması ile gıda güvenliğini artırıcı çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Projenin başlangıç tarihi 1 Nisan 2005 olup 6 aylık bir uzatmayla 1 Ekim 2009'da sonlanmıştır. Bütçesi telif hariç 123.000 TL'dir.

Projede bir yürütücü ve iki araştırmacı yer almıştır. Ayrıca, proje bütçesi çerçevesinde 3 yüksek lisans öğrencisi desteklenmiştir. Raporun yazıldığı tarihe kadar bu araştırmacının sonuçlarından bilimsel dergilerde 2 makale yayınlanmıştır ve 11 bildiri ulusal ve uluslararası konferanslarda sunulmuştur. Ayrıca konu ile ilgili olarak iki tez tamamlanmıştır.

Bu projede öncelikle dört doğal kaynaklı maddenin (aktif laktoferrin (ALF), biberiye ekstraktı (BE), jensenin G (JG) ve natamycin (NA)) antibakteriyel ve antifungal etkileri gıdaların güvenliğini ve kalitesini tehdit eden üç patojenik bakteriye (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Enteritidis) ve iki küfe (*Aspergillus niger* ve *Penicillium roquefortii*) karşı test edilmiştir. Bunlardan etkili olanları ve kombinasyonları gıdalara değişik işlemlerle uygulanmıştır. Bu işlemler, etlerin ve peynirlerin antimikrobiyal solüsyonlara batırılması ve peynirlerin antimikrobiyal madde içeren biyopolimerlerle paketlenmesidir. Ayrıca antimikrobiyal madde eklenmesinin biyopolimerlerin fiziksel özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve antimikrobiyal maddelerin gıdalardan salınım profilleri elde edilmiştir.

Sonuçlar ALF ve BE'nin solüsyon olarak antibakteriyel etkilerinin olduğunu göstermiştir. Etlere batırma yolu ile uygulandığında ALF, *L. monocytogenes* ve *E. Coli* O157:H7 sayılarında düşüşe yol açmıştır. BE ise yine etlerde üç mikroorganizmaya karşı da etkili olmuştur. BE, aynı zamanda batırma yolu ile ete uygulandığında oksidasyonu düşürmüştür. NA güçlü bir antifungal maddedir ve biyopolimerlerin içine eklendiğinde besiyeri üzerinde yapılan çalışmalarda iki küfe karşı oldukça etkili olmuştur. NA içeren biyopolimerler ise kaşar peynirin yüzeyinde sadece *A. niger* büyümesini engellemekte başarılı olmuştur. Antimikrobiyal olarak etkili olan konsantrasyonlarda biyopolimerlerin fiziksel özelliklerinde önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Peynirlerin NA solüsyonuna batırma uygulamalarında iki küfün de gelişiminin engellenmesinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

# İçindekiler

Özet.....	10
Abstract.....	12
1. Giriş.....	13
2. Genel Bilgiler.....	14
3. Gereç ve Yöntem.....	20
3.1 Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları.....	20
3.2 Bakteri Kültürlerinin Hazırlanışı.....	20
3.3 Bakteri Büyüme Eğrileri.....	21
3.4 Küf Suşları ve Kültür Koşulları.....	21
3.5 Küf Kültürlerinin Hazırlanışı.....	21
3.6 Antimikrobiyal Maddelerin Hazırlanması.....	22
3.6.1 Aktif laktoferrin (ALF).....	22
3.6.2 Biberiye ekstraktı (BE).....	22
3.6.3 Natamycin (NA).....	23
3.6.4 Jensenin G (JG).....	23
3.6.4.1 Kullanılan bakteri kültürlerinin yetiştirilmesi.....	23
3.6.4.2 Fermentasyon.....	23
3.6.4.3 Yarı saflaştırılmış jensenin G'nin hazırlanması.....	23
3.6.4.4 Bakteriyosin aktivite testi.....	24
3.7 Antimikrobiyal Aktivite Testleri.....	24
3.7.1 Mikroplaka tekniği.....	24
3.7.2 Disk difüzyon tekniği.....	25
3.8 Gıda Uygulamaları.....	26
3.8.1 Bakteri inoküle edilmiş etlerin batırma uygulamaları.....	26
3.8.2 Küf inoküle edilmiş peynirlerin batırma uygulamaları.....	27
3.8.3 Batırma yoluyla ete uygulanan BE'nin antioksidan etkisinin tespiti.....	28
3.8.4 Küf inoküle edilmiş peynirlerin püskürtme uygulamaları.....	28
3.8.5 Bakteri inoküle edilmiş yüzeylerin batırma uygulamaları.....	29
3.9 Biyopolimerlerin Hazırlanması.....	29
3.9.1 Metil selüloz (MS) filmlerin hazırlanması.....	29
3.9.2 Gluten (G) filmlerin hazırlanması.....	29
3.9.3 Antimikrobiyal maddelerin filmlere katılması.....	30
3.10 Biyopolimerlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30

3.11	Biyopolimerlerin Karakterizasyonu.....	30
3.11.1	Mekanik özellikler.....	30
3.11.2	Su buharı geçirgenliği.....	31
3.11.3	Yüzey görüntüleri.....	32
3.12	Biyopolimerlerin Gıda Uygulamaları.....	32
3.13	Antimikrobiyal Maddelerin Biyopolimerlerden Salınımı.....	33
3.14	İstatistiksel Analiz.....	33
4.	Bulgular ve Tartışma.....	34
4.1	ALF, BE ve JG'nin Mikroplaka Yöntemi ile Belirlenen Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	35
4.1.1	ALF.....	35
4.1.2	BE.....	36
4.1.3	JG.....	39
4.1.4	Kombinasyon halinde kullanılan aktif maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri...39	
4.2	Aktif Maddelerin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenen Antimikrobiyal Aktiviteleri....	45
4.2.1	ALF, BE ve JG'nin antibakteriyal özellikleri.....	45
4.2.2	NA, BE, ALF ve JG'nin antifungal özellikleri.....	45
4.3	Antimikrobiyal Maddelerin Gıda Uygulamaları.....	50
4.3.1	Etler için batırma uygulamaları.....	50
4.3.2	Peynir için batırma uygulamaları.....	54
4.3.3	Batırma yoluyla et üzerine uygulanan BE'nin antioksidan aktivitesi.....	56
4.3.4	Peynir için püskürtme uygulamaları.....	57
4.3.5	Değişik yüzeyler için batırma uygulamaları.....	58
4.4	Biyopolimerlerin Antimikrobiyal Özellikleri.....	59
4.5	Biyopolimerlerin Fiziksel Karakterizasyonu.....	65
4.5.1	Mekanik özellikler.....	65
4.5.2	Yüzey özellikleri.....	66
4.5.3	Su buharı geçirgenliği.....	68
4.6	Biyopolimerlerin Gıda Uygulamaları.....	70
4.7	Biyopolimerlerden Antimikrobiyal Maddelerin Salınımı.....	81
5.	Sonuçlar.....	83
	Kaynaklar.....	86

## Tablolar

Tablo 3.1 Antimikrobiyal maddelerin kombinasyon şeklinde kullanıldıklarında konsantrasyon aralıkları.....	25
Tablo 4.1 ALF, BE ve JG'nin üç mikroorganizma üzerinde 12, 18 ve 24. saatlerdeki antimikrobiyal etkilerine göre değişik konsantrasyonlarda farklılıklarının Tukey analiz ile elde edilen sonuçları.....	42
Tablo 4.2 Değişik konsantrasyonlarda NA ile <i>A. niger</i> ve <i>P. roquefortii</i> 'ye karşı uygulanan disk difüzyon testinin sonuçları.....	46
Tablo 4.3 Mikroplaka ve disk difüzyon tekniği ile antimikrobiyal özellikleri gıda kaynaklı patojenlere ve küflere karşı test edilen doğal antimikrobiyallerin etkinlikleri ve MIC değerleri.....	49
Tablo 4.4 NA ve NA+BE içeren G polimerlerin disk difüzyon testi sonuçları.....	61
Tablo 4.5 NA ve NA+BE içeren MS polimerlerin disk difüzyon testi sonuçları.....	62
Tablo 4.6 NA ve NA+BE içeren kağıt disk ve polimerlerin MIC değerleri.....	65
Tablo 4.7 NA ve NA+BE içeren biyopolimerlerin mekanik özellikleri.....	66
Tablo 4.8 Kontrol ve antifungal maddeler içeren G ve MS polimerlerin su buharı geçirgenlikleri.....	69
Tablo 4.9. NA içeren MS filmlerin saklama sırasında kaşar peyniri üzerindeki <i>A. niger</i> yüküne (log CFU/g) etkisi.....	71
Tablo 4.10 NA içeren MS filmlerin saklama sırasında kaşar peyniri üzerindeki <i>A. niger</i> yüküne (log CFU/g) etkisi.....	73
Tablo 4.11 NA+BE içeren MS filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş <i>A. niger</i> yüküne (log CFU/g) etkisi.....	75
Tablo 4.12. NA+BE içeren G filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş <i>A. niger</i> yüküne (log CFU/g) etkisi.....	77
Tablo 4.13 NA içeren MS filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş <i>P. roquefortii</i> yüküne (log CFU/g) etkisi.....	78
Tablo 4.14 NA içeren G filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş <i>P. roquefortii</i> yüküne (log CFU/g) etkisi.....	80

## Şekiller

Şekil 2.1 Biyopolimerlerin sınıflandırılması.....	16
Şekil 3.1 a) Batırma uygulamaları için hazırlanan etler, b) batırma uygulaması.....	26
Şekil 3.2 a) Batırma uygulamaları için hazırlanan peynirler, b) batırma uygulaması.....	27
Şekil 3.3 Su buharı geçirgenliği ölçüm sistemi.....	31
Şekil 4.1 ALF'nin a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>E. coli</i> O157:H7 ve c) <i>S. Enteritidis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	37
Şekil 4.2 BE'nin a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>E. coli</i> O157:H7 ve c) <i>S. Enteritidis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	38
Şekil 4.3 JG'nin a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>E. coli</i> O157:H7 ve c) <i>S. Enteritidis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	41
Şekil 4.4 ALF+BE'nin a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>E. coli</i> O157:H7 ve c) <i>S. Enteritidis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	43
Şekil 4.5 a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>E. coli</i> O157:H7 and c) <i>S. Enteritidis</i> için tahmin grafikleri (Bütün grafiklerde y-ekseni OD değerlerini göstermektedir).....	44
Şekil 4.6 Disk difüzyon tekniğine göre engelleme bölgesi çapının NA konsantrasyonu ile değişimi ( a) <i>A. niger</i> , b) <i>P. roquefortii</i> ).....	47
Şekil 4.7 a) 5000 ppm NA içeren kağıt diskin <i>A. niger</i> üzerine etkisi b) <i>A. niger</i> için kontrol örneği c) 750 ppm NA içeren kağıt diskin <i>P. roquefortii</i> üzerine etkisi d) <i>P. roquefortii</i> için kontrol örneği.....	48
Şekil 4.8 Batırma yolu ile ALF uygulamasının et yüzeyindeki a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>S. enteritidis</i> ve c) <i>E. coli</i> O157:H7'e etkisi.....	52
Şekil 4.9 Batırma yolu ile BE uygulamasının et yüzeyindeki a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>S. enteritidis</i> ve c) <i>E. coli</i> O157:H7'e etkisi, d) ALF+BE'nin <i>E. coli</i> O157:H7'e etkisi.....	53
Şekil 4.10 Batırma yolu ile NA uygulamasının peynir yüzeyindeki a) <i>P. roquefortii</i> ve b) <i>A. niger</i> üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.11 Batırma yolu ile NA uygulamasının peynir yüzeyindeki a) <i>A. niger</i> ve b) <i>P. roquefortii</i> üzerine etkisini gösteren peynir örnekleri.....	56
Şekil 4.12 Değişik konsantrasyonlarda BE'na batırılmış et örneklerinin 8°C'de saklama sırasında TBA değerlerinin zamanla değişimi.....	57

Şekil 4.13 Püskürtme yolu ile NA uygulamasının peynir yüzeyindeki <i>A. niger</i> üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.14 a) Çelik ve b) tahta yüzeylere batırma yolu ile uygulanan BE'nin <i>E. coli</i> 0157:H7 büyümesi üzerine etkileri.....	59
Şekil 4.15 G ve MS polimerlerin <i>A. niger</i> 'e karşı etkileri: a) 2 mg NA/10 g fs içeren G film, b) G kontrol, c) 2 mg NA/10 g fs içeren MS film d) MS kontrol.....	63
Şekil 4.16 G ve MS polimerlerin <i>P.roquefortii</i> 'ye karşı etkileri: a) 2 mg NA/10 g fs içeren G film, b) G kontrol, c) 2 mg NA/10 g fs içeren MS film d) MS kontrol.....	64
Şekil 4.17 G filmlerin TEM kesit resimleri a) kontrol film, b) 20 mg NA/10g fs, c) (2 mg NA +1.5 ml BE)/10g fs.....	67
Şekil 4.18 MS filmlerin TEM kesit resimleri a) kontrol film b) 20 mg NA/10g fs c) (2 mg NA +1.5 ml BE)/10g fs.....	68
Şekil 4.19 NA içeren MS filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilen <i>A. niger</i> üzerine etkisi.....	71
Şekil 4.20 Otuz gün saklama süresi sonunda MS filmlerin peynir yüzeyindeki <i>A. niger</i> 'a etkisi a) kontrol b) 5 mg NA/10g fs.....	72
Şekil 4.21 NA içeren G filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilen <i>A. niger</i> üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.22 Otuz gün saklama süresi sonunda G filmlerin peynir yüzeyindeki <i>A. niger</i> 'a etkisi a) sarılmamış kontrol peynir b) G kontrol film.....	74
Şekil 4.23 Çeşitli konsantrasyonlarda NA+BE içeren MS filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş <i>A. niger</i> üzerine etkisi.....	75
Şekil 4.24 Otuz gün saklama süresi sonunda MS filmlerin peynir yüzeyindeki <i>A. niger</i> 'a etkisi a) sarılmamış kontrol peynir b) (5mg NA+1,5 ml RE)/10g fs.....	76
Şekil 4.25 Çeşitli konsantrasyonlarda NA+BE içeren G filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilmiş <i>A. niger</i> üzerine etkisi.....	77
Şekil 4.26 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren MS filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilmiş <i>P. roquefortii</i> üzerine etkisi.....	79
Şekil 4.27 Otuz gün saklama süresi sonunda MS filmlerin peynir yüzeyindeki <i>P. roquefortii</i> 'ye etkisi a) sarılmamış kontrol peynir b) 5mg NA/10g fs.....	79

Şekil 4.28 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren G filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş <i>P. roquefortii</i> üzerine etkisi.....	80
Şekil 4.29 Otuz gün saklama süresi sonunda G filmlerin peynir yüzeyindeki <i>P. roquefortii</i> 'ye etkisi a) sarılmamış kontrol peynir b) 5mg NA/10g fs.....	81
Şekil 4.30 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren MS filmlerden NA kaşar peynirine 8°C'de salınım profilleri.....	82
Şekil 4.31 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren G filmlerden NA kaşar peynirine 8°C'de salınım profilleri.....	83



## Kısaltmalar

ALF	aktif laktoferrin
ANOVA	varyans analizi
BE	biberiye ekstraktı
BHI	brain heart infusion
CT	cefixime tellurite
DRBC	dichloran rose bengal chloramphenicol
EM	elastikiyet modülü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Fs	film solüsyonu
G	gluten
GM	gerilme mukavemeti
JG	jenseniin G
%KN	% kopma noktası
LB	lauria broth
MIC	minimum etkin konsantrasyon
MS	metil selüloz
NA	natamycin
NCTC	National Culture Type Collection
NLB	sodyum laktat buyyon
OD	optik densite
PDA	potato dextrose agar
SMAC	sorbitol Mac Conkey
SBG	su buharı geçirgenliği
SBGO	su buharı geçirgenlik oranı
TBA	tiobarbiturik asit
TEM	taramalı elektron mikroskobu
TS	tryptic soy
XLD	xylose lysine deoxycholate

## Özet

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan gıda zehirlenmeleri her yıl ölümlere varan ciddi sağlık problemlerinin yanısıra ekonomik kayıplara da sebep olmaktadır. Günümüzde, gıdalarda patojen mikroorganizmaların büyümesini engellemek için çeşitli sentetik antimikrobiyal maddelerden faydalanılmaktadır. Fakat, bu gibi kimyasal maddelerin kanserojen ve alerjenik reaksiyonlar gibi yan etkilere sahip olması doğal kaynaklı koruyucu maddelere olan ilgiyi arttırmıştır. Bu çalışmada, doğal kaynaklı; aktif laktoferrin (ALF), biberiye ekstraktı (BE), bir bakteriosin olan Jensenin-G (JG) ve natamycin (NA) üç patojen bakteriye ve iki küfe karşı kullanılmıştır

Bu çalışmanın amacı doğal kaynaklı bu maddelerin tek tek ve kombinasyonlar halinde öncelikle besiyeri ortamında antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesidir. Daha sonra bu maddelerden ve kombinasyonlardan etkili olanların gıda yüzeyine direk uygulanarak veya paket malzemeleri içine katılarak gıdaların güvenliğinin ve kalitesinin artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu maddelerin paketlemede kullanılan biyo-malzemelerin fiziksel özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi ve gıdaya salınım profillerinin belirlenmesi de hedeflenmiştir.

Besiyerinde ALF' nin *L.monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis*'e etki eden en düşük konsantrasyonu sırasıyla; %0,1, %1 ve %0,5'dir. BE, sadece %15'lik konsantrasyon ile *L. monocytogenes*'e karşı öldürücü etki gösterirken JG her üç patojen üzerinde antimikrobiyal etki sergilememiştir. Fakat BE, ALF ile birlikte test edildiğinde ALF'nin antimikrobiyal özelliğini arttırmıştır. ALF ve BE et yüzeyine uygulandıklarında etkileri besiyerine göre azalmış olsa da bakteri sayılarını düşürmüşlerdir.

NA'nin *A. niger* ve *P. roquefortii*'ye karşı besiyeri koşullarında en düşük etki konsantrasyonu 750 ppm olarak bulunmuştur. NA'e batırma uygulaması peynirlerde iki küfünde büyümesinin azaltılmasında kaydedeğer bir etki göstermiştir. NA içeren gluten ve metilselüloz filmlerin aynı funguslara karşı etki gösterdikleri en düşük konsantrasyonlar sırasıyla 2 ve 1 mg NA/10g'dır. BE, tek başına antifungal özellik göstermezken NA ile birlikte filmlerin yapısına katıldığında *A. niger*'e karşı sinerjistik aktivite göstermiş ve NA'nin her iki film içindeki en düşük etki eden konsantrasyonunu 1,5 mg NA/10g 'a düşürmüştür. Taramalı elektron mikroskop fotoğrafları yüksek konsantrasyonda NA'nin filmler içinde kristalize olduğunu göstermektedir. NA eklenmesi filmlerin su buharı geçirgenliğinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. NA ilave edilmesi gluten filmlerin mekanik özelliklerinde değişikliğe neden olmazken metilselüloz filmlerin ise gerilme mukavemetleri, yüksek NA konsantrasyonunda düşmüştür. Kaşar peynirleri üzerine uygulanan NA içeren gluten ve metilselüloz filmler sadece *A. niger*' a karşı antifungal etki göstermişlerdir.

**Anahtar Kelimeler:** Aktif laktoferrin, natamycin, biberiye ekstraktı, jenseniin G, biyopolimer, metil selüloz film, gluten film

## Abstract

Microbial contamination of food products increases the risk of food-borne infections and intoxications. In recent years, more studies have been performed for development of natural alternatives to control the growth of pathogenic microorganisms in food rather than synthetic compounds. In the present study, natural antimicrobial agents from different sources, activated lactoferrin-(ALF), rosemary extract-(BE), jenseniiin-G (JG) and natamycin-(NA) were used.

The aim of this study is to determine antimicrobial properties of these natural agents on media, either by alone or in combination. Then, effective agents or their combinations will be applied on food surfaces either by dipping/spraying or incorporating into packaging materials to enhance the safety and quality of foods. It is also aimed at investigating the effect of these agents on physical properties of biomaterials which are used in packaging and determination of release profiles of these compounds into foods.

On media, minimum inhibitory concentrations of ALF against *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis* are 0.1%, 1% ve 0.5%, respectively. While BE at a concentration of 15% inhibited only the growth of *L. monocytogenes*, JG did not show any significant activity on the growth of the same pathogens. BE enhanced the activity of ALF on *E. coli* O157:H7. When ALF and BE were applied to the surface of the meat samples although their antimicrobial effect is less compared to their effect on media they still caused a decrease in microbial population.

Minimum inhibitory concentration of NA on media was found as 750 ppm against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. Dipping cheese samples to NA solution caused a significant decrease on the population of both fungus. Both gluten and methyl cellulose films containing NA showed antifungal activity at concentrations of 2 and 1 mg NA/10 against *A. niger* and *P. roquefortii*, respectively. BE did not have any antifungal effect individually; however, BE in combination with NA reduced MIC of NA against *A. niger* to 1.5 mg NA/10g in both films. Scanning electron microscope observations showed that NA crystallizes at high concentrations in biopolymers. There was no significant change in water vapor permeability of films containing NA. Incorporation of NA to gluten film did not cause major changes in its mechanical properties. Reduction in tensile strength of methyl cellulose films was observed at high NA concentration. Application studies demonstrated the efficacy of gluten and methyl cellulose films including NA against only *A. niger* inoculated on Kashar cheese.

**Key words:** activated lactoferrin, natamycin, rosemary extract, jenseniiin G, biopolymer, methyl cellulose film, gluten film

## 1. Giriş

Günümüzde gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar hem insan sağlığına tehdit teşkil etmekte hem de ekonomiyi kötü yönde etkilemektedir. Az işlenmiş ve hazır gıdalara talebin artması ve de gıda ticaretinin küreselleşmesi gıda güvenliği ve kalitesi açısından riskleri daha da artırmaktadır. Mikrobiyal kontaminasyon gıda zehirlenmesi riskini artırır ve gıdaların raf ömürlerini kısaltır. T.C. Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre Türkiye’de 2001 yılında bakteri kaynaklı gıda zehirlenmesi nedeni ile 7,875 kişi hastanede yatmış ve bu vakalardan 324’ü ölümlerle sonuçlanmıştır (SAĞLIK BAKANLIĞI, 2001). Bunlar sadece resmi rakamlar olup, tahmini olarak bunun 3-4 katı sayıda vaka istatistiklere girmemiştir. Gelişmiş ülkelerde de durum pek farklı değildir. A.B.D.’de yılda 76 milyon kişi mikrobiyal patojenlerin neden olduğu gıda ile ilgili hastalıklardan muzdarip olmakta ve bunlardan yaklaşık 5,200’i ölümlerle sonuçlanmaktadır (NAIDU ve DİĞ., 2003). Gıda ile ilgili hastalıkların Amerikan ekonomisine 2001 yılında verdiği zarar 6,9 milyar \$ olarak tahmin edilmektedir.

Gıdalarda güvenliğin artırımını sağlayacak tekniklerin geliştirilmesi tüm dünyada gıda alanında öncelikli araştırma konularından biri haline gelmiştir. Et ve süt ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyon genellikle işleme sonrası muamele sırasında ürünün yüzeyinde olmaktadır. Bu sorun ürün yüzeyine antimikrobiyal maddelerin direk uygulanması veya paketleme malzemesinin içinde kullanılması ile çözülebilir. Antimikrobiyal özellikleri olan paket malzemelerinin polisakkarit, protein ve lipitler gibi biyo bozunur malzemelerden yapılması ayrıca atıkların azaltılması gibi ek faydalar da sağlayacaktır. Paketleme malzemesinin içerisindeki antimikrobiyal maddeler paketleme sonrası ihtiyaç duyulan noktaya yani ürün yüzeyine yavaş yavaş salınacak ve yüzeydeki mikrobiyal bozunmayı geciktirecektir. Diğer bir yöntemde bu maddelerin ürün yüzeyine püskürtme veya batırma yoluyla uygulanmasıdır. Aynı yöntem gıdaların yanı sıra gıdaların temas ettiği yüzeylerin dezenfeksiyonunda da etkili olabilir.

Son yıllarda minimum işlem görmüş yemeye hazır gıdaların tüketiminin artışı; gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlardaki artış ve buzdolabı sıcaklığında gelişebilen dirençli mikroorganizmaların çoğalması, doğal antimikrobiyal maddelerin kullanıldığı alternatif gıda koruma yöntemlerine olan ilgiyi de artırmıştır. Doğal antimikrobiyallerin bir çoğu sınırlı aktivite spektrumuna sahip olduğundan, etkin koruma için kombinasyonlar halinde kullanım etkili bir yol olabilir. Bu projede kullandığımız doğal maddeler: jenseninin G (bakteriyosin), aktif laktoferrin, natamycin ve biberiye ekstraktıdır.

Bakteriler tarafından üretilen, protein yapısında doğal antimikrobiyal bir madde olan bakteriyosinler, gıdalarda patojen mikroorganizmaların gelişmesini kontrol etme potansiyeline sahiptirler. Gram (+) bakterilerden, özellikle laktik asit bakterilerinden birçok bakteriyosin izole

edilip tanımlanmıştır. Bir süt bakterisi olan *Propionibacterium thoenii* (*jensenii*) tarafından üretilmiş olan bakteriyosin jensenin G, özelliklerinden dolayı gıdalarda kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Laktoferrin süttten izole edilmiş bir antimikrobiyal peptittir ve immobilize edilerek aktif forma getirilmiş, böylece antimikrobiyal etkinliği artırılmıştır. Antimikrobiyal özelliği olan diğer bir madde de natamycindir. *Streptomyces natalensis* tarafından üretilen natamycin fungusit bir ajandır. Bugüne kadar olan çalışmalarda natamycin peynir üzerine spreylenecek kullanılmıştır. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) akdeniz bitki örtüsünden bir bitki olup, kuvvetli antioksidan ve antimikrobiyal etki gösterir.

Bu çalışmanın amaçları:

1. Doğal kaynaklı jensenin G (JG), aktif laktoferrin (ALF), natamycin (NA) ve biberiye ekstraktı'nın (BE) tek tek ve kombinasyonlar halinde üç patojenik bakteriye (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* Enteritidis) ve iki küfe (*Aspergillus niger* ve *Penicillium roquefortii*) karşı besiyeri üzerinde antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi,
2. Bu maddelerden bakterilere karşı etkili olanların et yüzeylerine ve küflere karşı etkili olanlarında peynir yüzeyine batırma yoluyla uygulamasının etkilerinin incelenmesi ve ayrıca antimikrobiyal etkisi tespit edilirse BE'nin antioksidan özelliğinin belirlenmesi,
3. Antimikrobiyal madde içeren gluten (G) ve metil selüloz (MS) biyopolimerlerin hazırlanması ve bu polimerlerin gıdaların paketlenmesinde kullanılarak gıdaların yüzeyindeki mikrobiyal büyümeye etkilerinin incelenmesi,
4. Biyopolimerlere antimikrobiyal madde eklenmesinin bu polimerlerin geçirgenlik, mekanik ve yapısal özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesi,
5. Antimikrobiyal maddelerin biyopolimerlerden salınım profillerinin belirlenmesidir.

## 2. Genel Bilgiler

Gıda yüzeylerinin mikrobiyal kontaminasyondan korunması gıdanın raf ömrünü belirleyen en önemli etmenlerden biridir. İşleme öncesi ve sonrası mikrobiyal kontaminasyon gıda bozulmalarına yol açmakta ve gıda zehirlenmelerine sebep olarak tüketici sağlığına da tehdit teşkil etmektedir. Ayrıca gıdaların temas ettiği yüzeylerdeki mikrobiyal büyüme de önemli bir problemdir (RAYNER ve DİĞ., 2004). Genel olarak bakteriler, bütün gıda kaynaklı bozulmaların %30'undan ve gıda zehirlenmelerinden kaynaklı ölümlerin %72'sinden sorumludur. Bakteriyal patojenler arasında özellikle *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *Salmonella* spp. en çok hastalık ve ölüme yol açan mikroorganizmalardır (OUSSALLAH ve DİĞ., 2007). En yüksek ölüm oranları %31 ile *Salmonella* spp. daha sonra ise %28 ile *L. monocytogenes*'e aittir. *E. coli* O157:H7 için bu oran %3'dür (MEAD ve DİĞ., 1999). ABD'de 1999 yılında, sadece *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* ve hem O157:H7 hem de O157 olmayan *E. coli*,

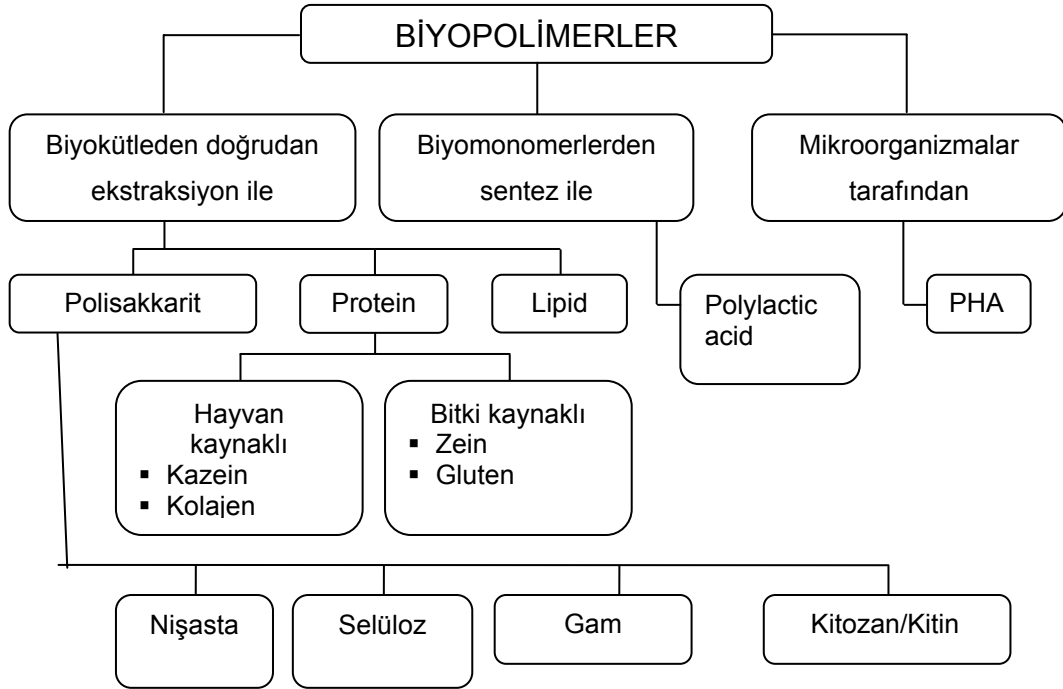
6 milyon vakaya ve yaklaşık 9000 ölüme yol açmıştır (MEAD ve DİĞ., 1999). Türkiye’de çok azı kayıt altında olsa dahi 2002 yılına ait verilere göre gıda kaynaklı 7875 hastaneye yatma ve 324 ölüm vakası bildirilmiştir (OZEL HASTANELER, 2008).

Gıdaların ve gıdaların işlendiği yüzeylerin mikroorganizmalardan arındırılmasında klor, organik asitler, oksitleyiciler ve çeşitli kimyasal koruyucular, püskürtme ve batırma yoluyla kullanılmaktadır. Bu kimyasalların toksik, mutajenik ve kanserojenik kalıntılar bırakabilecekleri yönünde endişeler bulunmaktadır ve bu tür uygulamalara özellikle Avrupa ülkelerinde temkinli yaklaşılmaktadır. Bu nedenle doğal antimikrobiyallere olan ilgi artmıştır.

Gıdaların mikrobiyal kontaminasyondan korunması ve kalitesinin bozulmasının engellenmesi, gıda paketlerinin en önemli görevlerindendir. Geleneksel paketleme teknikleri ürün ile etkileşim halinde değildirler. Fakat son yıllarda dikkat çeken aktif paketleme teknikleri gıdaların korunmasına, gıda ile doğrudan etkileşim içine girerek katkıda bulunurlar. Oksijen tüketen, etilen tutan, karbon dioksit üreten ya da tutan sistemler, koku yayan veya tutan sistemler aktif paketleme tekniklerinin önemli örneklerindendir. Aktif paketlemenin ilginç ve çok yönlü uygulamalarından biri de antimikrobiyal ve antioksidan özelliği olan paketleme malzemeleridir. Antimikrobiyal ve antioksidan maddelerin paketleme malzemelerinin içine yerleştirilmesi, gıda bilimcilerce bu maddelerin koruyucu özelliği ile paketlemenin koruyucu özelliğini birleştirme olanağı verdiği için daha uygun seçenekler sunmaktadır. Antimikrobiyal ve/veya antioksidan özelliği olan maddelerin paketleme malzemesinin içine yerleştirilmesi ile kontaminasyonların büyük bir kısmının oluştuğu gıdaların yüzeyindeki mikrobiyal büyümenin önlenmesi hedeflenmektedir. Antimikrobiyal madde yüzeye kademeli bir şekilde salınacağından gıdaya eklenecek koruyucu maddelerin miktarı da azaltılabilir. Antimikrobiyal ve antioksidan maddelerin paket yüzeyinden yavaş yavaş salınması, bu maddelerin püskürtme veya batırma yoluyla uygulanmasına göre daha avantajlı görünmektedir. Püskürtme veya batırma yoluyla antimikrobiyal/antioksidan uygulaması sonucu gıdanın iç kısımlarına doğru yayılma nedeniyle bu maddeler seyrelip etkinlikleri azalabilir. Paket içine yerleştirilen antimikrobiyaller eğer aktivitelerini koruyabilirlerse ürünün saklanması sırasında etkilerini devam ettirebilirler (QUINTEVALLA ve VICINI, 2002; SUPPAKUL ve DİĞ., 2003). Ancak bazı antimikrobiyal/antioksidan maddeler paket malzemesi içindeki maddelerle etkileşme nedeniyle ve/veya malzemenin üretimi sırasındaki koşullardan dolayı antimikrobiyal özelliklerini kaybedebilirler. Bu nedenle antimikrobiyal/antioksidan maddelerin direk uygulama veya paketleme içine dahil edilerek uygulanması yöntemleri, gıdalar üzerinde karşılaştırmalı olarak test edilerek etkili yöntem tespit edilmelidir.

Doğal makromoleküllerden yapılmış paketleme malzemelerine ilgi çevresel ve atık miktarını azaltma ile ilgili kaygılar nedeni ile özellikle son yıllarda artmıştır. Biyopolimerler, aynı zamanda yenilebilir filimler olarak da adlandırılır ve polisakkarit, protein veya lipidlerden

üretilebilir. Nişasta, kitosan, soya proteini izolesi, peynir altı suyu izolesi, mısır proteini zein ve metil selüloz biyopolimerlerin yapımında kullanılan maddelere örnektir (MILLER ve KROCHTA, 1997). Bir çok sentetik paket malzemesinin aksine biyopolimerler, enzimler yardımı ile monomer yapılarına dönüştürülebilirler. (KAPLAN ve DİĞ., 1993). Ayrıca bu filmler yenebilecekleri için gıdalara besin değeri de eklerler. Biyopolimerler üretildikleri kaynağa ve üretilme yöntemlerine göre üç gruba ayrılabilirler (WEBER ve DİĞ., 2002): 1) doğal maddelerden ekstraksiyon ile üretilenler, 2) biyolojik kaynaklı monomerlerden kimyasal sentezle üretilenler, 3) mikroorganizmaların ürettiği biyopolimerler. Bu üç grup ayrıntılarıyla Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Biyopolimerlerin sınıflandırılması

Bu çalışmada MS ve G filmler antimikrobiyal biyopolimerlerin hazırlanmasında kullanılmışlardır. MS, selülozun suda çözünebilir bir türevidir. Selülozun metil klorit ile kontrollü sıcaklık ve basınç altında reaksiyonu ile elde edilir. MS'dan elde edilen biyopolimerler düz bir zincir yapısına sahip olduğundan dayanıklı, esnek ve saydam özelliklere sahiptirler (KROCHTA ve DİĞ., 1994). MS filmler, yağların migrasyonuna dayanıklı oldukları gibi diğer hidrofilik biyopolimerlerle karşılaştırıldıklarında düşük su buharı geçirgenliğine sahiptirler (ERDOHAN ve TURHAN, 2005).

Gluten buğdayın depo proteindir. Gluten, buğday nişastasını üretiminin bir yan



ürünüdür. Gluten, albumin, globulin, gliadin ve gluteninleri içeren bir protein karışımıdır. Albumin ve globulinler suda çözünür olup toplam proteinin %15-22'sine tekabül ederler. Gliadin ve gluteninler, glutenin esas iki proteindir ve toplam proteinin %85'ini oluştururlar (GENNADIOS, 2002). G filmler, düşük O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> geçirgenlikleri ve mekanik özelliklerinden dolayı son yıllarda üzerinde çok çalışan biyopolimerlerdendir (GENNADIOS ve DİĞ., 1997).

Biyopolimerler, antimikrobiyal ve antioksidan maddeler eklenerek biyoaktif paketleme malzemeleri haline getirilebilir. Böylece bu filmler gıda yüzeyindeki mikrobiyal büyümeyi ve gıdanın oksidasyonunu engelleyebilir ayrıca kendi kendine bozunurluk özelliğine sahip olabilirler. Literatür özellikle antimikrobiyal maddelerin paketleme malzemesine dahil edilmesini gösteren bir çok örneğe sahiptir. Gümüş zeolit, bitki ve baharat ekstraktları, organik asitler ve lizozim gibi maddeler paketleme malzemeleri içine ilave edilen antimikrobiyallere örnektir (APPENDINI ve HOTCHKISS, 2002). Son bir kaç yıl içerisinde bu konuda yayınlanan makalelerin sayısı bu konuya verilen önemin bir ölçütüdür.

Bakteriyosinlerin paketleme malzemeleri içine eklenmesi de olası çözümlerden biridir ve bugüne kadarki çalışmalar da bunu desteklemektedir. Aljinat jelin içine immobilize edilmiş olarak et yüzeyine püskürtme yoluyla eklenen nisin, *Brochotrix thermospacta*'nın büyümesini azaltmıştır (CUTTER ve SIRAGUSA, 1997). Bir dizi çalışmada mısır ve soya proteinlerinden yapılmış filmler içine %4 seviyesinde eklenen nisaplinin Gram (+) bakterilerin büyümesini durdurduğu gözlemlenmiştir (DAWSON ve DİĞ., 1995; . ORR ve DİĞ., 1997; PADGETT ve DİĞ., 1998). %5 Nisaplin içeren soya proteininden yapılmış filmler salam yüzeyindeki *L. monocytogenes* sayısını 3 hafta içinde 1 log (DAWSON ve DİĞ., 2002), buğday proteininden yapılan filmler ise 8 hafta içerisinde 2,5 log düşürmüştür (Mc CORMICK ve DİĞ., 2003). Diğer bir çalışmada değişik konsantrasyonlarda, buğday proteini, soya proteini, yumurta proteini ve peynir altı suyu proteinlerinden yapılmış filmlere eklenen nisaplin *L. monocytogenes* sayısını 60 dakika içerisinde 1 log düşürmüştür. Nisin dışındaki bakteriyosinler de paketleme malzemelerine eklenmiş ve mikroorganizmalar üzerine etkili olmuştur. PEDIYOSIN ile kaplanmış selüloz kaplamalar et üzerindeki *L. monocytogenes* üzerinde etkili olmuştur (MING ve DİĞ., 1997). Başka bir çalışmada da iki tip bakteriyosin, polietilen filmler içine eklenmiş ve bu filmler *M. flavus* ve *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir (AN ve DİĞ., 2000). Nisin ve lacticin NK24, polietilen üzerine kaplama yapmak için kullanılmış ve bu iki bakteriyosinde istiridyeye ve etin üzerindeki mikroorganizmaların büyümesinin engellenmesinde aynı derecede etkili olmuşlardır (KIM ve DİĞ., 2002).

Bakteriler tarafından üretilen, protein yapısında doğal antimikrobiyal bir madde olan bakteriyosinler, gıdalarda patojen mikroorganizmaların gelişmesini kontrol etme potansiyeline sahiptirler. Gram (+) bakterilerden özellikle laktik asit bakterilerinden birçok bakteriyosin izole

edilip tanımlanmıştır. Şu anda yaygın olarak kullanılan tek bakteriyosin *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisindir (HOOVER, 1992). Mikroorganizmaların nisine dirençlilik kazanması halinde, alternatif olarak kullanılacak bakteriyosinlere ihtiyaç duyulacaktır. Süt propiyonik asit bakterileri de laktik asit bakterileri gibi GRAS mikroorganizmalar olarak kabul edilirler. Süt propiyonik asit bakterilerinden biri olan *Propionibacterium thoenii* (*jensenii*) P126 tarafından üretilen bakteriyosin jenseniin G' nin;

- ısıya dayanıklı (100°C de 15 dk),
- pH 2 ve 11 arasında aktif, donmaya ve soğuk depolamaya 4°C de 3 gün dayanıklı olan bir bakteriyosin olması (GRINSTEAD ve BAREFOOT, 1992),
- *Clostridium botulinum* A, B, ve E tipi sporlarının gelişimini geciktirmesi (GARREN ve DİĞ., 1994) ve
- besiyeri ortamına ve süte ilave edilmesi ile yoğurttaki starter kültür olarak kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'un ileri aşamalarda gelişimi engelleyerek yoğurttaki pH' nın istenilen seviyelerde (pH 4.2-4.3) kalmasını sağlaması (WEINBRENNER ve DİĞ., 1997), jenseniin G' nin potansiyel olarak gıdalarda kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur.

Antimikrobiyal enzimler ve peptitler de son yıllarda üzerinde yoğun bir şekilde araştırma yapılan maddelerdir. Özellikle, süttten izole edilmiş antimikrobiyal bir glikoprotein olan laktoferrin iyi bir çelatlama ajanıdır. Bu protein tek zincirli olup 80 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Laktoferrin pozitif yüke sahiptir ve iki simetrik globüler bölgeden oluşur. Her bölge  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  gibi bir metal iyonu bağlama kapasitesine sahiptir (ANDERSON ve DİĞ., 1989). Laktoferrinin sütteki konsantrasyonu süütün kaynağına göre değişir. İnsan (0.2-0.5g/100 ml), domuz ve fare sütünde yüksek miktarda, inek sütünde ise düşük oranda laktoferrin mevcuttur (DAVIDSON ve BRANEN, 1993). Laktoferrin, çeşitli biyo ve plastik filmlere eklenmiş ancak yeterli antimikrobiyal etki göstermemesine rağmen diğer antimikrobiyallerin etkisini artırdığı gözlemlenmiştir (LIMJAROEN ve DİĞ., 2003). Laktoferrin, değişik bakteri, küf ve virüslere karşı etkili olmasına rağmen, pH değişimlerine ısıya ve proteolitik etkiye oldukça duyarlıdır. NAIDU ve DİĞ., (2003) tarafından geliştirilen bir sistemde laktoferrin, galaktozca zengin bir polisakkarite bağlanarak immobilize edilmiş bir forma çevrilmiştir ve böylece antimikrobiyal etkinliği artırılmıştır. ALF, mikroorganizmaların biyolojik yüzeylere veya dokulara bağlanmasını engelleyerek mikrobiyal büyümeyi çeşitli mekanizmalarla önlerler (NAIDU, 2002). ALF, ayrıca demire bağlanarak bakterilerin kolonileşmesinde rol oynayan fibria oluşumunu engellemektedir (LOCKE ve DİĞ., 2003). ALF'nin gram (-) bakterilerin dış membranlarına zarar vererek bakterisidal etki gösterdikleri belirtilmiştir (NAIDU ve DİĞ., 2003). ALF, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, ve *Staphylococcus aureus* gibi

patojenlere ve *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., ve *Klebsiella* spp gibi gıda bozulmalarına yol açan mikroorganizmalara karşı etkili olmuştur (NAIDU, 2003). ALF, ABD'de Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS bir madde olarak kabul edilmiştir.

Bir diğer antimikrobiyal ajan olan NA, *Streptomyces natalensis* tarafından üretilen bir antibiyotiktir. Pimaricin, NA'nin sinonimidir ve küf ve mayaları önlemek için gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (STARK, 2003). NA, küf hücrelerinin membranında delikler açarak hücre içeriğinin dışarı akmasına neden olur. Avrupa'da uzun yıllardır peynir endüstrisinde küflenmeyi önlemek için kullanılmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler yüksek dozlarda kullanılmasının bile toksik etki yaratmadığını göstermiştir. Suda ve yağda çözünmediği için gastrointestinal sistemden aynen atılır. FDA tarafından da gıdalarda kullanılması onaylanmıştır. NA, yoğurt kültürüne uygulanmış ve 30 günlük buzdolabı koşullarında saklama sonucunda bu üründe hiç maya ve küf üremesi gözlenmemiştir (VAR ve DİĞ., 2004). NA'nin peynir ve sosis gibi ürünlerde kullanıldığında kalitede değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (STARK, 2003).

NA düşük çözünürlüğe sahip olup bu özelliğinden dolayı gıdanın iç bölgelerine çok fazla yayılmaz ve yüzeyde kalır. Bu nedenle de yüzey uygulamaları için çok uygundur (DAVIDSON ve BRANEN, 1993). NA blue, kaşar, İsveç sert, çedar ve Gorgonzola gibi bir çok peynire batırma veya sprey yolu ile 200-300 ppm seviyesinde uygulanmıştır. Kaplama olarak da bazı uygulamaları vardır (STARK, 2003). NA'nin maksimum 5 mm derinlikte bir gıda yüzeyinde izin verilen seviyesi 2 mg/dm<sup>2</sup>'dir. Ancak bu seviye ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Avustralya'da limit 15mg/kg olarak belirlenmiştir. ABD'de ise son üründe NA seviyesinin 20mg/kg'dan fazla olmaması istenmektedir (STARK, 2003). NA selüloz bazlı filmlere eklenmiş ve bu filmler Gorgonzola peynirinde *P. roquefortii*'nin büyümesinin engellenmesinde etkili olmuştur (DE OLIVEIRA ve DİĞ., 2007). Diğer bir çalışmada ise selüloz filmlere eklenen nisin ve NA kombinasyonu Mozarella peynirinin raf ömrünü 6 gün uzatmıştır (SANTOS ve DİĞ., 2008).

Son yıllarda, bitki ekstraktları ve yağları da gıda güvenliği açısından antimikrobiyal ve antioksidan özellikleriyle öne çıkmaktadır. Çeşitli bitki ekstrakt/yağları (biberiye, fesleğen, karanfil, defne vb.) genellikle başka antioksidan maddelerle beraber gıda içerisine katılarak kullanılmış ve kuvvetli antioksidan özellik göstermiştir (DRAUGHON, 2004). Ayrıca üzüm çekirdeği ekstraktı ve oregano yağı, paket malzemesi içine eklenmiş ve mikrobiyal büyümeyi engellemiştir (HA ve DİĞ., 2001; ROBLES-SIMENTAL ve DİĞ., 2004). Bu çalışmada kullanılacak olan BE'nin antioksidan etkisinin yanında, et ürünlerinde bozulmaya neden olan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisinin de olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (DEL CAMPO ve DİĞ., 2000; LEAL ve DİĞ., 2003; QUATTARA ve DİĞ., 1997). DEL CAMPO ve DİĞ., (2000) ekstraktın *Penicillium roquefortii* ve *Botrytis*

*cinerea* üremesine karşı yavaşlatıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Biberiye, zerdeçal ve zencefil etkstraktlarının karşılaştırmalı incelendiği bir çalışmada, BE en yüksek antioksidan etki değerlerini vermiştir (LEAL ve DİĞ., 2003). Değişik bitki ekstrakt yağları içeren kitosan filmlerin *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı etkileri *in vitro* ve etler üzerinde test edilmiştir (ZIVANOVIC ve DİĞ., 2005). Mercanköşk yağının kitosan filmlerin *E. coli*'ye karşı etkisini artırdığı gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise potasyum sorbat, sarımsak yağı veya nisin kitosan filmlere eklenmiştir (PRANOTO ve DİĞ., 2005). Bu çalışmanın sonucu olarak sarımsak yağının kitosanın antimikrobiyal etkisini filmin fiziksel ve mekanik özelliklerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan artırdığı bildirilmiştir. Üzüm çekirdeği ve yeşil çay ekstraktlarında soya proteininden elde edilen kaplamalara eklenen nisinin aktivitesini artırdığı da diğer bir çalışmanın sonucudur (THEIVENDRAN ve DİĞ., 2006).

### 3. Gereç ve Yöntem

#### 3.1 Bakteri Suşları ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada kullanılan *E. coli* O157:H7 (NCTC 12900), *L. monocytogenes* (NCTC 11994) and *S. Enteritidis* (NCTC 12694) National Culture Type of Collection'dan (NCTC, İngiltere) temin edilmiştir. *E. coli* O157:H7, Lauria (LB) sıvı besiyerinde büyütülmüştür. *L. monocytogenes* brain heart infusion (BHI) sıvı ve katı besiyerinde (Fluka) yetiştirilirken, tryptic soy (TS) sıvı ve katı besiyerleri (Fluka) *S. Enteritidis* için kullanılmıştır (ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2002).

Et uygulamalarında ise *L. monocytogenes* için PALCAM (Merck), *S. Enteritidis* için xylose lysine deoxycholate (XLD, Merck) ve *E. coli* O157:H7 için ise cefixime tellurite (CT, Merck) ilave edilmiş sorbitol Mac Conkey (SMAC, Fluka) seçici besiyerleri kullanılmıştır.

Bütün bakteriler için her hafta uygun besiyerlerinde alt kültürler oluşturulmuş ve bu kültürler 4°C'de saklanmıştır. Bütün suşlar, %20 gliserol içeren besiyerinde -80°C'de muhafaza edilmiştir. Suşlar ayda bir kere ya da gerek duyulduğunda tazelenmiştir. Suşların saflığını test etmek için zaman zaman gram boyama yapılmış ve morfolojik ve büyüme karakteristikleri tespit edilmiştir.

#### 3.2 Bakteri Kültürlerinin Hazırlanışı

Bütün kültürlerden tek koloni alınıp uygun bir sıvı besiyerine inoküle edilmişlerdir. Üç bakteri içinde inkübasyon zamanı 37°C'de 16 saattir. İnkübasyondan sonra kültürlerin optik

densiteleri (OD) 600 nm'de spektrofometre ile ölçülmüş ve istenilen OD değeri besiyeri eklenerek elde edilmiştir. Daha sonra 37°C'de *L. monocytogenes* 5,5 saat, *S. Enteritidis* 3 saat ve *E. coli* O157:H7 2,5 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Böylece logaritmik fazın ortasında kültürler elde edilmiştir. Elde edilen bakteri konsantrasyonları *E. coli* O157:H7 için  $1 \times 10^8$ , *S. Enteritidis* ve *L. monocytogenes* için ise  $5 \times 10^8$  cfu/ml'dir. İnkübasyondan hemen sonra antimikrobiyal testlerde kullanılmak üzere kültürler seri olarak uygun besiyeri ile seyreltilmişlerdir. Bakteri yüklerini teyit etmek için bakteri sayımlarında plaka sayım yöntemi uygulanmıştır.

### 3.3 Bakteri Büyüme Eğrileri

Her suştan tek koloni 4 ml uygun besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. OD 600 nm'de ölçülmüş ve yine uygun besiyeri ile uygun değere ayarlanmıştır. Bu kültürden %2'lik inokulum alınmış ve uygun besiyeri içeren 12 tüpe ilave edilmiştir. Tüpler 37°C'de inkübe edilmiş ve 24 saat boyunca her 2 saatte bir tüp alınarak OD'si ölçülmüştür. Büyüme eğrileri zamana karşı OD değerleri çizilerek elde edilmiştir (SAMBROOK ve RUSSELL, 2006).

### 3.4 Küf Suşları ve Kültür Koşulları

*Aspergillus niger* soğan kabuğundan Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma bölümünde izole edilmiş ve Dr. Gülsün Evrendilek tarafından sağlanmıştır. *Penicillium roquefortii* DBCI-1 ise İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği bölümünde Dr. Handan Baysal tarafından Danimarka mavi peynirinden izole edilmiştir. İki küfünde mikroskopik ve morfolojik analizleri yapılmıştır. Küfler potato dextrose (PDA, Merck) besiyerinde 30°C büyütülmüş ve saklanmıştır (ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2002). Küf sporları %20 gliserol içeren %0,1 peptonlu suda toplanmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir. Peynir uygulamalarında iki küf içinde dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC, Merck) seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

### 3.5 Küf Kültürlerinin Hazırlanışı

*A. niger* 3-5 gün inkübe edilmiş ve 5 günden daha yaşlı kültürler kullanılmamıştır. *P. roquefortii* ise 5-7 gün süresince inkübe edilmiş ve 7 günden sonra elde edilen sporlar kullanılmamıştır. Disk difüzyon testlerinde bakterinin agar üzerine mümkün olduğunca iyi bir

yoğunlukta homojen olarak dağılması önemlidir. Ön deneme sonuçlarına göre bu tür bir dağılım *A. niger* için  $1 \times 10^4$  spore/ml ve *P. roquefortii* için ise  $1 \times 10^6$  spore/ml yükte sağlanmıştır. Ayrıca inkübasyon süresi *A. niger* için 3 gün iken bu süre *P. roquefortii* için 6 gündür.

Sporlar %0,1 peptonlu suda hızlıca çalkalayarak elde edilmiştir. Elde edilen sporlar Thoma lamı üzerinde sayılmıştır. Spor yükleri gerektiğinde %0,1 peptonlu su ekleyerek ayarlanmıştır (SEBTI ve DİĞ, 2005). Disk difüzyon testlerinde yük *A. niger* için  $1 \times 10^4$  spore/ml ve *P. roquefortii* için ise  $1 \times 10^6$  spore/ml'dir. Peynir batırma uygulamalarında  $1 \times 10^4$  spore/ml yüke sahip solüsyonlar kullanılmıştır.

## 3.6 Antimikrobiyal Maddelerin Hazırlanması

### 3.6.1 Aktif laktoferrin (ALF)

ALF, üretici firma olan DMV International Nutritionals (Hollanda) tarafından ücretsiz olarak sağlanmıştır. Stok solüsyonunun hazırlanmasında üretici firmanın tarifi kullanılmıştır. %4'lük stok solüsyonu steril deiyonize su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

### 3.6.2 Biberiye ekstraktı (BE)

Biberiye örnekleri doğal ortamından toplanmış ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Bitkinin yaprak kısımlarının ekstraksiyonu için MADSEN ve DİĞ. (1998) tarafından önerilen yöntem bir takım değişikliklerle kullanılmıştır. 12 g yaprak, 70 ml saf etanol içinde bir homojenizatör ile (Heidolph Silent Crusher M Homogenizer, Almanya) 26000 rpm'de 5 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen solüsyon karanlık bir ortamda 30 dakika karıştırılmış ve 5000 rpm'de (Nuve NF 615, Türkiye) 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant toplanmış ve 30 ml etanol bu çökeltiye eklenmiştir. Daha sonra aynı prosedür iki kez daha tekrarlanmıştır. Son ekstraksiyon için kullanılan etanol miktarı 20 ml'dir. Son olarak elde edilen süpernatant vakum altında  $40^{\circ}\text{C}$ 'de dönerli bir buharlaştırıcı (Heidolph Laborato 4000, Almanya) ile 1 saat süresince buharlaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt vakum altında  $5 \mu\text{m}$  delik boyutlu selüloz nitrat filtre kağıdı ile süzülmüştür.

### 3.6.3 Natamycin (NA)

%50 NA ve %50 laktöz içeren Pimalac® Mayasan tarafından ücretsiz olarak sağlanmıştır. NA solüsyonu toz halindeki NA'yi 1:1 oranındaki etanol ve gliserol karışımı içinde çözerek hazırlanmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra istenilen konsantrasyonda solüsyonlar deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

### 3.6.4 Jenseniiin G (JG)

#### 3.6.4.1 Kullanılan bakteri kültürlerinin yetiştirilmesi

Bakteriyosin JG'yi üreten *P. thoenii (jensenii)* P126 ve indikatör mikroorganizma *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 4797, Clemson Üniversitesi (ABD) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Propiyonik asit bakterisi sodyum laktat buyyon (NLB) ve agarda, *L. delbrueckii* subsp. lactis ATCC 4797, Lactobacillus MRS buyyonda yetiştirilmiştir. Bütün kültürler CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörlerde 32 ve 37 °C de yetiştirilmiştir (GRINSTEAD ve BAREFOOT, 1992).

#### 3.6.4.2 Fermentasyon

Yarı-kesikli (fed-batch) fermentasyonlar 1 litrelik ağzı kapaklı şişelerde gerçekleştirilmiştir. 44 saatlik *P. thoenii (jensenii)* P126' nın sıvı kültürü (% 2 (v/v)) steril sodyum laktat içeren NLB içerisine aşılansarak 12 gün boyunca 32 °C de CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörlerde inkübe edilmiştir. İlk 48 saatten sonra her 24 saatte bir şişede olan besiyerinin % 0,3'ü kadar sodyum laktat eklenmiştir. Yedinci günde diğer besinleri tazelemek için 20 kat fazla diğer bileşenleri içeren fakat sodyum laktat içermeyen NLB eklenmiştir.

#### 3.6.4.3 Yarı saflaştırılmış JG'nin hazırlanması

12 gün sonunda yarı-kesikli fermentasyon kültürlerinden bakteri hücreleri santrifüj ile uzaklaştırılmış ve filtre edilmiştir. Süpernatant % 80 amonyum sülfat eklenerek yavaşça karıştırılarak 24 saat boyunca 4°C'de konsantre edilmiştir. Pıhtılaşmış öktürülmüş olan proteinler soğutmalı santrifüj ile toplanıp, steril saf su içerisinde çözündürülmüş ve diyaliz tüpü ile 0,1 M fosfat bafır içerisinde yavaş yavaş diyaliz edilmiştir.

#### 3.6.4.4 Bakteriyosin aktivite testi

Kritikal dilüsyon metodu kullanılarak (critical dilution method) JG hassas indikatör *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797'e karşı asay edilmiştir. Aktivite, zon oluşturan en yüksek dilüsyonun tersi alınarak her bir mililitre de aktivite ünitesi olarak (Activity unit (AU)) hesaplanmıştır.

### 3.7 Antimikrobiyal Aktivite Testleri

ALF, BE ve JG'nin tek başlarına veya kombinasyonlar halinde üç gıda patojenine karşı antimikrobiyal aktiviteleri hem mikrolaka hem de disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ALF, BE, JG ve NA'nin 2 çeşit küfe karşı antifungal özelliklerinin tespitinde de kullanılmıştır.

#### 3.7.1 Mikrolaka tekniği

Mikrolaka ile mikrobiyal büyümenin tespitinde bazı değişikliklerle DUF04 ve DİĞ.'nin (2003) yöntemi kullanılmıştır. ALF, BE ve JG'nin stok solüsyonları seri olarak seyreltilerek istenen konsantrasyonlarda solüsyonlar hazırlanmıştır. Her konsantrasyondan 100 µl, düz tabanlı 96'lı mikrolakaya (Bio-Grainer, Germany) alınmıştır. Daha sonra hazırlanan kültürler sayıları  $1 \times 10^4$  cfu/ml olacak şekilde seyreltilmiş ve bunlardan 100 µl kuyulardaki antimikrobiyal maddelerin üstüne eklenmiştir. Böylece her kuyudaki mikroorganizma sayısı esas değerinin yarısına inmiştir. Bütün testler için kontroller de hazırlanmıştır. Plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve OD değerleri 600 nm'de her 2 saatte bir Thermo Multiscan Spectra Reader (Finland) ile okunmuştur. Testlerde kullanılan maddelerin konsantrasyonları şu şekildedir:

- ALF (% (w/v)): 2, 1.5, 1.25, 1, 0.5, 0.25
- RE (% (v/v)): 30, 25, 20, 15, 10, 5
- JG (AU/ml): 4000, 3000, 2000, 1000, 500

Tek başına yapılan antimikrobiyal testlerde etkili olan antimikrobiyal maddeler daha sonra kombinasyonlar halinde yine aynı mikroorganizmalara karşı test edilmişlerdir. Testlerde kullanılan kombinasyonlar ve bu kombinasyonların konsantrasyonları Tablo 3.1'de verilmiştir.



Tablo 3.1 Antimikrobiyal maddelerin kombinasyon şeklinde kullanıldıklarında konsantrasyon aralıkları

Bakteri	Konsantrasyon	
	ALF (%)	BE (%)
<i>L. monocytogenes</i>	0,075	10
	0,05	7,5
	0,025	5
<i>S. Enteritidis</i>	0,5	20
	0,3	15
	0,1	10
<i>E. coli O157:H7</i>	0,25	20
	0,15	15
	0,1	10

### 3.7.2 Disk difüzyon tekniği

Antimikrobiyal maddelerin istenen konsantrasyonları stok solüsyonlardan seyreltme yolu ile elde edilmişlerdir. Kullanılan konsantrasyonlar aşağıdaki gibidir:

- ALF (%(w/v)): 4, 3, 2, 1.5, 1
- BE (%(v/v)): 60, 40, 30, 20, 10
- JG (AU/ml): 4000, 3000, 2000, 1000, 500

Her antimikrobiyal maddeden 20 µl, 1 cm<sup>2</sup> boyutunda kare kesilmiş ve sterilize edilmiş whatman filtre kağıdına emdirilmiş ve bu kağıt 1x10<sup>6</sup> cfu/ml yükü bulunan agarın orta kısmına yerleştirilmiştir. Bu petri kapları 24 saat süresince 37°C'de inkübe edilmiş ve kağıtların çevresinde oluşan mikroorganizma büyümeyen alanın çapı bir mikrometre (SHAN Electronic, Çin) ile ölçülmüştür (PRANOTO ve DiĞ, 2005). Ölçülen çap, kağıdın uzunluğunu da kapsamaktadır. Kontrol olarak deiyonize su emdirilmiş kağıt kullanılmıştır.

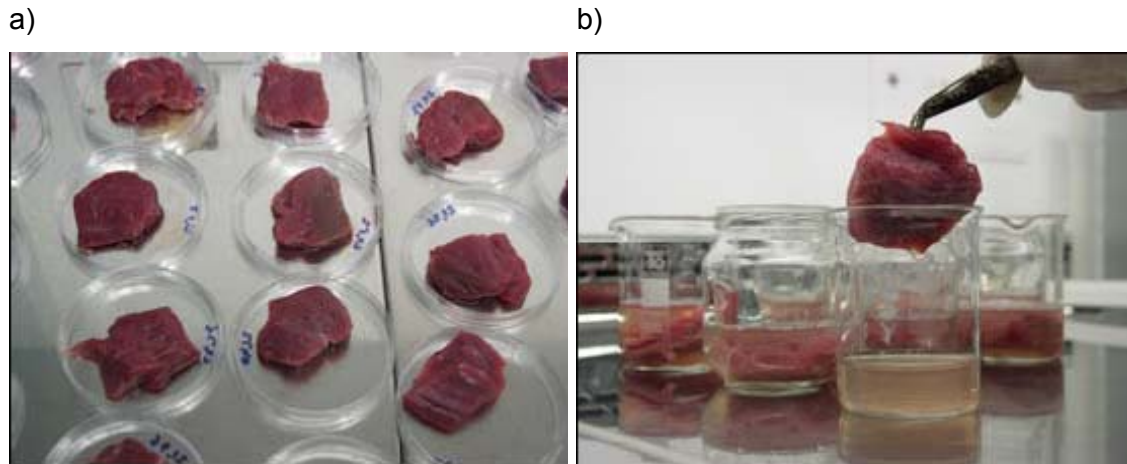
Etkili maddelerin kombinasyonlarının aktiviteleri yine aynı yöntemle tespit edilmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar: %50 BE+%2 ALF, %25 BE+%3 ALF ve %35 BE+%1 ALF'dir.

ALF, BE, JG ve NA'in *A. niger* ve *P. roquefortii*'ye karşı etkileri benzer şekilde tespit edilmiştir. ALF, BE ve JG'nin yukarıda belirtilen konsantrasyonları uygulanmıştır. NA için 250-5000 ppm aralığında aktivite testleri yapılmıştır. Kombinasyonların konsantrasyonları ise 25-2500 ppm NA + 50% BE'dir. *A. niger* için mikrobiyal yük 1x10<sup>4</sup> spore/ml iken 1x10<sup>6</sup> spore/ml yük *P. roquefortii* için kullanılmıştır. PDA agar üzerindeki *A. niger* 3 gün, *P. roquefortii* ise 6 gün inkübe edilmişlerdir. Kontrol grupları deiyonize su, %0,1 peptonlu su, gliserol, etanol ve gliserol+etanol emdirilmiş kağıtları içermektedir.

## 3.8 Gıda Uygulamaları

### 3.8.1 Bakteri inoküle edilmiş etlerin batırma uygulamaları

Antimikrobiyal batırma işleminde kullanılacak sığır filetosu ve nuar buz kalıpları içinde laboratuara getirilmiştir. Fileto herhangi bir işlem yapılmadan kullanılmıştır. Nuarın çevresinden ince bir tabaka steril bir bıçakla kesilmiş ve etin iç kısmı kullanılmıştır. Böylece etin üzerindeki mikrobiyal flora minimize edilmeye çalışılmıştır. Et, 2 cm kalınlığında 20 g'lık parçalar halinde kesilip (Şekil 3.1a) tek tek 2 dakika boyunca önce  $1 \times 10^5$  cfu/ml mikroorganizma içeren 30 ml solüsyona batırılmıştır. Daha sonra etler laminar kabin altında bakterinin yüzeye yapışmasını sağlamak amacı ile her yüzeyi 15 dakika olmak üzere bekletilmişlerdir. İnoküle edilmiş örnekler yine tek tek 30 ml antimikrobiyal solüsyon içinde 15 dakika bekletilmişlerdir (Şekil 3.1b). Testlerde iki kontrol grubu kullanılmıştır. C-1 adı verilen ilk grupta herhangi bir işlem görmemiş et örnekleri vardır. İkinci grupta (C-2) ise etler mikroorganizma ile inoküle edilmiş ve daha sonra antimikrobiyal solüsyon yerine steril deiyonize suya batırılmışlardır. Antimikrobiyal maddeye batırılmış ve kontrol et örnekleri, steril petri kaplara yerleştirilip plastik torbalar içinde *L. monocytogenes* için 4°C'de ve diğer mikroorganizmalar için 10°C buzdolabında saklanmışlardır.



Şekil 3.1 a) Batırma uygulamaları için hazırlanan etler, b) batırma uygulaması

Örnekleme işlemi 0, 3, 6 ve 9. günlerde yapılmıştır. Yaklaşık 20 g'lık et parçaları 180 ml %0,1 steril peptonlu su içinde 2 dakika stomacher ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml alınıp 9 ml %0,1 peptonlu su ile seyreltilmiş ve seyreltilmiş bu solüsyondan 0,1 ml uygun seçici besiyerinin (*L. monocytogenes* için PALCAM, *S. Enteritidis*

için XLD ve *E. coli* O157:H7 için CT-SMAC) üzerine yayılmıştır. Bakteriyal koloniler 37 °C'de görülebilir hale gelene kadar inkübe edildikten sonra sayılmıştır.

### 3.8.2 Küf inoküle edilmiş peynirlerin batırma uygulamaları

Kaşar peynirleri 2 cm çapında ve 1cm kalınlığında  $20\pm 2$ g'lık silindirler halinde steril bir bıçakla kesilmiştir (Şekil 3.2a). Peynir üzerindeki mikrobiyal yükü azaltmak için örneklerin bütün yüzeyleri 15 cm mesafedeki UV ışığı (254 nm, U.V.P., ABD) altında 10'ar dakika bekletilmiştir. Örnekler 50 ml ve  $10^5$  spore/ml küf (*P. roquefortii* ve *A. niger*) içeren solüsyona 2 dakika süre ile batırılmışlardır. İnoküle edilen peynirler bakterilerin yüzeye tutunması için laminar kabinde her bir yüzey için 15 dakika olmak üzere bekletilmişlerdir (Şekil 3.2b). Daha sonra peynirler değişik konsantrasyonlarda 50 ml NA içeren solüsyonda 15 dakika bekletilmişlerdir. Ayrıca kontrol örnekleri, peynirleri sadece distile su içine batırarak hazırlanmıştır. Bütün peynir örnekleri, steril petripler içinde plastik poşetlerde 30 gün boyunca 10°C'de buzdolabında saklanmışlardır. Örnekleme 0, 10, 20 ve 30. günlerde yapılmıştır. Peynir örnekleri 180 ml ve %0,1 steril peptonlu su içinde 2 dakika süresince bir stomacher ile homojenize edilmişlerdir. Homojenize edilmiş örnekler seri olarak %0,1 peptonlu su ile seyreltilmiştir. Bu solüsyonlardan 0,1 ml alınıp DRBC agar üzerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 30°C'de küf kolonileri görülünceye kadar inkübe edilmişlerdir.



Şekil 3.2 a) Batırma uygulamaları için hazırlanan peynirler, b) batırma uygulaması

### 3.8.3 Batırma yoluyla ete uygulanan BE'nin antioksidan etkisinin tespiti

Elde edilen biberiye ekstraktının etin saklanması sırasında antioksidan etkisi tiobarbiturik asit (TBA) testi ile belirlenmiştir (RAGHAVAN ve RICHARDS, 2007).  $20 \pm 2$  g et örneklerinin herbiri 30 ml'lik %15, 30 ve 45 konsantrasyonlarında biberiye solüsyonuna 2 dakika süreyle batırılmış ve petri kaplarına konularak buzdolabında  $8^{\circ}\text{C}$ 'de 9 gün süreyle saklanmıştır. Et örneklerinin TBA değerleri 0, 3, 6 ve 9. günlerde ölçülmüştür. Bu ölçüm için  $20 \pm 2$  g et 40 ml  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (%10, w/v) ile 90 saniye homojenize edilmiş ve 5 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Elde edilen solüsyon  $0.45 \mu\text{m}$  filtre kağıdından süzölmüş ve 2 ml filtrat ile 2 ml TBA (3 mg TBA/ml) karıştırılmıştır. Bu solüsyon,  $97^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında soğutulan solüsyonun abzorbanası 531 nm'de bir spektrofotometre ile ölçülmüştür. Sonuçlar miliextinction/g cinsinden ifade edilmiştir.

### 3.8.4 Küf inoküle edilmiş peynirlerin püskürtme uygulamaları

Peynirler 3.8.2'de açıklandığı şekilde hazırlanmış ve steril petrilere yerleştirilmiştir. Her bir dilim, yüzeylerine  $1 \times 10^5$  spor/ml konsantrasyondaki 100  $\mu\text{l}$  küf solüsyonu yayılarak inoküle edilmiştir. Kuruması ve küfün yüzeye bağlanması için örnekler 2 dakika bekletilmiştir.

Uygulanacak NA solüsyonları steril saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır. Önceden steril edilen spreyci şişeleri, steril safsu, 500, 750, 1500, 2250 ve 3000 ppm konsantrasyonundaki NA çözeltilerinden biri ile doldurulmuştur. Sprey mekanizmaları önce etanol sonra saf su püskürtme işlemi ile steril edilerek şişelere takılmıştır. İnoküle edilen peynir yüzeylerinin 15 cm yukarısından bir kez spreyleme yapılmış ve kuruma için örnekler 3 dakika bekletilmişlerdir. Her uygulama için sekizer örnek hazırlanmıştır. Ayrıca UV uygulanmamış ve uygulanmış ancak hiç bir solüsyon spreylene memiş gruplar kontrol amaçlı hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler petri kaplarına yerleştirildikten sonra kapakları kapatılıp kilitli buzdolabı poşetlerine konularak  $10^{\circ}\text{C}$  deki buzdolabında 30 gün saklanmıştır.

0, 10, 20 ve 30. günlerde saklanan örneklerden her gruptan ikişer tane olmak üzere alınmıştır. Filtreli torbaya peynir dilimi konulduktan sonra 180 ml %0,1 lik peptonlu su ilave edilerek stomacher'da 2 dakika çalkalanarak parçalanması ve küflerin suya geçmesi sağlanmıştır. Alınan sıvı örnekler gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra 100  $\mu\text{l}$ 'si DRBC agar üzerine yayılmıştır. 3-4 gün  $30^{\circ}\text{C}$  inkübatörde bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve elde edilen spor miktarların logaritması alınarak zamana karşı grafikleri çizilmiştir.

### 3.8.5 Bakteri inoküle edilmiş yüzeylerin batırma uygulamaları

2x2 cm boyutunda çelik ve tahta parçalar otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir.  $10^6$  cfu/ml konsantrasyonunda 100 µl bakteri, parçaların yüzeylerine pipet ucu ile yayılmış ve parçalar 1 saat süre ile kurutulmuştur. Daha sonra %10, 20, 30 ve 45 konsantrasyonunda 100 µl BE aynı yüzeylere yayılmış ve kuruma için 40-50 dakika beklenmiştir. Kontrol olarak peptonlu suya batırılmış ve herhangi bir sıvıya batırılmamış örnekler de hazırlanmıştır. Örnekler, tek tek 100 ml'lik şişelerdeki 20 ml LB içine steril bir pense ile konulmuşlardır. Ayrıca herhangi bir yüzey örneği yerine sadece 100 µl bakteri solüsyonu da 20 ml LB içeren başka bir şişeye kontrol olarak eklenmiştir. Şişeler çalkalamalı inkübatörde 15 dakika karıştırılmış ve daha sonra 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Her saat her şişeden 200 µl örnek alınarak 96'lı mikropalakaya konulmuş ve örneklerin 600 nm'de OD'leri tespit edilmiştir. Kontrol olarak 200 µl LB kullanılmıştır.

### 3.9 Biyopolimerlerin Hazırlanması

#### 3.9.1 Metil selüloz (MS) filmlerin hazırlanması

MS film hazırlama prosedürü literatürden (TURHAN ve SAHBAZ, 2004) bazı değişikliklerle uygulanmıştır. 3 g MS etanolde çözüldükten sonra karışıma 50 ml deiyonize su ilave edilmiştir. 50 ml etanol eklendikten sonra karışım homojenize edilmiştir. Plastikleştirici olarak gliserol ilave edildikten sonra film solüsyonu (fs) 80°C ye kadar ısıtılmıştır. 10 g fs petrilere yayılmış ve 30°C'de 2 gün kurutulmuştur. Filmlerin kalınlıkları (mm) 10 farklı bölgeden alınan ölçümlerin ortalaması olarak hesaplanmıştır.

#### 3.9.2 Gluten (G) filmlerin hazırlanması

G filmler, POCHAT-BOHATIER ve DiĞ. (2006) tarafından geliştirilen prosedürde bir takım değişikliklerle yapılarak hazırlanmıştır. 15 g G, 31,5 ml saf etanolde karıştırılarak çözülmüştür. Daha sonra 0,03 g sodyum sülfid, 3 g gliserol ve 63 ml deiyonize su bu karışıma eklenmiş ve manyetik karıştırıcı ile yaklaşık 10 dakika karıştırılmıştır. Fs'nun pH'sı asetik asit ile 4'e ayarlanmıştır. Daha sonra karıştırılan solüsyon 70°C'ye kadar ısıtılmıştır. 10 g fs 8,5 cm çapındaki petri kaplarına yayılmış ve 30°C'de kurutulmuştur.

### 3.9.3 Antimikrobiyal maddelerin filmlere katılması

ALF, NA ve BE, fs'na değişik konsantrasyonlarda eklenmiştir. Yüksek sıcaklık antimikrobiyal maddelerin bozulmasına neden olabileceğinden bütün maddeler fs'na 50 – 55°C'ye soğutulduktan sonra ilave edilmişlerdir. Toz halindeki ALF ve NA, fs petriye yayılmadan önce eklenmiş ve karıştırılmışlardır. Kullanılan ALF konsantrasyonları, 0,03, 0,05 ve 0,07 g ALF/10 g fs' dir. Eklenen NA ile elde edilen karışımların NA konsantrasyon aralığı ise 0,2-40 mg/10 g fs'dir. BE içeren polimerler ise fs'nda bulunan etanol ve suyun bir kısmının ekstrakt ile değiştirilmesi şeklinde hazırlanmıştır. Kullanılan kombinasyonlar ALF+BE ve NA+BE içeren polimerlerdir.

### 3.10 Biyopolimerlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Biyopolimerlerin antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesinde 3.7.2'de açıklanan disk difüzyon tekniği kullanılmıştır. Filmler 1cmx1cm kareler halinde kesilmiş ve mikroorganizma inoküle edilmiş agar içeren petrilerin ortasına yerleştirilmişlerdir. Herhangi bir antimikrobiyal madde içermeyen G ve MS filmler kontrol olarak kullanılmışlardır.

### 3.11 Biyopolimerlerin Karakterizasyonu

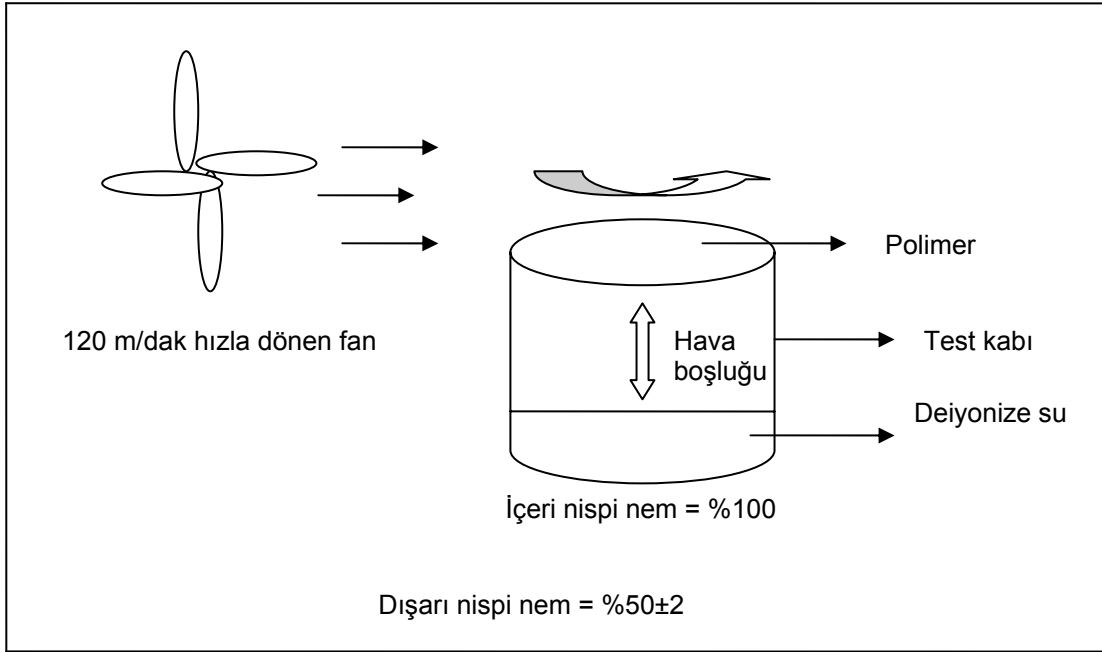
Bütün analizlerden önce filmler, doymuş MgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile %50 nispi nemin sağlandığı desikatörlerde 2 gün bekletilmiştir.

#### 3.11.1 Mekanik özellikler

Gerilme mukavemeti (GM), elastikiyet modülü (EM) ve % kopma noktası (KN) mekanik test aleti (AG-I 250 kN, Shimadzu, Japan) ile ASTM D882 (1996) metoduna göre belirlenmiştir. Bunun için filmler 25 mm x 100 mm ölçüsünde kesilmiş ve desikatörde 48 saat süreyle %50 nemde şartlandırılmıştır. Başlangıç pençe uzaklığı 50 mm ve piston hızı 50 mm/dak olarak ayarlanmıştır. Kuvvet ve uzama değerleri kaydedilmiş ve GM, EM ve KN gerilme-uzama grafiğinden hesaplanmıştır. GM filmi koparmak için gerekli maksimum yükü kesit alana bölerek hesaplanmıştır. KN kopma anındaki film uzunluğunun başlangıçtaki uzunluğuna oranının yüzde olarak ifadesidir. EM ise gerilme-uzama grafiğinde ilk lineer kısmın eğimidir. Her film için en az 6 örnek test edilmiştir.

### 3.11.2 Su buharı geçirgenliği

Su geçirgenliğinin belirlenmesinde Mc HUGH ve DİĞ.'nin (1993) metodu kullanılmıştır. Kullanılan sistem Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Bu yöntemde su ile doldurulmuş cam şişelerin üzeri biyopolimerler ile kapatılmış ve %50 neme ayarlanmış desikatörlere yerleştirilmiştir. Desikatörler 25<sup>0</sup>C'de tutulmuştur. Cam şişelerin kapak kısmının alanı 17,34 cm<sup>2</sup> ve şişelerin derinliği de 7 cm'dir. Şişedeki su ile polimer arasında 1,4 cm boşluk vardır. 2m/sn hızda çalışan fanlar desikatörün içine yerleştirilmiştir ve fan hızı bir anemometre ile ölçülmüştür (Turbo Meter, ABD). Kararlı dengeye 2 saat içinde ulaşılmış ve her şişenin ağırlığı 2 saat aralıklarla en az 5 kere ölçülmüştür. Her polimer ile en az üç ölçüm yapılmıştır. Su buharı geçirgenliği Mc HUGH ve DİĞ. (1993) tarafından belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 3.3 Su buharı geçirgenliği ölçüm sistemi

Su buharı geçirgenlik oranı (SBGO) aşağıda verilen 1. eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (ASTM E96, 1980). Ağırlık kaybının zamana karşı çizilen grafiğinin regresyon analizi yapılmış ve bütün korelasyon katsayıları 0,99 ve daha üstü olarak bulunmuştur.

$$SBGO = \frac{Egim}{FilmAlanı} \quad (1)$$

eğim ağırlık kaybına karşı zaman grafiğinden elde edilmiştir.

SBGO düzeltme metoduna göre 2. eşitlik filmin iç yüzeyinde düzeltilmiş su buharı kısmi basıncının ( $p_2$ ) hesaplanmasını sağlar.

$$SBGO = \frac{P * D * \ln\left[\frac{(P - p_2)}{(P - p_1)}\right]}{R * T * Z} \quad (2)$$

P = toplam basınç, D = suyun 25°C'de havadaki difüzyon hızı, R = gaz sabiti, Z = hava boşluğu mesafesi,  $p_1$  = solüsyon yüzeyinde su buharı kısmi basıncı,  $p_2$  = filmin iç yüzeyinde düzeltilmiş kısmi su buharı basıncı.

$p_2$ 'nin hesaplanmasından sonra

$$\frac{SBG}{\text{kalınlık}} = \frac{SBGO}{p_2 - p_3} \quad (3)$$

$p_3$  = filmin dış yüzeyinde su buharı kısmi basıncı

### 3.11.2 Yüzey görüntüleri

Taramalı elektron mikroskopunda kesit resimlerinin elde edilmesi için filmler 100 - 200 Å kalınlığında altın bir tabaka ile kaplanmış ve filmlerin kesitleri İYTE Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan Phillips XL-30S FEG elektron mikroskobu ile taranmıştır.

### 3.12 Biyopolimerlerin Gıda Uygulamaları

NA içeren biyopolimerlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilmiş *A. niger* ve *P.roquefortii*'ye karşı antifungal etkileri belirlenmiştir. Kaşar peynirleri 2 cm çapında ve 1 cm kalınlığında 20±2g'lık silindirler halinde steril bir bıçakla kesilmiştir. Peynir örneklerinin yüzeyleri örnekten 15 cm uzağa yerleştirilmiş UV ışığına (254 nm) 10 dakika süresince maruz bırakılmışlardır. Daha sonra örnekler 10<sup>5</sup> spores/ml *A. niger* veya *P. roquefortii* içeren solüsyona 2 dakika süre ile batırılmıştır. Örnekler laminar kabin altında her yüzey 15 dakika olmak üzere bakterinin tutunmasına fırsat tanımak için bekletilmiştir. Daha sonra örnekler antimikrobiyal madde içeren ve içermeyen G ve MS filmlere sarılmıştır. Bu örnekler petri kaplarına yerleştirilip plastik torbalar içinde 10°C'de buzdolabında 30 gün süre ile saklanmıştır. Hazırlanan örnekler şu şekildedir:



1. herhangi bir işleme tabi tutulmamış örnek
2. UV ışığına maruz bırakılan örnek
3. UV ışığına maruz bırakılmış ve inoküle edilmiş
4. UV + inoküle edilme + antimikrobiyal içermeyen film
5. herhangi bir işleme tabi tutulmamış örnek + antimikrobiyal içermeyen film
6. UV + inoküle edilme + antimikrobiyal içeren film

Hazırlanan peynir örnekleri 0, 10, 20 ve 30. günlerde mikrobiyolojik olarak analiz edilmişlerdir. Bunun için filmler, peynirlerden steril bir pens ile ayrılmış ve 180 ml peptonlu (%0,1) suyun içinde stomacher (BagMixer, Fransa) ile 230 rpm'de 2 dakika süresince homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek yine peptonlu su ile seyreltilmiş ve DRBC agar üzerine yayılmıştır. Petriler 30 °C'de 2 gün süresince inkübe edildikten sonra sayım yapılmıştır.

### 3.13 Antimikrobiyal Maddelerin Biyopolimerlerden Salınımı

Değişik konsantrasyonlarda NA içeren biyopolimerlerden salınım, saklama süresince kaşar peynirinde NA miktarı tespit edilerek izlenmiştir. NA'ın peynirdeki miktarı ISO 9233 (2007) metodu kullanılarak belirlenmiştir.

Kaşar peyniri 3.12'de açıklandığı şekilde hazırlanıp paketlenmiş ve yine aynı şekilde buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra belirli aralıklarla peynir örnekleri alınarak paket malzemesi olarak kullanılan polimerlerden ayrılmıştır. Peynirlerde NA'ın belirlenebilmesi için önce ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 20 g peynir, 200 ml metanol ile 90 dakika karıştırılmıştır ve daha sonra 100 ml su eklenmiştir. Bu karışım -20°C'de 60 dakika dondurulmuş ve soğuk ekstrakt kaba filtre kağıdından süzülmüştür. Oda sıcaklığına getirilen ekstrakt bu sefer 0,45 µm filtre kağıdından geçirilmiştir. Daha sonra bu ekstraktın konsantrasyonu HPLC analizi ile belirlenmiştir. HPLC koşulları aşağıda listelenmiştir:

Kolon: C8

Detektör: DAD

Enjeksiyon: 20 µl loop, 1ml/dak akış hızı

Mobil faz: metanol:su:asetik asit (60:40:5)

Kalibrasyon için 107 ppm stok solüsyonundan 3,6594, 2,8462, 2,033, 0,8132, 0,4066 ve 0,04066 ppm solüsyonlar hazırlanmıştır.

### 3.14 İstatistiksel Analiz

Antimikrobiyal maddelerin beraber kullanıldığı antimikrobiyal aktivite testlerinde 3 seviyeli tam faktöriyel deneme deseni kullanılmıştır. Bu desende 3 merkez noktası vardır ve

her seviye için 3 replika yapılmıştır. Deneme deseninin oluşturulması ve istatistiksel analizi MODDE (v.7, Umetrics, İsveç) yazılımı ile yapılmıştır. Faktörler antimikrobiyal maddelerin konsantrasyonlarıdır. Bu konsantrasyonlar tekli antimikrobiyal aktivite testlerinde elde edilen sonuçlara göre mikroorganizmanın tipine göre farklılıklar göstermektedir. Tepki değerleri ise 12, 16 ve 24. saatlerde elde edilen OD değerleridir. Her kombinasyon için toplam 48 deneme yapılmıştır.

Diğer veriler MINITAB yazılımında varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Ortalamalar, Fisher en küçük fark yöntemi ile  $p=0.5$  'de karşılaştırılmıştır.

#### 4. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada gıdalarda kullanılma potansiyeline sahip bazı maddelerin (ALF, BE, JG ve NA), önce tek başlarına daha sonra ise kombinasyonlar halinde antimikrobiyal özellikleri patojenik bakterilere (*E. coli* 0157:H7, *S. Enteritidis* ve *L. monocytogenes*) ve küflere (*A. niger* ve *P. roquefortii*) karşı hem mikropkaka hem de disk difüzyon tekniği ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkiye sahip maddeler ve kombinasyonları belirlenen konsantrasyonlarda et ve peynir üzerine batırma/püskürtme yolu ile uygulanmışlardır. Et uygulamalarında antibakteriyal maddeler, peynir uygulamalarında ise antifungal maddeler kullanılmıştır. Ayrıca bu maddeler biyopolimerler içine katılarak antimikrobiyal özelliği olan gıda paket malzemeleri elde edilmiştir. Antimikrobiyal maddelerin polimerlerden salınım profilleri belirlenmiş ve bu maddelerin, biyopolimerlerin fiziksel özellikleri üzerine etkileri de araştırılmıştır.

Antimikrobiyal aktivitenin tespitinde çok değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada bunlardan en çok tercih edilenleri olan mikropkaka ve disk difüzyon yöntemleri uygulanmıştır. Mikropkaka yönteminde aktif maddenin aktivitesi solüsyon içinde test edilirken, disk difüzyon tekniğinde katı bir yüzeye emdirilen maddenin salınımı yoluyla antimikrobiyal etki gösterme özelliği ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle ilk yöntem batırma ve püskürtme gibi uygulamalarda kullanılacak maddelerin aktivitesinin belirlenmesi için daha uygun görünürken disk difüzyon tekniği ise paket malzemelerine içine eklenen maddelerin aktivitelerinin tespiti için kullanılabilir.

Çalışmanın sonuçlarını daha ayrıntılı bir şekilde incelemeye başlamadan önce projeye başlandığında kullanılan ilk mikroorganizmaların Refik Saydam Hıfzısıhha Mekezinden temin edilmiş olan kültürlerden (*Escherichia coli* ATCC35218/2003/RSKK No 03018; *Listeria monocytogenes* tip1 NCTC 2167/1996/RSKK No 96001; *Salmonella enteritidis* Koch enst/RSKK No 92) olduğunu belirtmek isteriz. Bu mikroorganizmalar kullanılarak yapılan antimikrobiyal aktivite tayinlerinin sonunda bu kültürlerin eskimesi nedeni ile sağlıklı sonuçlar alınamamaya başlanmış ve aynı kültürler yine Refik Saydam Hıfzısıhha

Merkezinden temin edilmiştir. Ancak yeni alınan kültürlerin büyüme eğrilerinin öncekiler ile örtüşmemesi üzerine kültürler üzerinde Gram boyama ve mikroskop incelemesi yapılmıştır. Bu incelemeler sonucu *L. monocytogenes* olarak temin edilen mikroorganizmanın Gram (+) basil olması gerekirken Gram (+) kok olduğu tesbit edilmiş ve durum Hıfzısıhhaya bildirilmiştir. Bu kurumdan kültürlerin karışmış olduğu şekilde bir cevap alınmıştır. O tarihte Hıfzısıhhanın internet sayfasında bu mikroorganizma, NCTC 2167 kimliği ile bildirilmekteydi. Ancak NCTC'nin internet sayfasından yapılan araştırma sonucu bu mikroorganizmanın aslında *Streptococcus vestibularis* olduğu görülmüştür. Durum Hıfzısıhhaya bir dilekçe ile bildirilmiş olmasına rağmen tarafımıza herhangi bir cevap verilmemiştir. Bu durumda kullandığımız diğer mikroorganizmalar üzerine de daha ayrıntılı bir araştırma yapılmış ve patojen olduğu belirtilen *E. coli*'nin de patojen olmadığı saptanmıştır. Bu durumdan dolayı NCTC'den doğrudan bu mikroorganizmalar yeniden temin edilmek zorunda kalınmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri NCTC'den elde edilen kültürlerle tekrarlanmıştır. Aşağıda bakteriler ile ilgili sunulan sonuçların hepsi sonradan temin edilen NCTC kültürleri kullanılarak elde edilmiştir.

#### 4.1 ALF, BE ve JG'nin Mikroplaka Yöntemi ile Belirlenen Antimikrobiyal Aktiviteleri

Bu çalışmada antimikrobiyal maddelerin minimum etkin konsantrasyonu (MIC), 24 saat sonunda 37°C'de inkübasyon süresince bakterilerin büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

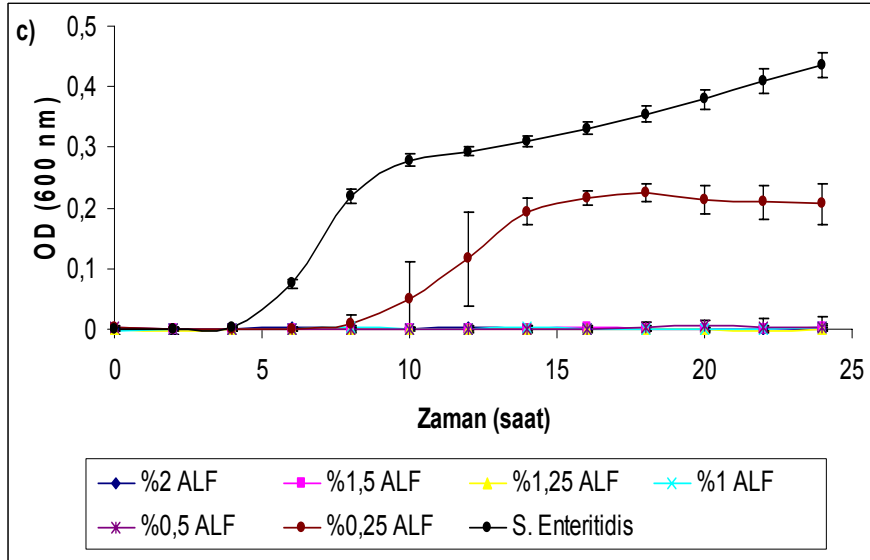
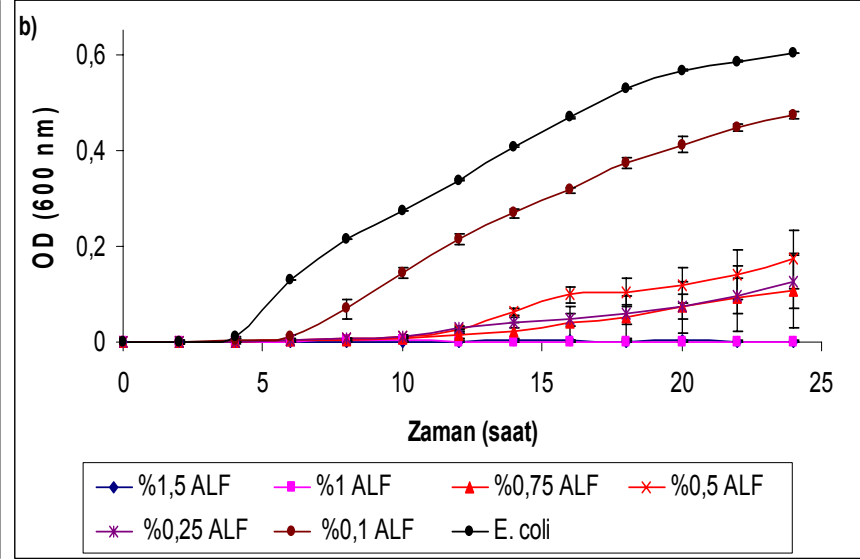
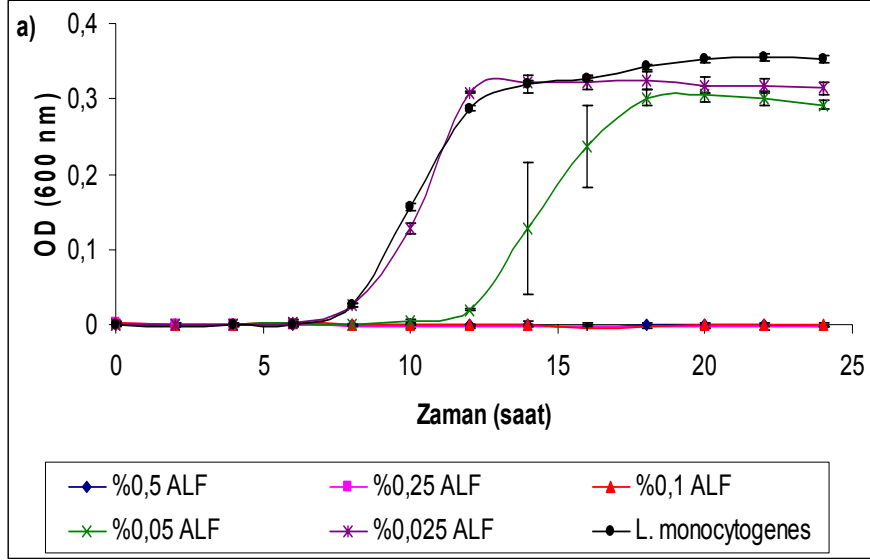
##### 4.1.1 ALF

ALF'nin üç patojenik mikroorganizmaya karşı etkileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Sadece %0,05 ALF, *L. monocytogenes*' in lag süresini uzatmak için yeterliyken, *S. Enteritidis* için bu konsantrasyon %0,25'dir. %0,25-0,75 ALF'e maruz bırakılmış *E. coli* O157:H7'nin büyümesinde önemli oranda bir düşüş gözlenmiştir. ALF'nin MIC değerleri *L. monocytogenes* için %0,1, *S. Enteritidis* için %0,5 ve *E. coli* O157:H7 için %1 olarak belirlenmiştir. Literatürde *E. coli* O157:H7 için ALF'nin MIC değeri bu çalışmada olduğu gibi %1 olarak belirlenmiştir (NAIDU, 2002). Bu üç mikroorganizma içinde en düşük MIC değeri *L. monocytogenes* için tespit edilmiştir. *L. monocytogenes*, gram (+) bir bakteri iken diğer iki mikroorganizma gram (-) bakterilerdir. ALF'nin mikroorganizmalar üzerine etki mekanizmasının hücre membranı ile ilgili olduğu bilinmektedir (NAIDU ve DİĞ., 2003). MIC değerleri arasındaki bu farklılığın hücre membranı yapısından kaynaklandığı düşünülebilir.

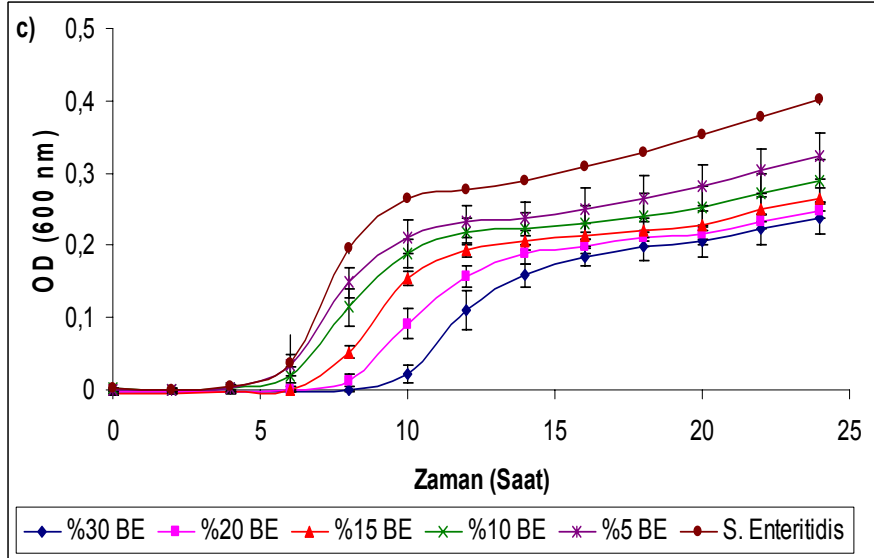
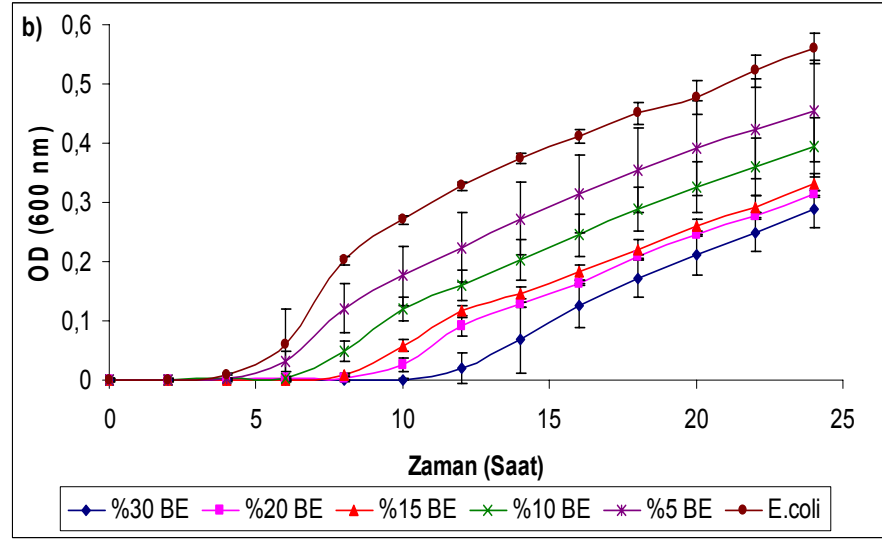
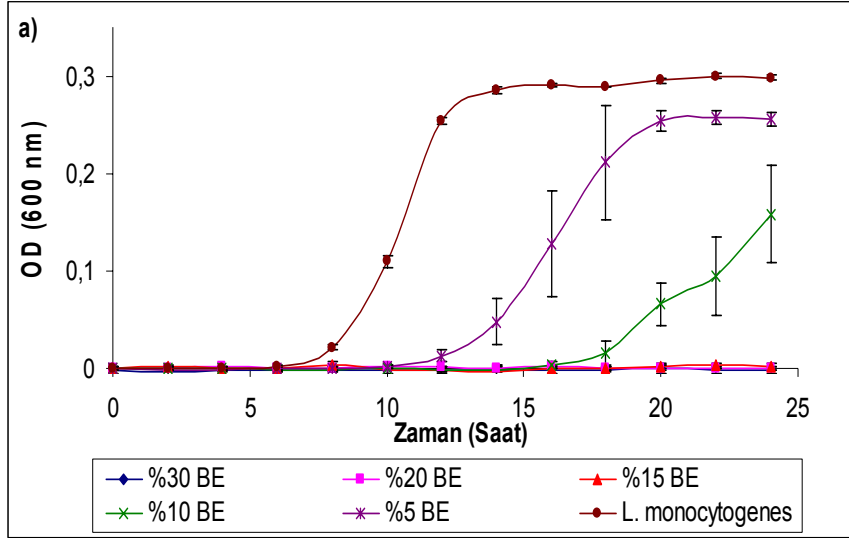
#### 4.1.2 BE

Şekil 4.2 çeşitli konsantrasyonlarda BE'nin bu çalışmada kullanılan üç patojenik mikroorganizma üzerine etkilerini göstermektedir. %5-30 konsantrasyon aralığında BE, *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis*'in büyümesini tamamen engelleyememiştir. Ancak BE'nin yüksek konsantrasyonları bu mikroorganizmaların lag sürelerini uzatmış ve sayılarını düşürmüştür. BE'nin *L. monocytogenes* için MIC değeri %15 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca %10 konsantrasyonunda BE'ı da *L. monocytogenes* büyümesini önemli ölçüde önlemiştir.

BE'ı eldesinde değişik yöntemler ve çözücüler kullanılmaktadır (COWAN, 1999). Buna bağlı olarak elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri de çok farklı olabilmektedir (CERVENKA ve DİĞ., 2006). Literatürdeki bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir (CELİKTAS ve DİĞ., 2005). Bahsedilen çalışmada biberiyenin metanol ekstraktları *S. aureus* dışında bir çok mikroorganizmanın büyümesini engelleyememiştir.



Şekil 4.1 ALF'nin a) *L. monocytogenes*, b) *E. coli* O157:H7 ve c) *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi



Şekil 4.2 BE'nin a) *L. monocytogenes*, b) *E. coli* O157:H7 ve c) *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi

#### 4.1.3 JG

JG, üç patojenik mikroorganizmaya karşı etki göstermemiştir (Şekil 4.3). JG, sadece yüksek konsantrasyonda (4000 AU/ml) *L. monocytogenes*'in büyümesinde az bir düşüşe neden olmuştur. Bu bakteriyosinin, *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis* sayılarında artışa bile neden olduğu görülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda, JG'nin bazı patojenler üzerindeki etkisi mikroorganizmalar strese maruz bırakıldıktan sonra test edilmiştir. JG, ısıya maruz bırakılmış mikroorganizmalara uygulandığında en çok etkilenen mikroorganizmalar *L. monocytogenes* ve *S. aureus* olmuştur (BAKER ve DİĞ., 2004). Başka bir çalışmada ise *A. niger*, *Penicillium* spp., *E. coli*, *E. coli* O:24 B:17, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*, JG'den etkilenmemişlerdir. (GRINSTEAD ve BAREFOOT, 1992).

Bu çalışmada test edilen ALF, BE ve JG'nin antimikrobiyal etkilerinin konsantrasyonla değişimini gösteren Tukey analiz sonuçları Tablo 4.1'de sunulmuştur. Bütün ANOVA analizleri  $P > 0.05$ 'de önemli bulunmuştur.

#### 4.1.4 Kombinasyon halinde kullanılan aktif maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri

Tek başına yapılan antimikrobiyal testlerin ve ön çalışmaların sonucu olarak, ALF ve BE beraber kullanılacak antibakteriyel maddeler olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon aralığı MIC ve onun altındaki değerler olarak seçilmiştir. Böylece kombinasyon halinde kullanımın MIC değerlerinde herhangi bir düşüşe neden olup olmadığı gözlenebilmiştir (Şekil 4.4). Ayrıca, ALF+BE konsantrasyonları mikroorganizmaya bağlı olarak belirlenmiştir ve kombinasyonların seviyelerinin tespitinde 3 seviyeli tam faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Tasarımda faktörler ALF ve BE konsantrasyonları, tepkiler ise 12., 18. ve 24. saatlerdeki OD değerleridir. Sonuçlar MODDE (Umetrics, İsveç) yazılımı ile analiz edilmiştir. Her tepki için geliştirilen kayda değer modellerde hangi faktörlerin önemli olduğu belirlenmiştir. Tahmin grafikleri faktörlerden biri sabit tutularak diğerine karşı modelle tahmin edilen tepki değerleri (12., 18. ve 24. saat OD değerleri) çizilerek oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Tahmin grafikleri tepkilerin faktörle değişiminin görsel olarak daha iyi şekilde ifade edilmesine yardımcı olur.

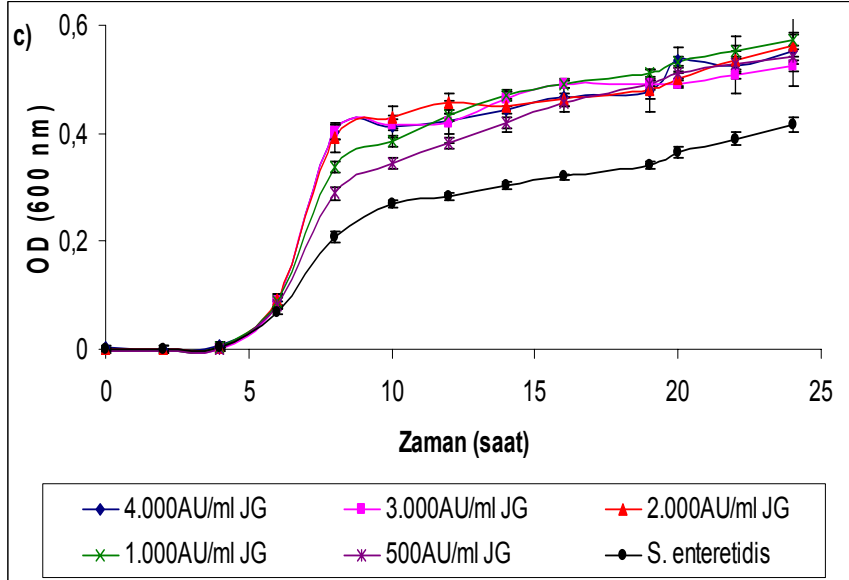
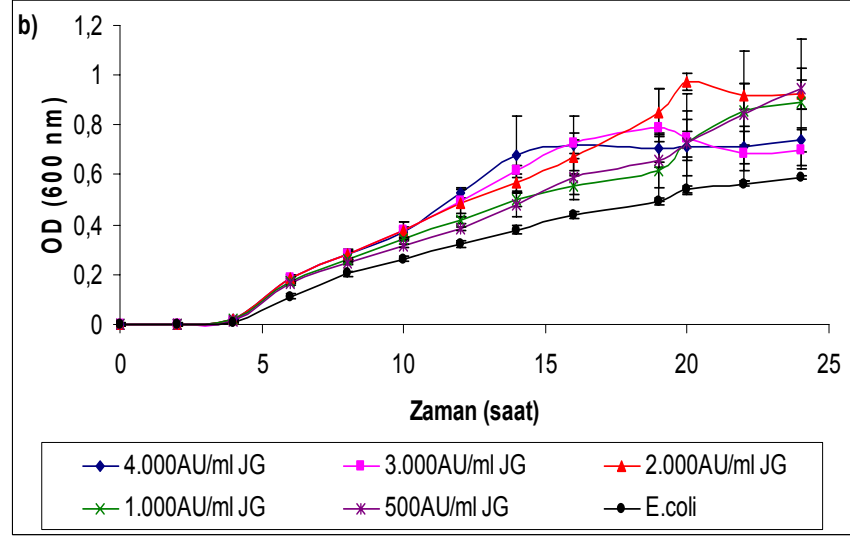
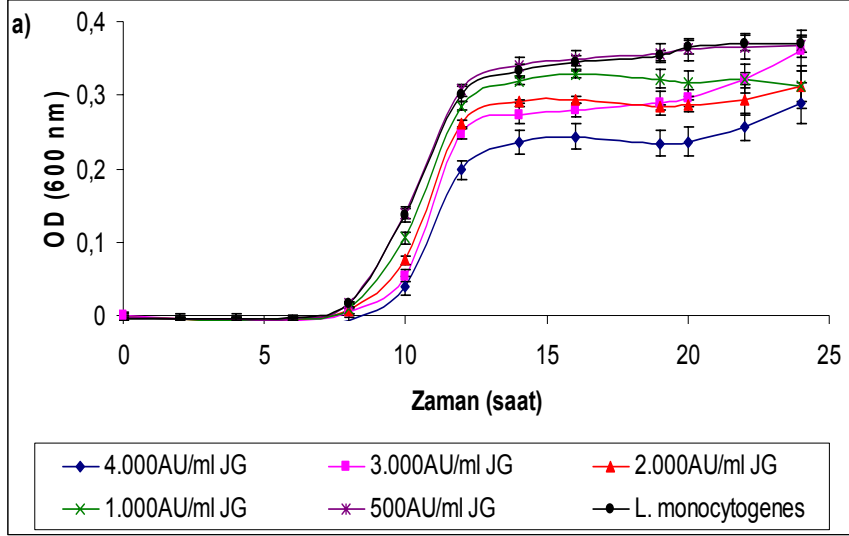
ALF ve BE beraber *E. coli* O157:H7'ye karşı kullanıldıklarında sinerjistik bir etki gözlenmiştir. Ancak *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*'e karşı bu maddeler arasında bir etkileşime rastlanmamıştır. Tek başına kullanıldığında ALF'nin *E. coli* O157:H7 için MIC değeri %1 olarak tespit edilmişti. Ancak, %0,3 ve %0,5 ALF, %10, 15 ve 20 BE ile kullanıldığında bu mikroorganizmanın büyümesini durdurmuştur. %0,1 ALF kullanıldığında ise büyümenin durması BE konsantrasyonuna bağlıdır (Şekil 4.4b). Yapılan istatistiksel

analizler sonucu elde edilen modeller önemlidir ve bu modeller ile elde edilen tahmin grafikleri Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre ALF konsantrasyonu 12., 18. ve 24. saatlerde önemli bir faktördür ve grafiğin eğiminden de görülebileceği üzere önemi de zamanla artmaktadır (Şekil 4.35b). BE ise 12. ve 18. saatlerde önemli bir faktör olmasına rağmen önemi zamanla azalmaktadır. Yine aynı grafik ALF konsantrasyonunun E. coli sayısını azaltmada BE'na göre daha etkili olduğunu göstermektedir.

*L. monocytogenes*'e karşı kullanılan ALF+BE için MIC değeri bulunamamıştır. Ancak, yüksek ALF konsantrasyonlarına (%0,05-0,075) maruz bırakılan *L. monocytogenes* sayısında önemli ölçüde düşüş kaydedilmiştir (Şekil 4.4a). Bu mikroorganizma için geliştirilen modeller de önemlidir ve tahmin grafikleri Şekil 4.5'de sunulmuştur. ALF ve BE konsantrasyonları 24 saat boyunca önemli faktörlerdir ve BE'nin önemi de zamanla artmaktadır.

*S. enteritidis* verilerinin analizi ile geliştirilen istatistiksel modeller de önemlidir. Tahmin grafiklerinde de görüleceği gibi ALF ve BE 24 saat boyunca önemli faktörlerdir. Hiç bir kombinasyon bu mikroorganizma üzerinde öldürücü etki göstermemiştir.



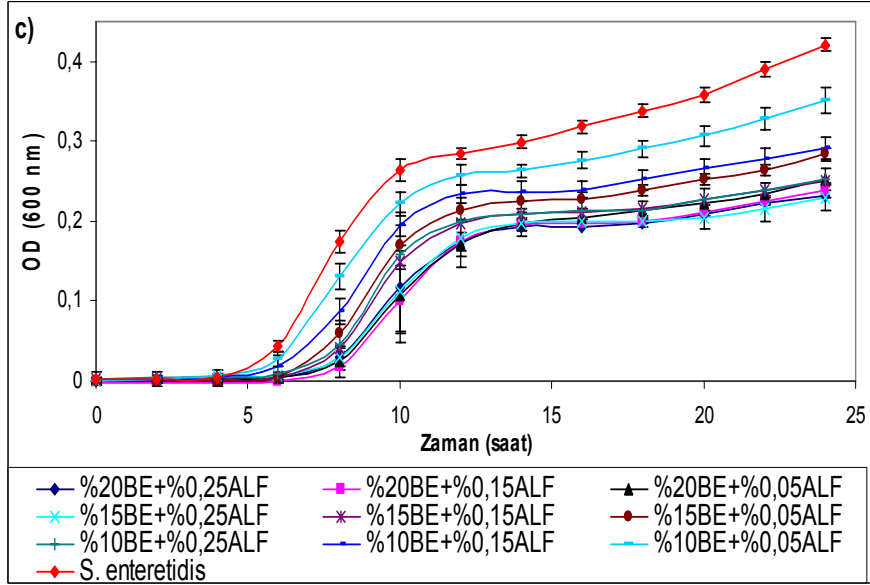
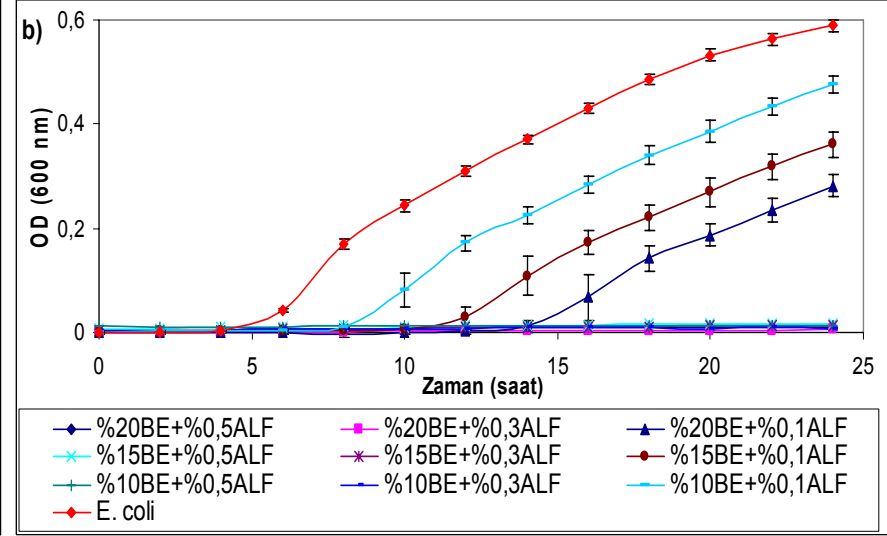
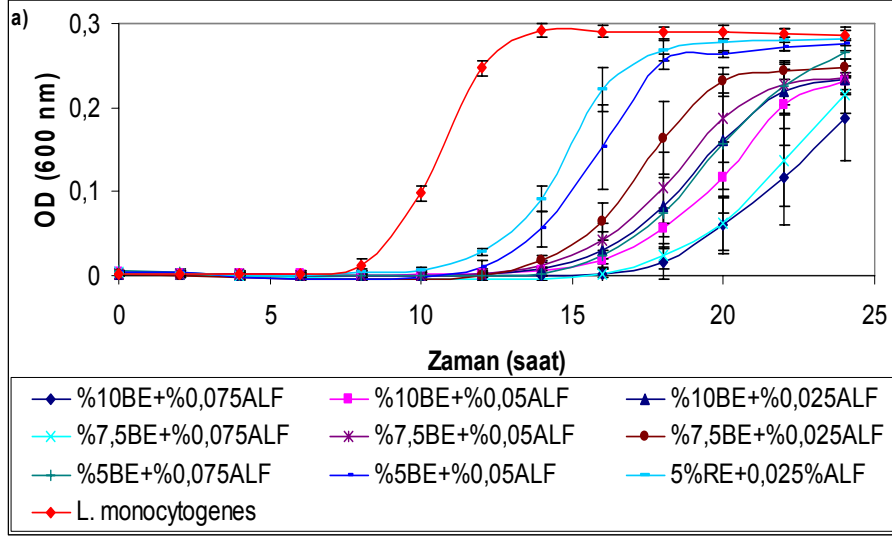


Şekil 4.3 JG'nin a) *L. monocytogenes*, b) *E. coli* O157:H7 ve c) *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi

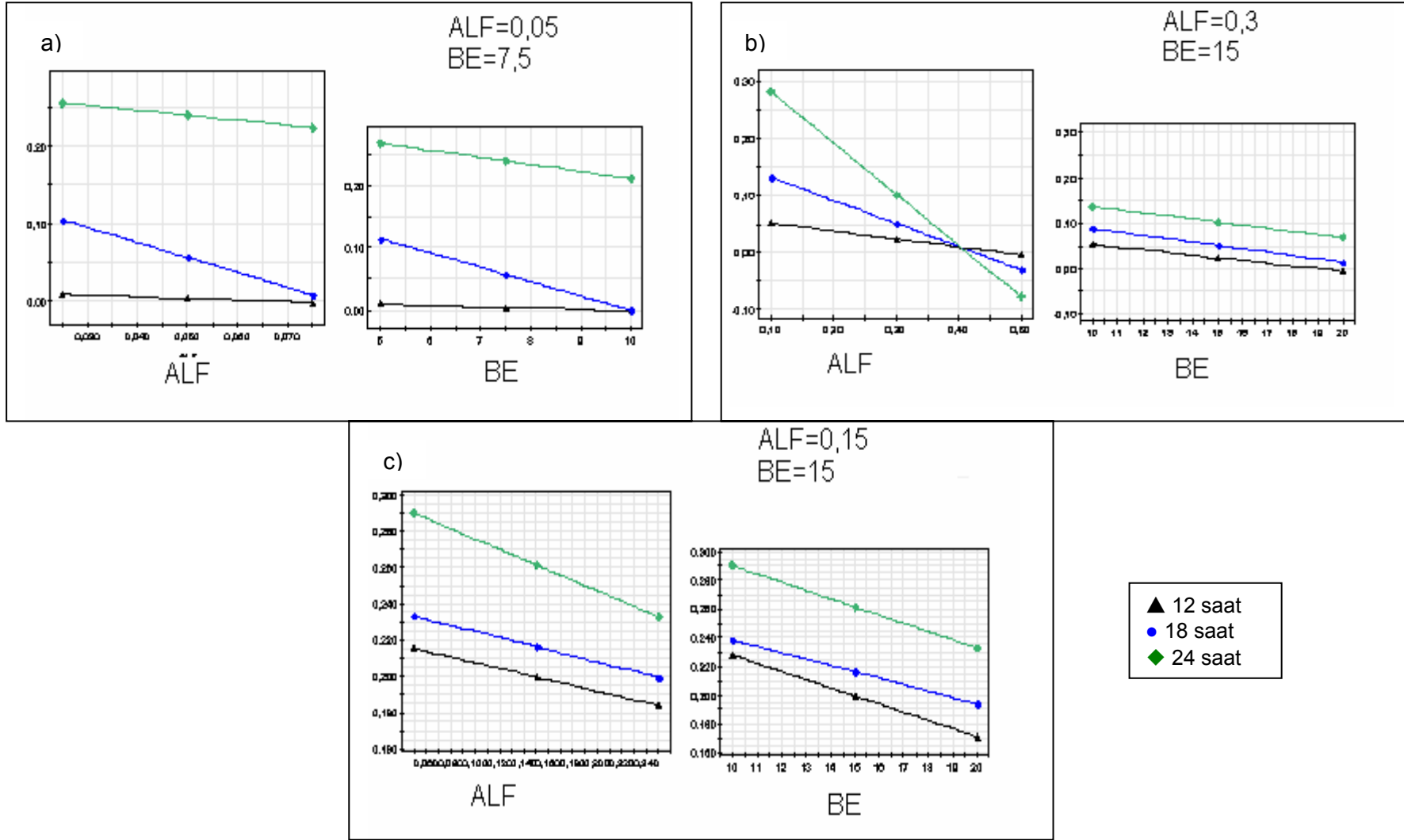
Tablo 4.1 ALF, BE ve JG'nin üç mikroorganizma üzerinde 12, 18 ve 24. saatlerdeki antimikrobiyal etkilerine göre değişik konsantrasyonlarda farklılıklarının Tukey analiz ile elde edilen sonuçları

<i>Listeria monocytogenes</i>								
ALF (%)			BE (%)			JG (AU/ml)		
12s	18s	24s	12s	18s	24s	12s	18s	24s
0,5 <sup>ab</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	4000 <sup>a</sup>	4000 <sup>a</sup>	4000 <sup>a</sup>
0,25 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	3000 <sup>b</sup>	3000 <sup>b</sup>	3000 <sup>bc</sup>
0,1 <sup>b</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a*</sup>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	15 <sup>a*</sup>	2000 <sup>b</sup>	2000 <sup>b</sup>	2000 <sup>ab</sup>
0,05 <sup>c</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	1000 <sup>c</sup>	1000 <sup>c</sup>	1000 <sup>ab</sup>
0,025 <sup>d</sup>	0,025 <sup>c</sup>	0,025 <sup>c</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>c</sup>	500 <sup>d</sup>	500 <sup>d</sup>	500 <sup>c</sup>
0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>cd</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7								
ALF (%)			BE (%)			JG (AU/ml)		
12s	18s	24s	12s	18s	24s	12s	18s	24s
1,5 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	4000 <sup>a</sup>	4000 <sup>abc</sup>	4000 <sup>ab</sup>
1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a*</sup>	20 <sup>b</sup>	20 <sup>ab</sup>	20 <sup>ab</sup>	3000 <sup>a</sup>	3000 <sup>ab</sup>	3000 <sup>ab</sup>
0,75 <sup>ab</sup>	0,75 <sup>ab</sup>	0,75 <sup>b</sup>	15 <sup>bc</sup>	15 <sup>ab</sup>	15 <sup>ab</sup>	2000 <sup>ab</sup>	2000 <sup>a</sup>	2000 <sup>a</sup>
0,5 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	10 <sup>cd</sup>	10 <sup>bc</sup>	10 <sup>bc</sup>	1000 <sup>bc</sup>	1000 <sup>bc</sup>	1000 <sup>a</sup>
0,25 <sup>b</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>b</sup>	5 <sup>d</sup>	5 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	500 <sup>cd</sup>	500 <sup>abc</sup>	500 <sup>a</sup>
0,1 <sup>c</sup>	0,1 <sup>c</sup>	0,1 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis								
ALF (%)			BE (%)			JG (AU/ml)		
12s	18s	24s	12s	18s	24s	12s	18s	24s
2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	4000 <sup>ab</sup>	4000 <sup>a</sup>	4000 <sup>a</sup>
1,5 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	20 <sup>a</sup>	20 <sup>ab</sup>	3000 <sup>ab</sup>	3000 <sup>a</sup>	3000 <sup>a</sup>
1,25 <sup>a</sup>	1,25 <sup>a</sup>	1,25 <sup>a</sup>	15 <sup>bc</sup>	15 <sup>ab</sup>	15 <sup>ab</sup>	2000 <sup>a</sup>	2000 <sup>a</sup>	2000 <sup>a</sup>
1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	10 <sup>cd</sup>	10 <sup>ab</sup>	10 <sup>bc</sup>	1000 <sup>a</sup>	1000 <sup>a</sup>	1000 <sup>a</sup>
0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a*</sup>	5 <sup>d</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>c</sup>	500 <sup>b</sup>	500 <sup>a</sup>	500 <sup>a</sup>
0,25 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-

<sup>a-d</sup> aynı harfler istatistiksel olarak değişik ALF, BE ve JG seviyeleri arasında P>0,05'de fark olmadığını gösterir, \* 24. saat MIC değerleri



Şekil 4.4 ALF+BE'nin a) *L. monocytogenes*, b) *E. coli* O157:H7 ve c) *S. Enteritidis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi



Şekil 4.5 a) *L. monocytogenes*, b) *E. coli* O157:H7 and c) *S. Enteritidis* için tahmin grafikleri (Bütün grafiklerde y-ekseni OD değerlerini göstermektedir).

## 4.2 Aktif Maddelerin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenen Antimikrobiyal Aktiviteleri

### 4.2.1 ALF, BE ve JG'nin antibakteriyal özellikleri

Disk difüzyon tekniği uygulandığında üç aktif madde için çalışılan konsantrasyon aralıklarının (ALF: %4, 3, 2, 1,5, 1; BE: %60, 40, 30, 20, 10; JG: 4000, 3000, 2000, 1000, 500 AU/ml) hiçbiri *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis*'e karşı herhangi bir etki göstermemişlerdir. Başka bir deyişle bu bileşiklerin emdirildiği disklerin çevresinde mikroorganizmaların büyümediği bir bölge görülmemiştir.

ALF'nin BE ile kombinasyonlarında da (%25 BE + %3 ALF, %35 BE + %1 ALF, %50 BE+ %2 ALF) yine aynı mikroorganizmalara karşı engelleyici bir etkiye rastlanmamıştır. Mikroplaka yönteminde görüldüğü üzere tek başına kullanıldığında dahi ALF her üç mikroorganizmaya karşı güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahiptir. Ancak disk difüzyon tekniğinde mikroplaka tekniğinin iki katı kadar yüksek konsantrasyonda dahi herhangi bir antibakteriyal aktivite gözlenmemiştir. Bunun nedeni ALF'nin yüksek molekül ağırlığı olabilir. ALF, laktoferrinin büyük bir molekül olan glikozaminoglikan substratına immobilizasyonu ile elde edilmektedir (NAIDU, 2002). Disk difüzyon tekniği sadece antimikrobiyal maddenin gücüne değil aynı zamanda onun katı bir ortamdan salınımına ve yine katı bir ortamda difüzyonuna da bağlıdır. Büyük bir molekül olan ALF'nin bu tür uygulamalar için çok uygun olmadığı görülmektedir.

### 4.2.2 NA, BE, ALF ve JG'nin antifungal özellikleri

Süt ürünlerinin bozulmasında önemli rol oynayan *A. niger* ve *P. roquefortii*'ye karşı önceki bölümde kullanılan ALF, BE ve JG'nin yanısıra NA'nin de antifungal özellikleri test edilmiştir. Küflere karşı antimikrobiyal aktivitenin tespitinde mikroplaka yöntemi oluşan miseller nedeni ile başarılı sonuçlar vermemektedir. Dolayısı ile sadece disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Tablo 4.2'de değişik konsantrasyonlarda NA'nin *A. niger* and *P. roquefortii*'nin büyümesi üzerine etkileri gösterilmiştir. 750 ile 5000 ppm arasında NA içeren kağıt diskler etrafında *A. niger*'a karşı çapı 1,5-3,98 cm arasında değişen büyümeyi engelleyici bölgeler oluşmuştur. Bu mesafe aynı konsantrasyonlarda *P. roquefortii* için 3,02-5,32 cm'dir. NA'nin *A. niger* ve *P. roquefortii* için MIC değerleri 750 ppm'dir. *P. roquefortii*'nin agar üzerindeki mikrobiyal yükü *A. niger*' a göre daha fazla olmasına rağmen MIC değeri bu küfler için

aynıdır. Artan NA konsantrasyonu ile büyümenin önlendiği bölge çapı da artmıştır (Şekil 4.6). Tipik olarak büyümenin önlendiği bölgeler ve kontrol örneklerinin görünümü Şekil 4.7'deki gibidir.

Belirlenen MIC değeri literatürde belirtilen değerden daha yüksektir (STARK, 2003). Ancak bahsedilen çalışmada anifungal aktivite NA solüsyonunu doğrudan agar üzerine yayarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada kullandığımız ticari NA, %50 NA ve %50 laktoz içermektedir. Bahsedilen aynı çalışmada birim yüzey alana etki eden NA konsantrasyonu 0,01-0,02 mg/cm<sup>2</sup> olarak ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda belirlenen MIC değeri de bu şekilde ifade edildiğinde 0,015 mg/cm<sup>2</sup> olup bildirilen aralıktadır.

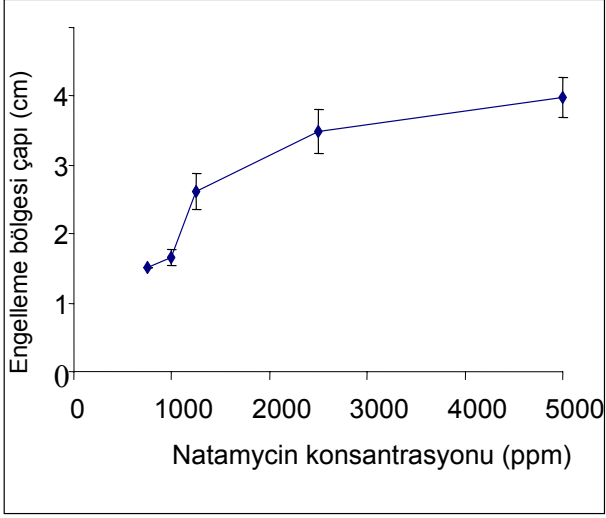
NA küflere karşı oldukça etkili olmasına rağmen ALF, BE ve JG, *A. niger* and *P. roquefortii*'ye karşı herhangi bir etki göstermemişlerdir. Çeşitli bitki ekstraktlarının küf ve mayalara karşı etkileri değişik çalışmalara konu olmuştur (VÍUDA-MARTOS ve DİĞ., 2007; ABDEL-HAFEZ ve EL-SAID, 1997). Bu çalışmalardan bazılarında çeşitli bitki ekstraktlarının antifungal etkileri olduğu belirlenmiştir. Ancak aktivite, pH gibi ortam koşullarına oldukça bağlıdır ve bitkilerin ekstraksiyon prosedürleri de farklılıklar göstermektedir (DEL CAMPO ve DİĞ., 2000).

Tablo 4.2 Değişik konsantrasyonlarda NA ile *A. niger* ve *P. roquefortii*'ye karşı uygulanan disk difüzyon testinin sonuçları

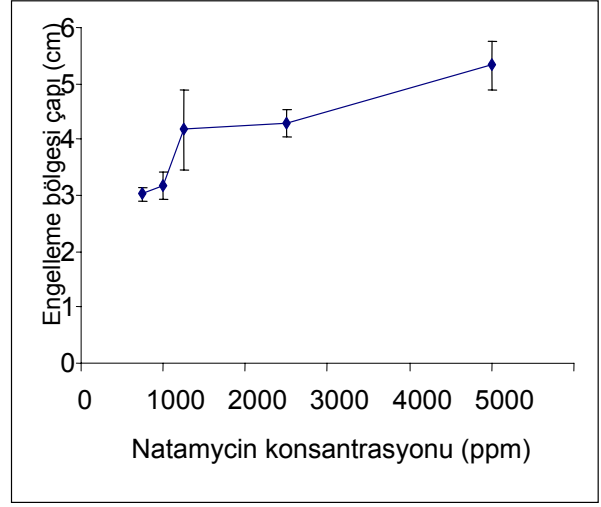
NA konsantrasyonu (ppm (mg/cm <sup>2</sup> ))	Büyümenin engellendiği bölgenin çapı (cm)	
	<i>A. niger</i>	<i>P. roquefortii</i>
0 (0)	+	+
250 (0,005)	+	+
500 (0,01)	+	+
750 (0,015)	1,5±0,0 <sup>a</sup>	3,02±0,11 <sup>a</sup>
1000 (0,02)	1,66±0,12 <sup>a</sup>	3,18±0,24 <sup>a</sup>
1250 (0,025)	2,62±0,27 <sup>b</sup>	4,17±0,72 <sup>b</sup>
2500 (0,05)	3,49±0,32 <sup>c</sup>	4,30±0,24 <sup>b</sup>
5000 (0,1)	3,98±0,3 <sup>d</sup>	5,32±0,43 <sup>c</sup>

+ büyüme engellenemedi, <sup>a-d</sup> aynı harfler NA seviyeleri arasında yarattıkları etki açısından P>0,05'de istatistiksel bir fark olmadığını gösterir

a)



b)



Şekil 4.6 Disk difüzyon tekniğine göre engelleme bölgesi çapının NA konsantrasyonu ile değişimi ( a) *A. niger*, b) *P. roquefortii*)

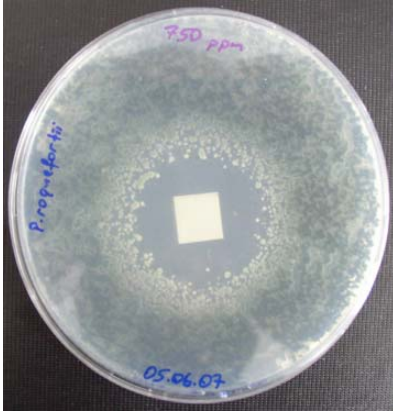
a)



b)



c)



d)



Şekil 4.7 a) 5000 ppm NA içeren kağıt diskin *A. niger* üzerine etkisi b) *A. niger* için kontrol örneği c) 750 ppm NA içeren kağıt diskin *P. roquefortii* üzerine etkisi d) *P. roquefortii* için kontrol örneği

Çalışmanın buraya kadar olan kısmı yani değişik doğal maddelerin mikrop laka ve difüzyon yöntemleri ile tespit edilen antimikrobiyal etkileri aşağıdaki tabloda (Tablo 4.3) özetlenmiştir. Bu tablo çalışmanın geri kalan kısmında bir referans görevi görmüştür.



Tablo 4.3 Mikroplaka ve disk difüzyon tekniği ile antimikrobiyal özellikleri gıda kaynaklı patojenlere ve küflere karşı test edilen doğal antimikrobislerin etkinlikleri ve MIC değerleri

Mikroorganizma	Mikroplaka yöntemi				Disk difüzyon yöntemi			
	JG (AU/ml)	BE (%)	ALF (%)	NA (ppm)	JG (AU/ml)	BE (%)	ALF (%)	NA (ppm)
<i>L. monocytogenes</i>	Büyümeyi azalttı	15	0,1	Uygulanmadı	Etki yok	Etki yok	Etki yok	Uygulanmadı
<i>S. Enteritidis</i>	Büyümeyi artırdı	Büyümeyi azalttı	1	Uygulanmadı	Etki yok	Etki yok	Etki yok	Uygulanmadı
<i>E. coli</i> O157:H7	Büyümeyi artırdı	Büyümeyi azalttı	0,5	Uygulanmadı	Etki yok	Etki yok	Etki yok	Uygulanmadı
<i>A. niger</i>	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Etki yok	Etki yok	Etki yok	750
<i>P. roquefortii</i>	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Etki yok	Etki yok	Etki yok	750

## 4.3 Antimikrobiyal Maddelerin Gıda Uygulamaları

### 4.3.1 Etler için batırma uygulamaları

Çalışmanın bu kısmında batırma işleminde kullanılan et örneğinin hazırlanmasının oldukça önemli olduğu görülmüştür. Kombinadan temin edilen etin üzerinde çok sayıda *Salmonella* ve *E. coli* bulunduğu tespit edilmiştir. Et örneklerinde hayvanın derisinden kaynaklanan *Salmonella* kontaminasyonu kaçınılmazdır. Kullanılan et yüzeyi belirli mikroorganizmalarla inoküle edildiğinden et yüzeyindeki doğal mikrofloranın yok edilmesi ya da et yüzeyinde hiç bakteri bulunmaması gerekmektedir. Bu amaçla değişik et tipleri ve işlemler denenmiştir. Bu işlemler:

1. eti bir kez alkole (% 30, 40, 50, 60, 70 ve 100, 2 dakika) batırıp daha sonra
  - a. doğrudan kullanma
  - b. suya batırma
  - c. yakma
2. eti alkole batırmak daha sonra ateşe tutup yeniden alkole batırmak
3. etin yüzeyinin 2 cm çevresinden kesilip sadece iç kısmı ile çalışılması

İlk yöntem %100 alkol konsantrasyonu dışında yüzeydeki mikrobiyal büyümeyi önleyememiştir. %100 alkol ise sadece yüzeydeki florayı değil büyütülmek istenen mikroorganizmanın da büyümesini engellemiştir. İkinci yöntemde ise et yüzeyi oldukça kuru bir hale geldiğinden yine istenen mikroorganizmanın büyümesini engellemiştir. Üçüncü yöntem mikroorganizma olmayan bir yüzeyle çalışılmasını sağlayabilmiştir. Ayrıca iki çeşit etle (bonfile ve nuar) çalışılmış ve nuarın daha uygun olduğu görülmüştür.

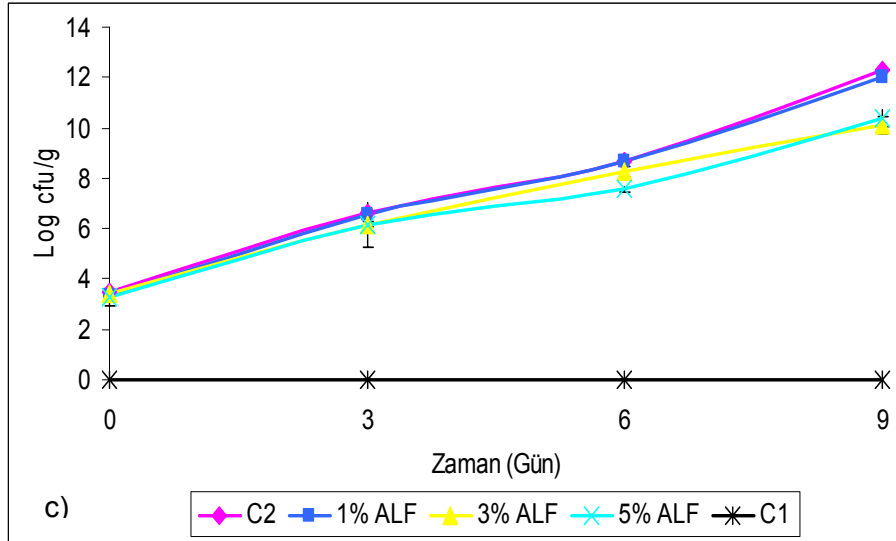
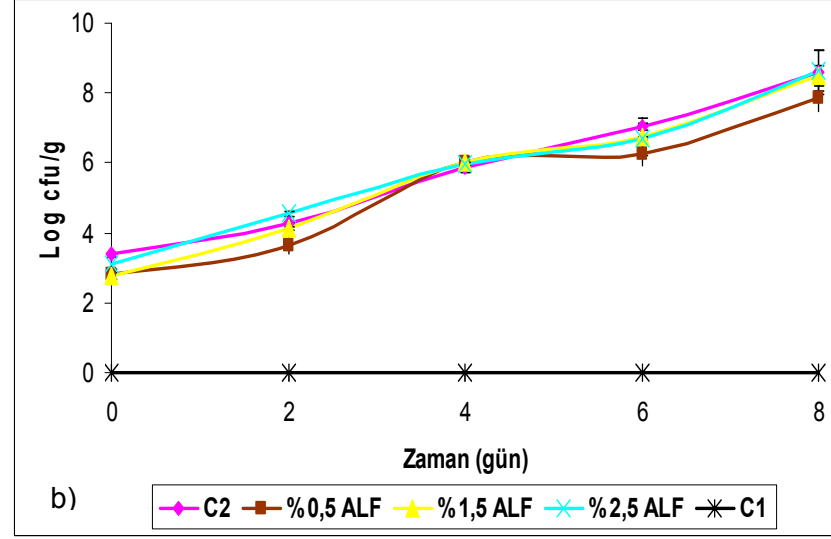
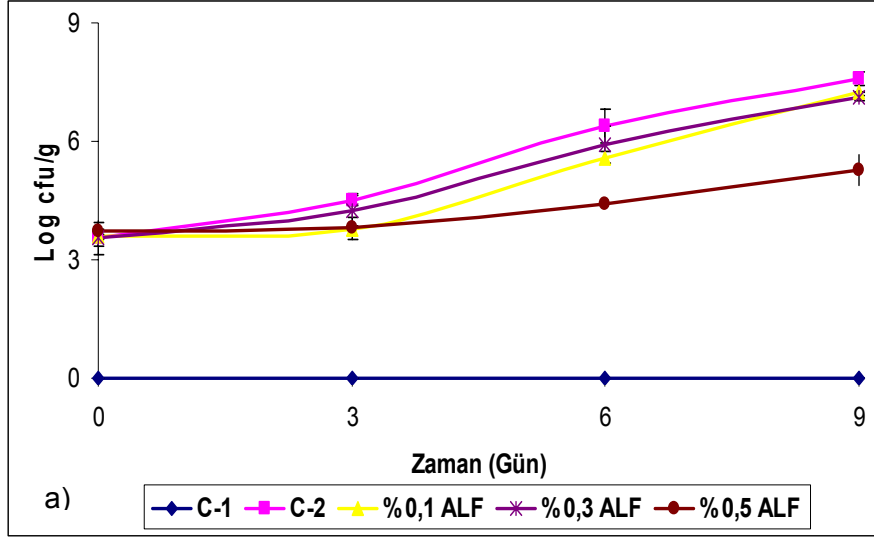
Bu çalışmada kullanılan üç patojenik mikroorganizma ile inoküle edilmiş etlerin değişik konsantrasyonlarda ALF solüsyonuna batırılmasının mikrobiyal yük üzerine etkisi Şekil 4.8'de sunulmuştur. Tek başına kullanıldığında %0,5 ALF, *L. monocytogenes* sayısını 2 log düşürmüştür (Şekil 4.8a). %0,1 ve 0,3 konsantrasyonları bu mikroorganizma üzerinde herhangi engelleyici bir etkiye sahip değildir. %0,5-1,5 ALF konsantrasyon aralığında *S. Enteritidis* sayısında herhangi bir düşüş görülmemiştir. Ancak, ALF'nin en yüksek konsantrasyonu olan %2,5 bu mikroorganizmanın sayısını 0,8 log kadar düşürebilmiştir. %1 seviyesinde bir etki görülmemesine rağmen %3 ve 5 ALF, yüzeyine *E. coli* O157:H7 inoküle edilmiş ette 9 gün sonunda 2 log düşüş sağlamıştır.

Et yüzeyindeki mikrobiyal yükü düşürmek için ALF'nin besiyeri koşullarındaki MIC değerlerinin 3-5 katı gerekmiştir. Başka bir çalışmada da çay ağacından elde edilen yağ için gerçek gıda uygulamalarında MIC değerinin 2-4 katı konsantrasyon etkili olmuştur (MOREIRA ve DİĞ., 2005). Genel olarak antimikrobiyal bileşikler gıda maddeleriyle

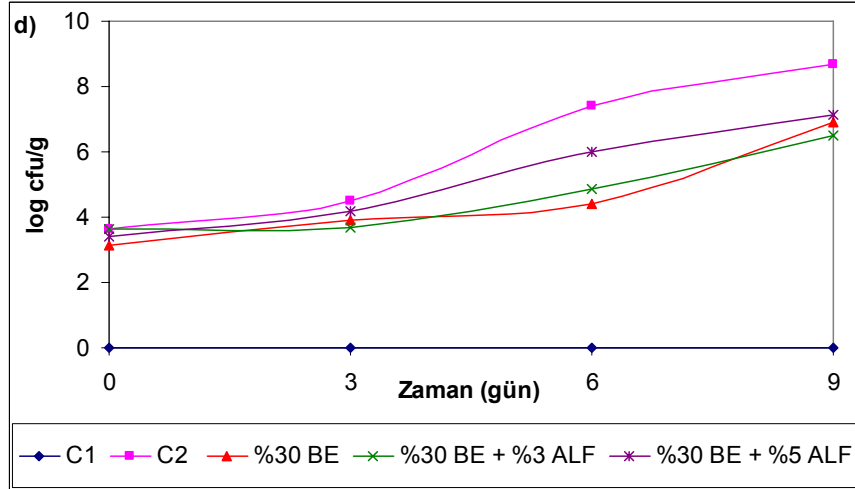
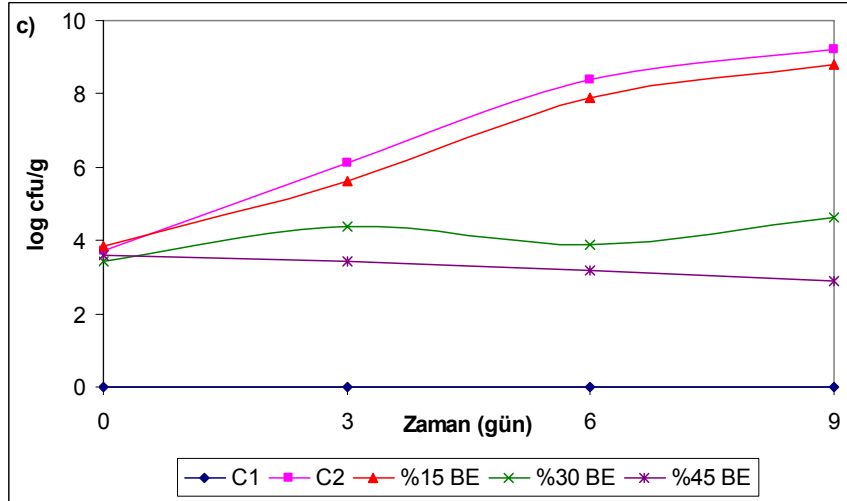
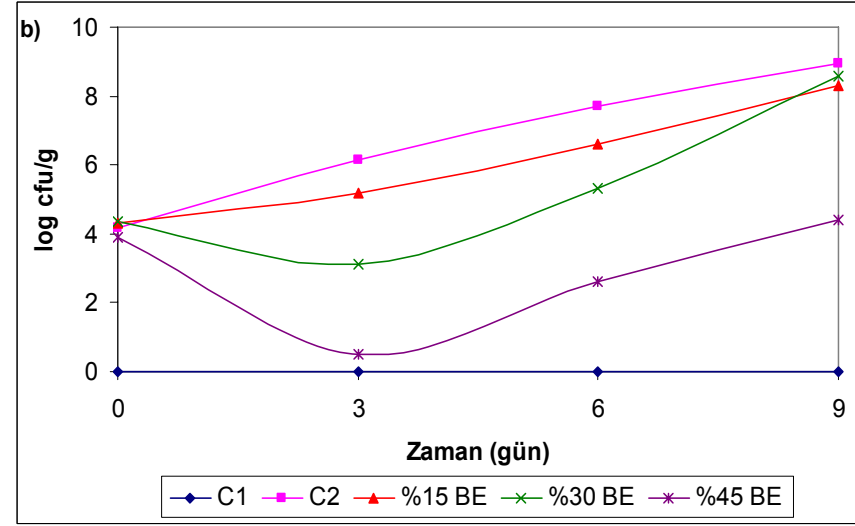
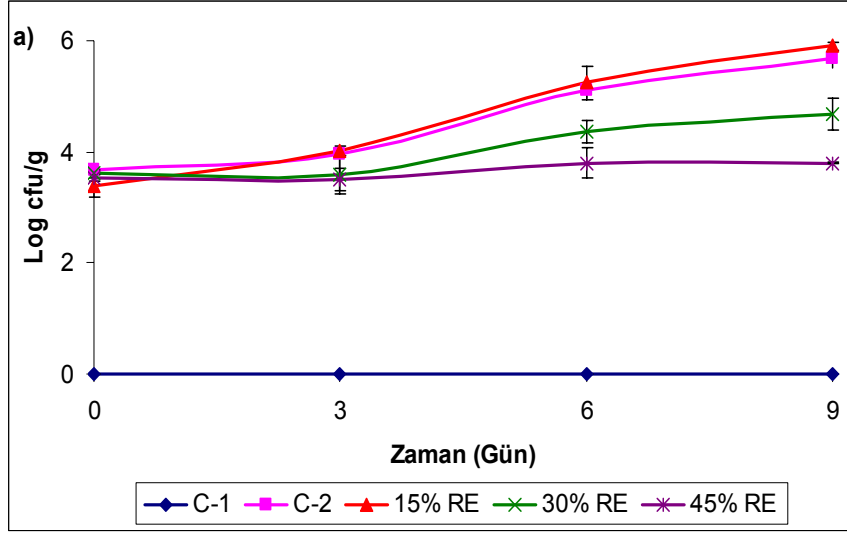
etkileşimlerinden veya gıdaların sert yüzeylerine yeterince yayılmamaları gibi nedenlerden dolayı antimikrobiyal etkilerinde zayıflama görülmesi mümkündür (MOREIRA ve DİĞ., 2005, CEYLAN ve FUNG, 2004, DAWSON ve DİĞ., 2002). Ancak, yüksek konsantrasyonların kullanımı gıdaların duyuşsal özelliklerinde sorunlara yol açabilir.

Şekil 4.9, BE'nin üç patojenik bakteri üzerindeki etkilerini göstermektedir. %30 konsantrasyonunda BE, *L. monocytogenes* sayısında 1 log düşüşe neden olmuştur ve %45 seviyesinde BE mikrobiyal çoğalmayı durdurmuştur. BE %15 seviyesinde ise aynı mikroorganizmanın büyümesini engelleyemiştir. *E. coli* O157:H7 için ise BE hem %30 hem de %45 seviyelerinde büyümeyi engellemiştir. %45 BE solüsyonu et yüzeyindeki *S. Enteritidis* sayısını kontrol örneklere göre 9 gün sonunda 4,5 log düşürmüştür. %15-30 seviyelerinde ise bu bakteriye karşı herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Bu iki solüsyon et yüzeyindeki *E. coli* O157:H7'ye karşı beraber kullanıldıklarında, BE veya ALF tek başına kullanıldığında görülen etkiden daha fazlası gözlenmemiştir (Şekil 4.9d). Dolayısı ile bu iki madde et üzerinde beraber kullanıldıklarında sinerjistik bir etkileşim olmamıştır.



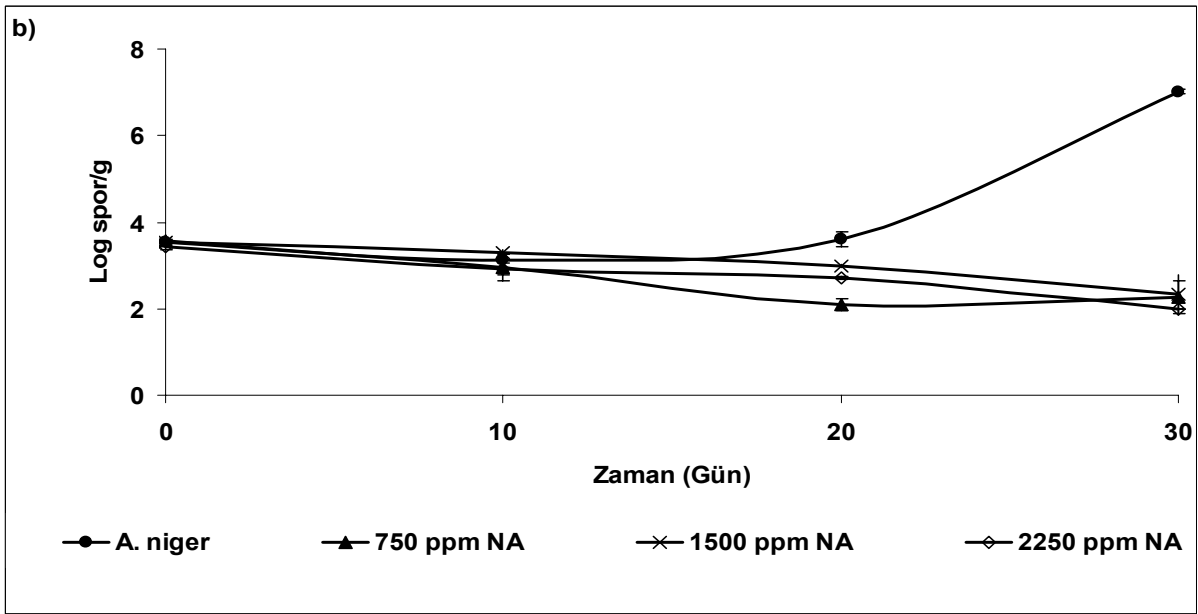
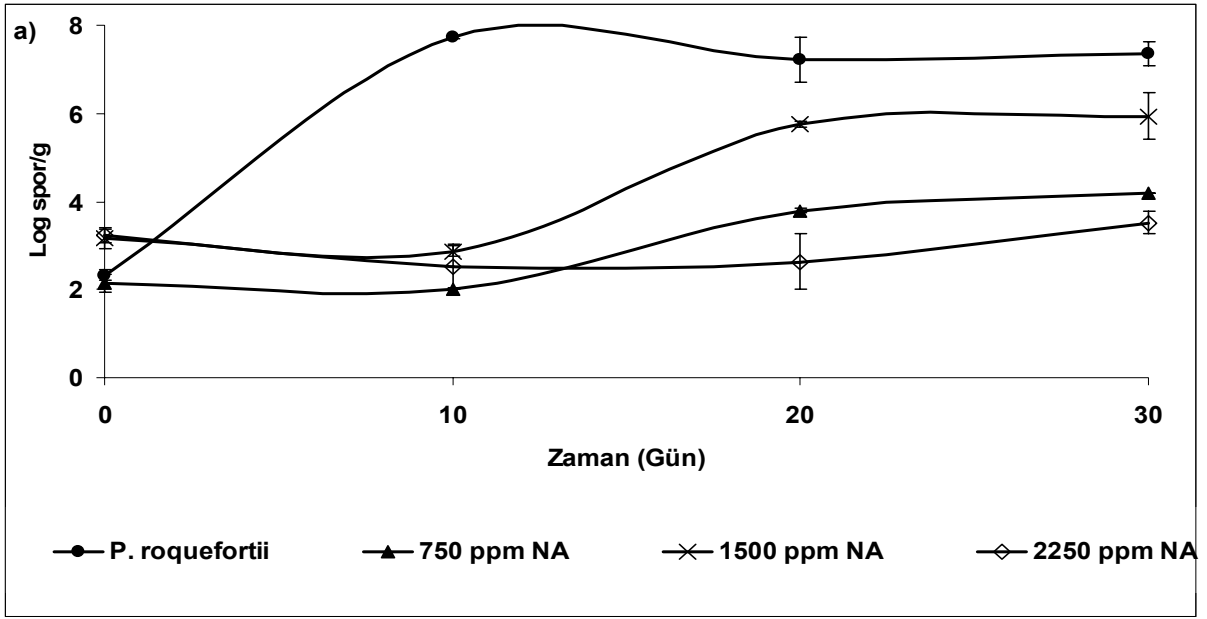
Şekil 4.8 Batırma yolu ile ALF uygulamasının et yüzeyindeki a) *L. monocytogenes*, b) *S. enteritidis* ve c) *E. coli* O157:H7'e etkisi



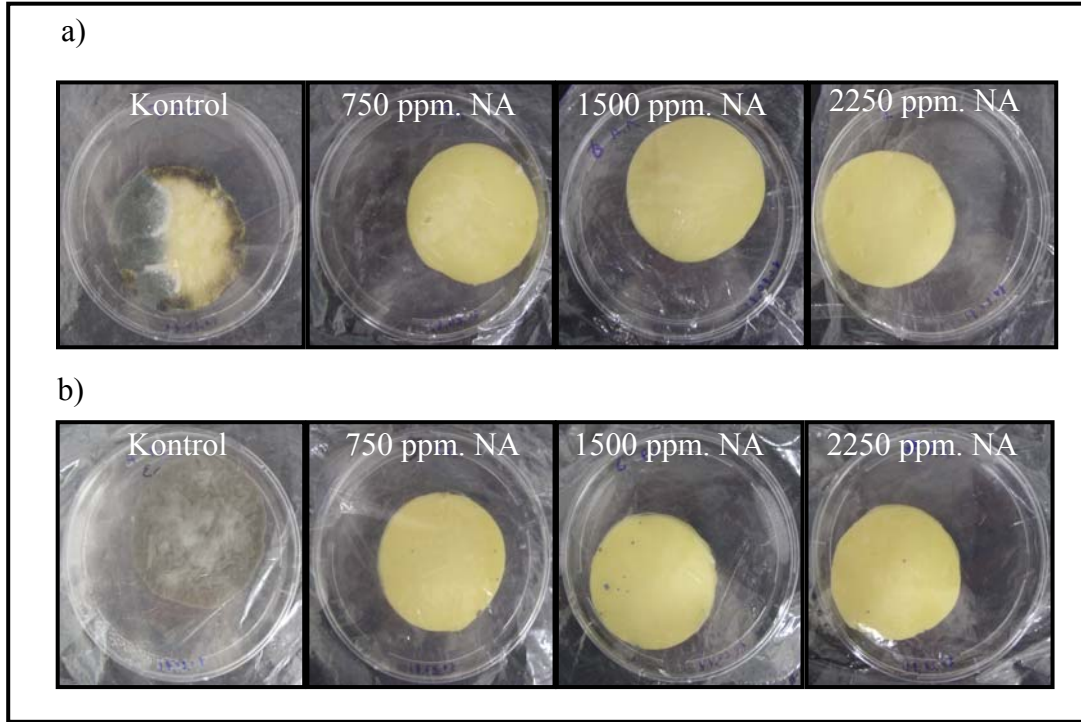
Şekil 4.9 Batırma yolu ile BE uygulamasının et yüzeyindeki a) *L. monocytogenes*, b) *S. enteritidis* ve c) *E. coli* O157:H7'e etkisi d) ALF+BE'nin *E. coli* O157:H7'e etkisi

#### 4.3.2 Peynir için batırma uygulamaları

NA'in batırma yolu ile küf inoküle edilmiş peynirler üzerine antifungal etkilerinin sonuçları Şekil 4.10'da sunulmuştur. NA, buzdolabında saklanan (10°C) peynirler üzerindeki iki küfün de büyümesini önemli ölçüde düşürmüştür. *P. roquefortii* ile inoküle edilmiş kontrol gruplarında saklama süresinin sonunda yüzeyin tamamı küfle kaplanmışken, batırma işlemi yapılmış yüzeylerde sadece bölgesel olarak iğne ucu şeklinde küf büyümesine rastlanmıştır (Şekil 4.11). Aynı şekilde, *A. niger* inoküle edilmiş kontrol gruplarında uygulama yapılmış gruplara nazaran önemli ölçüde büyüme kaydedilmiştir. Mikrobiyolojik analizler de bu gözlemleri doğrulamıştır. Otuz gün saklama süreci sonunda, *A. niger* için uygulama yapılmış ve kontrol gruplar arasındaki mikrobiyal yük farkı konsantrasyona bağlı olmaksızın yaklaşık 4 log'dur. 750 ppm NA solüsyonuna batırılmış peynirlerde *P. roquefortii* büyümesinde 30 gün sonunda 1 log düşüş kaydedilmiştir. 1500 ve 2250 ppm NA ise *P. roquefortii* sayısında yaklaşık 4 log düşüşe neden olmuştur.



Şekil 4.10 Batırma yolu ile NA uygulamasının peynir yüzeyindeki a) *P. roquefortii* ve b) *A. niger* üzerine etkisi



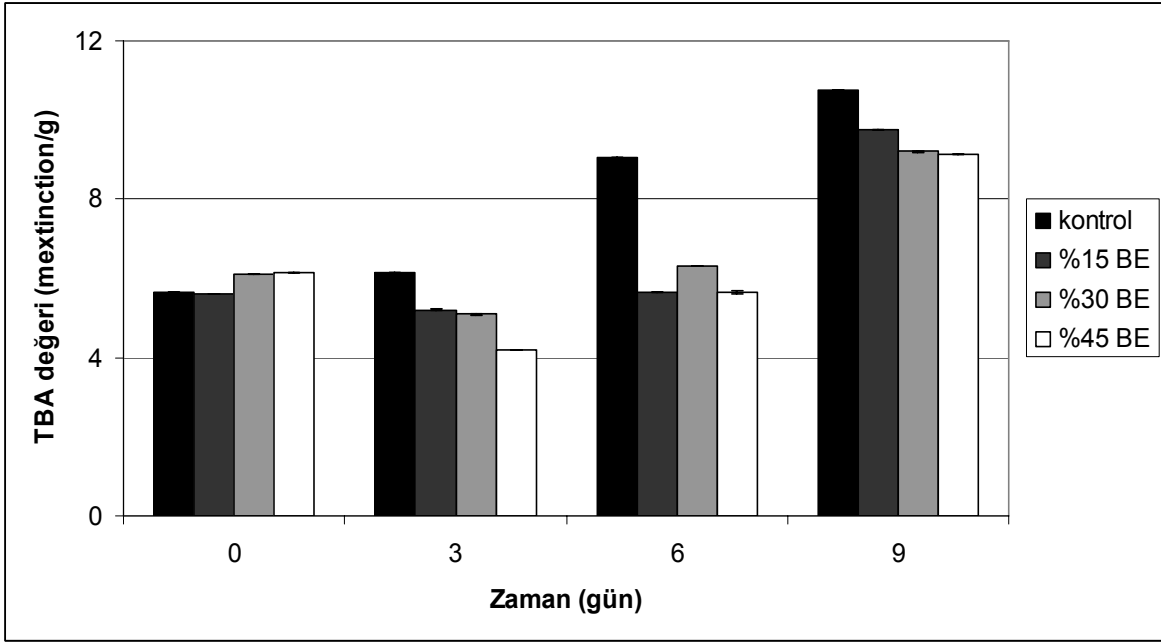
Şekil 4.11 Batırma yolu ile NA uygulamasının peynir yüzeyindeki a) *A. niger* ve b) *P. roquefortii* üzerine etkisini gösteren peynir örnekleri

#### 4.3.3 Batırma yoluyla et üzerine uygulanan BE'nin antioksidan aktivitesi

Bu projede yapılması planlanan diğer bir çalışmada antioksidan etkisi bilinen BE'nin gıda uygulamaları sırasında bu etkisinin tespit edilmesidir. Film uygulamalarında görüleceği üzere BE, antimikrobiyal özellik olarak filme önemli bir katkıda bulunmamaktadır. Ancak ekstrakt et yüzeyinde batırma yoluyla *L. monocytogenes* sayısında düşüşe neden olmuştur. Bundan dolayı BE için sadece batırma yoluyla et yüzeyindeki antioksidan aktivitesi test edilmiştir. Bu amaçla BE'na batırılmış ve kontrol gruplarının oksidasyonları saklama süresince TBA değerleri belirlenerek izlenmiştir.

Şekil 4.12'den de görüleceği gibi BE saklama süresince TBA değerini önemli ölçüde düşürmüştür. TBA değeri %45 BE'na batırılmış etlerde 6. günde %37 ve 9. günde %15'lik bir düşüş göstermiştir. Test edilen konsantrasyonlar arasında antioksidan aktivite açısından bir farklılık gözlenmemiştir.

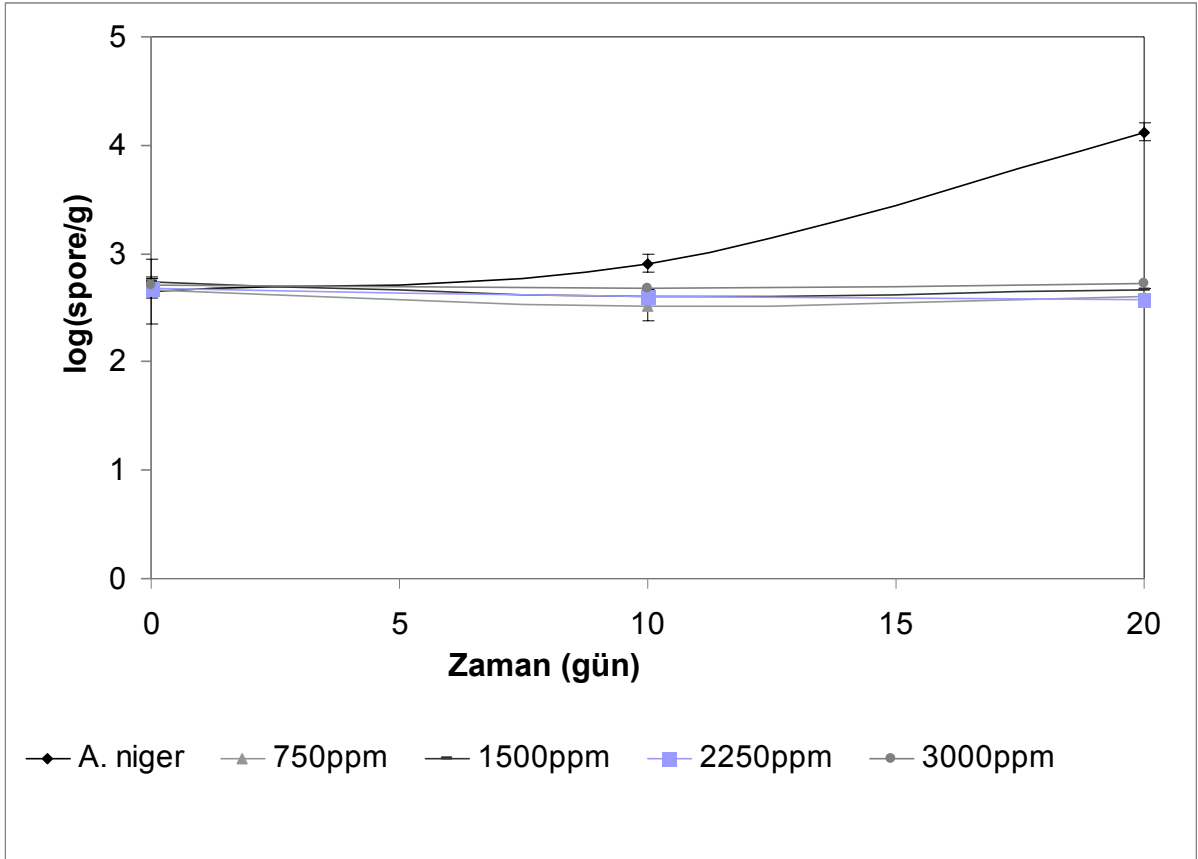




Şekil 4.12 Değişik konsantrasyonlarda BE'na batırılmış et örneklerinin 8°C'de saklama sırasında TBA değerlerinin zamanla değişimi

#### 4.3.4 Peynir için püskürtme uygulamaları

NA'in batırma yolu ile küf inoküle edilmiş peynirler üzerine antifungal etkilerinin sonuçları Şekil 4.10'da sunulmuştur. Yüzeyine *A. niger* inoküle edilmiş peynir örneklerinde spor sayısı saklama süresince artış göstermiştir. Ancak NA solüsyonunun yüzeye spreyleneceği yolu ile işlem görmüş peynir örneklerinde spor sayısı başlangıçtaki spor sayısı ile aynıdır. Yani küf sayısında bir artış görülmemiştir. Çalışılan bütün NA konsantrasyonları (750-3000 ppm) için durum aynıdır. Bu bakımdan batırma ve spreyleneceği uygulamaları arasında bir fark gözlenmemiştir. İkisinde de kullanılan konsantrasyona bakılmaksızın NA büyümeyi engellemiştir.



Şekil 4.13 Püskürtme yolu ile NA uygulamasının peynir yüzeyindeki *A. niger* üzerine etkisi

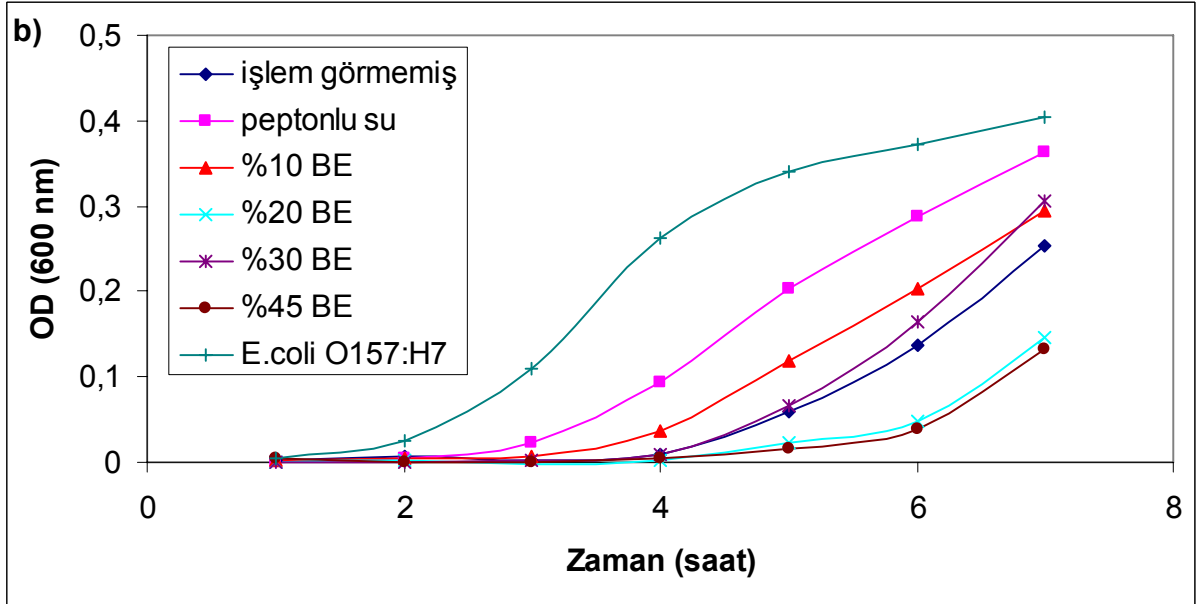
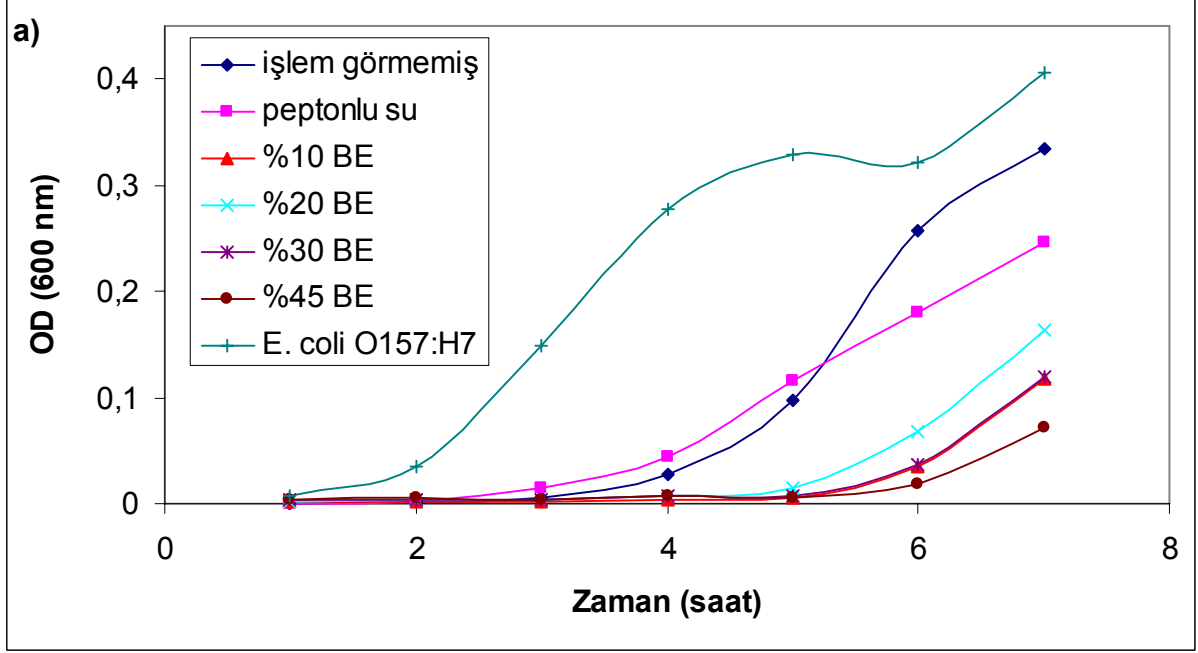
#### 4.3.5 Değişik yüzeyler için batırma uygulamaları

Çalışmanın bu bölümünde BE'nin çelik ve tahta yüzeyler üzerinde gelişen *E. coli* O157:H7 üzerine etkisi test edilmiştir. Bu amaçla çelik ve tahta parçaları değişik konsantrasyonlarda BE solüsyonuna batırılmış ve bu yüzeylerde mikrobiyal büyüme izlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.14'de sunulmuştur.

Çelik için BE'nin %10-45 aralığında yüzeyde mikroorganizma büyümesinde bir düşüşe neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.14 a). Peptonlu suya batırılmış yüzeyde de bir miktar düşüş gözlenmiştir. Ancak özellikle yüksek BE konsantrasyonları, işlem görmemiş ve peptonlu suya batırılmış örneklere göre OD değerlerinde çok belirgin düşüşlere neden olmuştur.

Tahta yüzeylerde ise sonuçlar çok tutarlı olmamakla beraber yine yüksek BE konsantrasyonunda mikrobiyal etki belirgindir ve OD değeri işlem görmemiş tahta örneklerine göre yaklaşık %50 düşmüştür. Sonuçların tutarsızlığı tahtanın girintili çıkıntılı yüzey özelliklerine bağlanmıştır.

Sonuç olarak değişik malzemelere batırma yolu ile uygulanan BE özellikle yüksek konsantrasyonlarda yüzeydeki patojen mikroorganizma sayısını düşürmede etkili olmuştur. Bu etki düz bir yüzeye sahip malzemelerde daha düşük konsantrasyonlar için de geçerlidir.



Şekil 4.14 a) Çelik ve b) tahta yüzeylere batırma yolu ile uygulanan BE'nın *E. coli* O157:H7 büyümesi üzerine etkileri

#### 4.4 Biyopolimerlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Önceki bölümlerde açıklandığı gibi filtre kağıdına antimikrobiyal maddelerin emdirilmesi yolu ile yapılan disk difüzyon testlerine göre ALF ve BE, bakterilere ve küflere karşı herhangi bir etkiye sahip değildiler (Tablo 4.3). Bu maddeler hazırlanan G ve MS filmlere eklenerek yine aynı yöntemle antimikrobiyal özellikleri test edilmiştir. ALF için kullanılan konsantrasyonlar 0,03, 0,05 ve 0,07 g/10g fs'dur. 0,05 g/10g fs ve üstü konsantrasyonlarda filmde çatlama oluşmuş ve filmler homojen bir yapıya sahip olmamıştır. Sonuçlar kağıt disk difüzyon testini doğrular niteliktedir. Yine herhangi bir antimikrobiyal etki gözlenmemiştir.

NA ve NA+BE'de G ve MS polimerlere eklenmiş ve antifungal özellikleri test edilmiştir. Tablo 4.4 ve 4.5'de bu maddeleri içeren polimerlere maruz bırakılan küflerin engellendiği bölgelerin çapları listelenmiştir. Şekil 4.15 ve 4.16'da de bu bölgelerden bazı örnekler görsel olarak sunulmuştur.

NA eklenen polimerler iki küfün de büyümesinin engellenmesinde oldukça etkili olmuşlardır. İki tip polimer için de MIC değeri *A. niger* için 2 mg/10g fs ve *P. roquefortii* için ise 1 mg/10g fs'dir. Bu iki MIC değeri arasındaki fark küflerin hücre duvarlarındaki farklılıklara atfedilebilir. Kitin, *A. niger*'in hücre duvarının %45'ini oluştururken, *P. notatum* hücre duvarında yaklaşık %20 kitin vardır. Bundan dolayı NA kolaylıkla *P. roquefortii* hücre duvarını parçalarken kitin açısından daha zengin olan *A. niger* için daha yüksek miktarda NA gerekmektedir (ROLLER ve COVILL, 1999).

NA konsantrasyonu 2'den 40 mg/10g fs'na artarken *A. niger*'in engellendiği bölgenin çapı da MS filmler için 2,84'den 3,99'a ve G filmler için de 2,76'dan 4 cm'ye ulaşmaktadır. *P. roquefortii* kullanıldığında ise engelleme bölgesinin çapı G filmler için 2,34-5,06 cm ve MS filmler için de 2,59-5,30 cm aralığında değişmektedir. MS karbonhidrat ve G'de protein bazlı polimerler olmalarına rağmen MIC değerlerinde bir farklılık gözlenmemiştir. Bu da filmin kimyasal yapısının salınım profilini çok değiştirmede anlamına gelebilir. 10 mg NA/10g fs ve üstü konsantrasyonlarda engellenen bölge çapı bir platoya ulaşmıştır. Bu da daha fazla NA kullanmanın gerekmediğini gösterir.

Kağıt disklerle polimerlerin MIC değerleri karşılaştırılmak istendiğinde birim alandaki NA miktarlarını kullanarak MIC değerlerini ifade etmek daha uygundur (Tablo 4.6). İki tür polimer için de *A. niger*'a karşı MIC değerleri (0,035 mg/cm<sup>2</sup>), kağıt disk MIC değerinin (0,015 mg/cm<sup>2</sup>) iki katından fazladır. Bunun nedeni aktif maddenin polimer matriksi içinde kapanlanmış biçimde bulunması olabilir. Bu da antimikrobiyal aktivitede bir düşüşe yol açabilir. *P. roquefortii* için MIC değeri (0,0175 mg/cm<sup>2</sup>) kağıt disklere (0,015 mg/cm<sup>2</sup>) göre daha yüksek olmasına rağmen aradaki fark *A. niger* için olduğu kadar değildir. MIC

değerinde de gözlenebileceği gibi bu durum *P. roquefortii*'nin NA'e duyarlılığı ile ilgili bir durum olabilir.

Tablo 4.4 NA ve NA+BE içeren G polimerlerin disk difüzyon testi sonuçları

NA konsantrasyonu (mg/10 g fs)	BE konsantrasyonu (ml/10 g fs)	Büyümenin engellendiği bölgenin çapı (cm)	
		<i>A. niger</i>	<i>P. roquefortii</i>
0	0	+	+
0,5	0	+	+
1	0	+	2,34±0,15 <sup>a</sup>
1,5	0	+	2,72±0,08 <sup>b</sup>
2	0	2,76±0,4 <sup>a</sup>	3,11±0,11 <sup>c</sup>
5	0	3,72±0,18 <sup>b</sup>	4,46±0,38 <sup>d</sup>
10	0	3,98±0,06 <sup>c</sup>	5,23±0,22 <sup>e</sup>
20	0	4,01±0,0 <sup>c</sup>	5,26±0,20 <sup>e</sup>
40	0	4±0,09 <sup>c</sup>	5,06±0,11 <sup>f</sup>
0,5	1,5	+	+
1	1,5	+	2,5750±0,49 <sup>a</sup>
1,5	1,5	1,79±0,11 <sup>a</sup>	2,7750±0,21 <sup>b</sup>
2	1,5	2,53±0,09 <sup>b</sup>	3,2833±0,04 <sup>c</sup>
5	1,5	3,58±0,07 <sup>c</sup>	4,1583±0,01 <sup>d</sup>
10	1,5	3,74±0,11 <sup>d</sup>	4,8250±0,01 <sup>e</sup>
20	1,5	4,08±0,07 <sup>e</sup>	5,4167±0,07 <sup>f</sup>
0,5	3	+	+
1	3	+	2,15±0,13 <sup>a</sup>
1,5	3	1,71±0,06	2,65±0,18 <sup>b</sup>

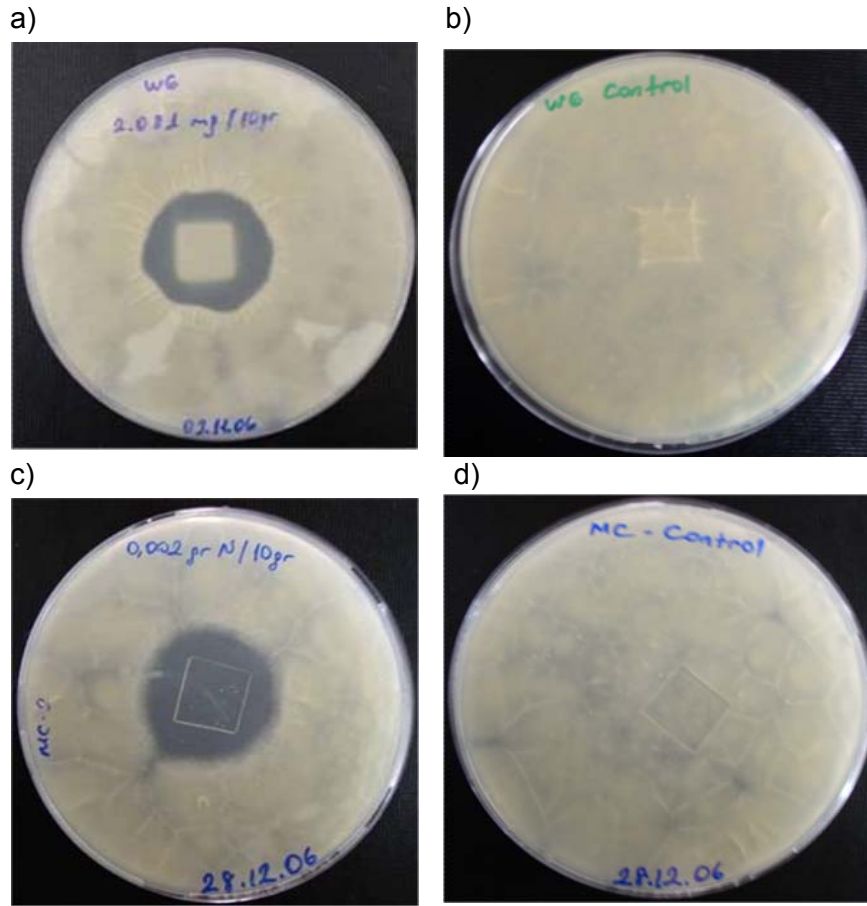
+ engelleme kaydedilmedi, <sup>a-d</sup> aynı harfler değişik NA seviyeleri arasında istatistiksel olarak P>0,05'de fark olmadığını göstermektedir

Tablo 4.5 NA ve NA+BE içeren MS polimerlerin disk difüzyon testi sonuçları

NA konsantasyonu (mg/10 g fs)	BE konsantrasyonu (ml/10 g fs)	Büyümenin engellendiği bölgenin çapı (cm)	
		<i>A. niger</i> <sup>a</sup>	<i>P. roquefortii</i> <sup>b</sup>
0	0	+	+
0,5	0	+	+
1	0	+	2,59±0,09 <sup>a</sup>
1,5	0	+	3,04±0,13 <sup>b</sup>
2	0	2,84±0,18 <sup>a</sup>	3,37±0,11 <sup>c</sup>
5	0	3,51±0,04 <sup>b</sup>	4,54±0,35 <sup>d</sup>
10	0	3,64±0,2 <sup>c</sup>	4,91±0,11 <sup>e</sup>
20	0	4±0 <sup>d</sup>	4,89±0,13 <sup>e</sup>
40	0	3,99±0,11 <sup>d</sup>	5,30±0,17 <sup>f</sup>
0,5	1,5	+	+
1	1,5	+	2,38±0,14 <sup>a</sup>
1,5	1,5	2,29±0,34 <sup>a</sup>	2,77±0,27 <sup>b</sup>
2	1,5	2,75±0,21 <sup>b</sup>	2,93±0,08 <sup>b</sup>
5	1,5	3,63±0,14 <sup>c</sup>	4,52±0,14 <sup>c</sup>
10	1,5	4,09±0,06 <sup>d</sup>	5,10±0,19 <sup>d</sup>
20	1,5	4,2±0,11 <sup>d</sup>	5,46±0,08 <sup>e</sup>
0,5	3	+	+
1	3	+	2,39±0,10 <sup>a</sup>
1,5	3	1,88±0,05	3,04±0,12 <sup>b</sup>

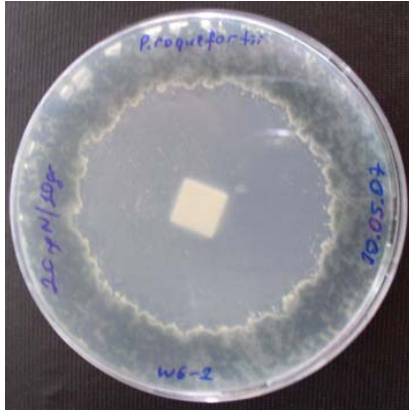
+ engelleme kaydedilmedi, <sup>a-d</sup> aynı harfler değişik NA seviyeleri arasında istatistiksel olarak P>0,05'de fark olmadığını göstermektedir

Yalnızca BE içeren G ve MS polimerlerde her hangi bir antifungal aktivite gözlenmemiştir. Ancak, iki film için de beraber kullanıldıklarında NA ve BE sinerjistik etkiye sahiptirler. Sadece NA içeren G ve MS filmlerin *A. niger* için MIC değerleri 2 mgNA/10g fs iken büyüme olmayan bölgeler 1,5 mg NA/10g fs ile 1,5 ml RE/10g fs beraber kullanıldığında elde edilmiştir (Tablo 4.4 ve 4.5). Ancak daha yüksek NA konsantrasyonlarında daha büyük bölge çapları elde edilmemiştir. Bu nedenle *A. niger* için BE'nin etkisi sadece bu konsantrasyonda gözlenebilmiştir. BE'nin miktarını 3 ml'ye artırmak da MIC değerinde düşüşe neden olmamıştır. *P. roquefortii* için NA ve BE arasında sinerjistik bir etkileşim gözlenmemiştir.

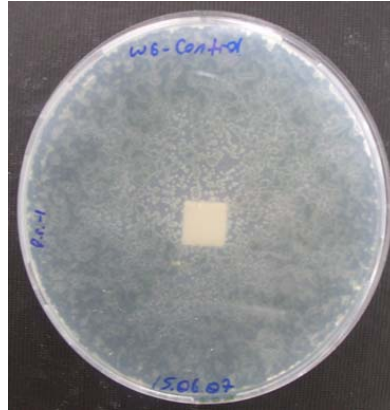


Şekil 4.15 G ve MS polimerlerin *A. niger*'e karşı etkileri: a) 2 mg NA/10 g fs içeren G film, b) G kontrol, c) 2 mg NA/10 g fs içeren MS film d) MS kontrol

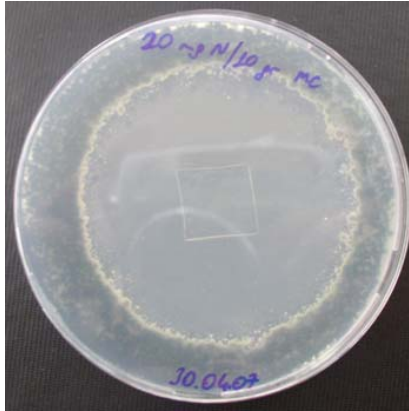
a)



b)



c)



d)



Şekil 4.16 G ve MS polimerlerin *P.roquefortii*'ye karşı etkileri: a) 2 mg NA/10 g fs içeren G film, b) G kontrol, c) 2 mg NA/10 g fs içeren MS film d) MS kontrol



Tablo 4.6 NA ve NA+BE içeren kağıt disk ve polimerlerin MIC değerleri

Küf	Disk		G		MS	
	NA <sup>a</sup>	NA+BE	NA <sup>b</sup>	NA+BE <sup>c</sup>	NA <sup>b</sup>	NA+BE <sup>c</sup>
<i>A. niger</i>	750 (0,015)	ns	2 (0,035)	1,5+1,5(0,0264+0,0264)	2 (0,035)	1,5+1,5(0,0264+0,0264)
<i>P.roquefortii</i>	750(0,015)	ns	1(0,0175)	ns	1(0,0175)	ns

<sup>a</sup> ppm (mg/cm<sup>2</sup>), <sup>b</sup> mg/10g fs (mg/cm<sup>2</sup>), <sup>c</sup> mg NA/10g fs+ml RE/10 g fs (mg NA/cm<sup>2</sup> + ml RE /cm<sup>2</sup>), ns: sinerji yok

## 4.5 Biyopolimerlerin Fiziksel Karakterizasyonu

### 4.5.1 Mekanik özellikler

GK, EM ve %KN polimerlerin dayanıklılığını test etmek için sıklıkla kullanılan mekanik test göstergeleridir. GK bir malzemeye mekanik test uygulandığında taşıyabileceği en yüksek yük miktarıdır. %KN polimerin çekme sonucu kırıldığı noktada orjinal uzunluğuna göre ne kadar esnediğini gösterir. EM birim gerilme ile birim şekil değiştirme arasındaki orandır ve yük altında deformasyona uğramış malzemenin tekrar eski halini alma özelliğinin ölçüsüdür. Bu çalışmada geliştirilen antimikrobiyal özelliklere sahip biyopolimerlerin mekanik özellikleri Tablo 4.7'de listelenmiştir.

NA içeren G filmlerin mekanik özelliklerinde değişiklik olmamıştır. NA ve BE arasında sinerji sadece düşük NA konsantrasyonlarında gözlemlendiğinden 0,5-2 mg NA/10g fs içeren G filmlerin mekanik özellikleri tespit edilmiştir. (2 mg NA +1,5 ml BE)/10 g fs içeren polimerin GM'de %15,5 ve EM'de %50 düşüş görülmüştür. Ayrıca %KN, BE de içeren polimerlerde NA konsantrasyonunun yükselmesiyle artmıştır.

MS filmler homojen yapıda, ince, esnek ve şeffaf görünümlüdür. NA eklenmesi ile MS filmlerde görsel bir değişiklik gerçekleşmemiştir. 10 ve 20 mg NA/10 g fs MS filmler kontrol filmler ile karşılaştırıldığında GM'nin azaldığı ve en yüksek konsantrasyon olan 20 mg/10 g fs'da azalmanın %38 olduğu belirlenmiştir. Düşük NA konsantrasyonlarında EM de önemsiz bir artış gözlenirken %KN'de NA eklenmesiyle azalma tespit edilmiştir.

Tablo 4.7 NA ve NA+BE içeren biyopolimerlerin mekanik özellikleri

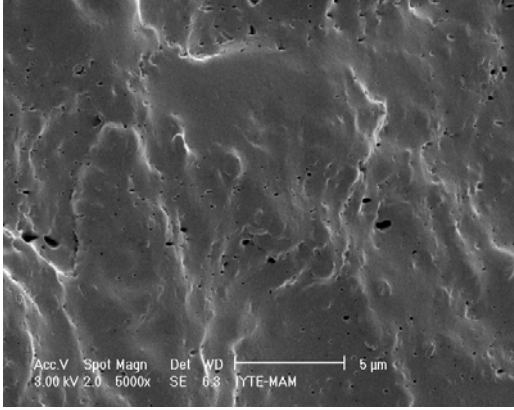
Polimer	NA (mg/10gfs)	BE (ml/10gfs)	Kalınlık (mm)	Mekanik özellikler		
				GM (MPa)	EM (N/mm <sup>2</sup> )	%KN
G						
	0	0	0,25±0,028 <sup>a</sup>	2,06±0,27 <sup>a</sup>	28,79±11,62 <sup>a</sup>	224,80±53,01 <sup>a</sup>
	2	0	0,22±0,036 <sup>a</sup>	2,01±0,28 <sup>a</sup>	28,21±9,26 <sup>a</sup>	225,32±49,18 <sup>a</sup>
	5	0	0,23±0,022 <sup>a</sup>	2,00±0,17 <sup>a</sup>	23,29±3,93 <sup>a</sup>	254,76±56,80 <sup>a</sup>
	10	0	0,24±0,026 <sup>a</sup>	2,10±0,19 <sup>a</sup>	27,25±3,29 <sup>a</sup>	227,87±41,00 <sup>a</sup>
	20	0	0,24±0,023 <sup>a</sup>	2,23±0,11 <sup>a</sup>	29,62±5,18 <sup>a</sup>	225,10±20,97 <sup>a</sup>
	1	1.5	0,23±0,034 <sup>a</sup>	2,02±0,21 <sup>a</sup>	20,62±3,44 <sup>a</sup>	260,92±11,00 <sup>a</sup>
	1.5	1.5	0,23±0,037 <sup>a</sup>	2,20±0,09 <sup>a</sup>	21,19±3,43 <sup>a</sup>	278,12±16,72 <sup>a</sup>
	2	1.5	0,23±0,037 <sup>a</sup>	1,74±0,13 <sup>b</sup>	14,68±1,08 <sup>b</sup>	295,95±15,42 <sup>b</sup>
MS						
	0	0	0,063±0,009 <sup>a</sup>	36,63±7,53 <sup>a</sup>	313,23±56,89 <sup>bc</sup>	73,98±13,22 <sup>b</sup>
	2	0	0,069±0,01 <sup>a</sup>	37,17±11,95 <sup>a</sup>	380,73±58,36 <sup>a</sup>	60,45±17,67 <sup>a</sup>
	5	0	0,066±0,01 <sup>a</sup>	33,80±6,11 <sup>a</sup>	346,03±51,79 <sup>ac</sup>	66,47±6,58 <sup>ab</sup>
	10	0	0,065±0,01 <sup>a</sup>	27,28±3,80 <sup>b</sup>	263,87±31,97 <sup>b</sup>	66,78±2,51 <sup>ab</sup>
	20	0	0,075±0,005 <sup>b</sup>	22,59±4,98 <sup>b</sup>	299,90±27,21 <sup>bc</sup>	56,76±9,18 <sup>a</sup>
	1	1.5	0,064±0,009 <sup>a</sup>	36,09±5,36 <sup>a</sup>	426,75±35,47 <sup>a</sup>	62,20±8,03 <sup>a</sup>
	1.5	1.5	0,062±0,01 <sup>a</sup>	32,34±12,48 <sup>a</sup>	357,80±39,38 <sup>b</sup>	62,10±16,61 <sup>a</sup>
	2	1.5	0,066±0,01 <sup>a</sup>	35,45±13,92 <sup>a</sup>	341,89±69,43 <sup>b</sup>	70,46±21,73 <sup>a</sup>

#### 4.5.2 Yüzey özellikleri

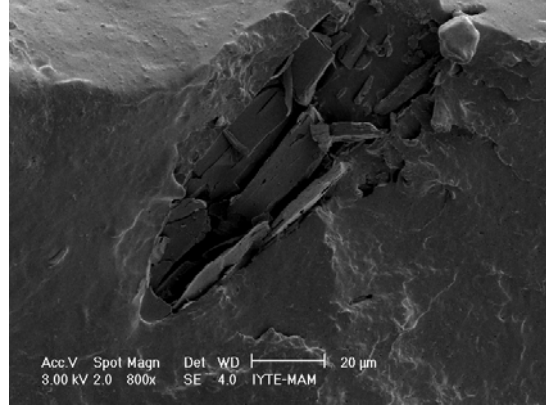
Kontrol ve antifungal madde içeren polimerlerin kesit resimleri görsel olarak polimerlerin yapısının belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu ile elde edilmiştir. Kesit resimlerinden bazıları Şekil 4.17 ve 18'de sunulmuştur. Kontrol G filmlerin literatürde (POCHAT-BOHATIER ve DİĞ., 2006) de belirtildiği gibi homojen bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17a). 2 mg NA/10g fs içeren G filmlerde görsel bir değişiklik olmamıştır. G filmlerin yapısındaki değişiklikler, 10 ve 20 mg NA/10g fs eklenen filmlerde görülmüştür. Bu filmlerde yarıklara ve boşluklara rastlanmıştır. Ayrıca yine bu filmlerde NA'nin kristalize olduğu da görülmektedir. Literatürde NA'nin pH 6,5'de kristal yapıya sahip olduğu belirtilmiştir

(STARK, 2003). NA içeren filmlere ayrıca BE eklendiğinde filmlerde çubuk şeklinde parçalar görülmüştür ve bu parçaların BE olduğu düşünülmektedir. Çünkü sadece BE içeren polimerlerde de aynı yapıya rastlanmıştır.

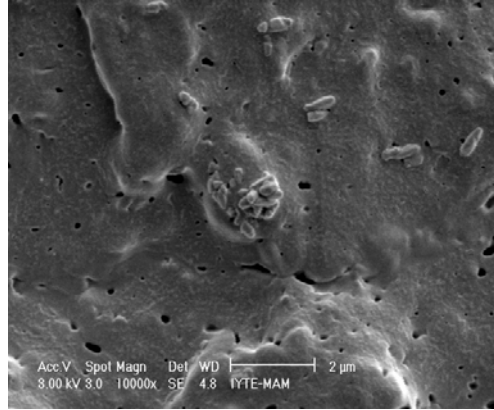
a)



b)



c)

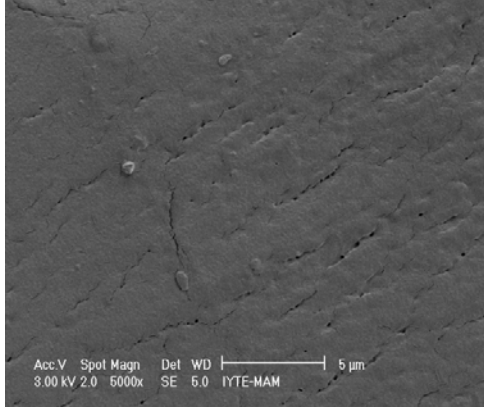


Şekil 4.17 G filmlerin TEM kesit resimleri a) kontrol film, b) 20 mg NA/10g fs, c) (2 mg NA +1.5 ml BE)/10g fs

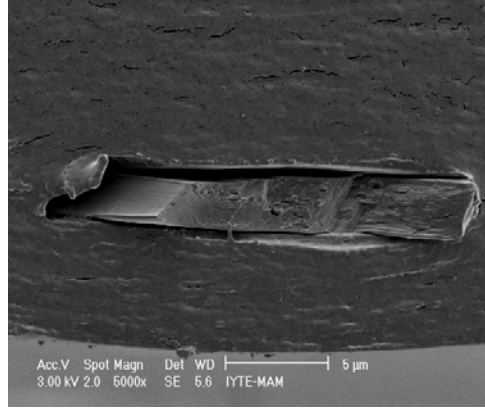
MS kontrol filmleri de homojen bir yapıya sahiptirler (Şekil 4.18). Yine yüksek NA konsantrasyonu içeren MS filmlerde yarıklar görülmüş ve NA'nin kristalize olduğu tespit edilmiştir. MS filmlerde NA'e ek olarak BE eklendiğinde küçük parçacıklar ve yarıkların oluştuğu da gözlenmiştir.

TEM gözlemlerinden düşük NA konsantrasyonlarında NA'nin homojen bir şekilde dağılım gösterdiği yüksek konsantrasyonlarda ise NA'nin kristal bir yapıya sahip olduğu sonucuna varılabilir.

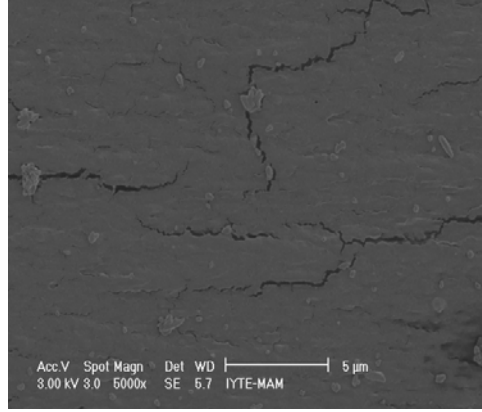
a)



b)



c)



Şekil 4.18 MS filmlerin TEM kesit resimleri a) kontrol film b) 20 mg NA/10g fs c) (2 mg NA +1.5 ml BE)/10g fs

#### 4.5.3 Su buharı geçirgenliği

Su buharı geçirgenliğinin belirlenmesinde ASTM E96 (1980) metodunu baz alan değişik gravimetrik teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan yöntem de yine sözü edilen metodu referans olarak özellikle hidrofobik karakterli polimerler için geliştirilmiştir (Mc HUGH ve DİĞ., 1993). G ve MS filmlerin bu metod kullanılarak belirlenen SBG değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir.

MS kontrol filmlerin SBG değeri 3,50 g.mm/m<sup>2</sup>.kPa.h iken G kontrol filmin 6,85 g.mm/m<sup>2</sup>.kPa.h olarak tespit edilmiştir. Değerler arasındaki bu farklılık iki polimerin yapılarından ve polaritelerinden kaynaklanmaktadır. MS gibi düz zincirli polimerlerin molekülleri birbirine yakın bir şekilde bulunurlar ve geçirgenlikleri düşüktür. Ancak, proteinler, moleküllerin yan yana gelmesine engel olan büyük fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu tür yapı geçirgenliğin artmasına neden olur. Antifungal maddelerin eklenmesinin G ve MS filmlerin

SBG üzerine hiç bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Büyük olasılıkla bu aktif maddeler film matrisi ile yapıda değişikliğe neden olabilecek bir etkileşime girmemişlerdir ve de herhangi bir plastikleştirici etkileri yoktur. Bu nedenle bu filmlerin SBG özelliklerinde bir değişim oluşmamıştır. Aynı şekilde başka bir çalışmada da aljinat-elma püresi bazlı polimerlere kekik yağı, karavakrol, sitral ve tarçın yağı eklendiğinde filmlerin SBG'de önemli bir değişiklik olmamıştır (ROJAS-GRAÜ ve DİĞ., 2007). Yine G filmlere nisin eklenmesinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (KO ve DİĞ., 2001).

Tablo 4.8. Kontrol ve antifungal maddeler içeren G ve MS polimerlerin su buharı geçirgenlikleri

Film	NA (mg/10gfs)	BE (ml/10gfs)	Kalınlık (mm)	SBG (g.mm/m <sup>2</sup> .kPa.h)
<b>G</b>				
	0	0	0,25±0,028 <sup>a</sup>	6,85±0,56 <sup>a</sup>
	2	0	0,22±0,036 <sup>a</sup>	5,99±2,23 <sup>a</sup>
	5	0	0,23±0,022 <sup>a</sup>	6,36±0,67 <sup>a</sup>
	10	0	0,24±0,026 <sup>a</sup>	6,47±0,95 <sup>a</sup>
	20	0	0,24±0,023 <sup>a</sup>	6,42±0,65 <sup>a</sup>
	1	1,5	0,23±0,034 <sup>a</sup>	5,99±0,71 <sup>a</sup>
	1,5	1,5	0,23±0,037 <sup>a</sup>	6,04±0,74 <sup>a</sup>
	2	1,5	0,23±0,037 <sup>a</sup>	6,26±0,25 <sup>a</sup>
<b>MS</b>				
	0	0	0,063±0,009 <sup>a</sup>	3,50±0,25 <sup>a</sup>
	2	0	0,069±0,01 <sup>a</sup>	3,43±0,57 <sup>a</sup>
	5	0	0,066±0,01 <sup>a</sup>	3,20±0,25 <sup>a</sup>
	10	0	0,065±0,01 <sup>a</sup>	3,79±0,41 <sup>a</sup>
	20	0	0,075±0,005 <sup>b</sup>	4,11±0,74 <sup>a</sup>
	1	1,5	0,064±0,009 <sup>a</sup>	3,88±0,23 <sup>a</sup>
	1,5	1,5	0,062±0,01 <sup>a</sup>	3,63±0,59 <sup>a</sup>
	2	1,5	0,066±0,01 <sup>a</sup>	3,65±0,46 <sup>a</sup>

## 4.6 Biyopolimerlerin Gıda Uygulamaları

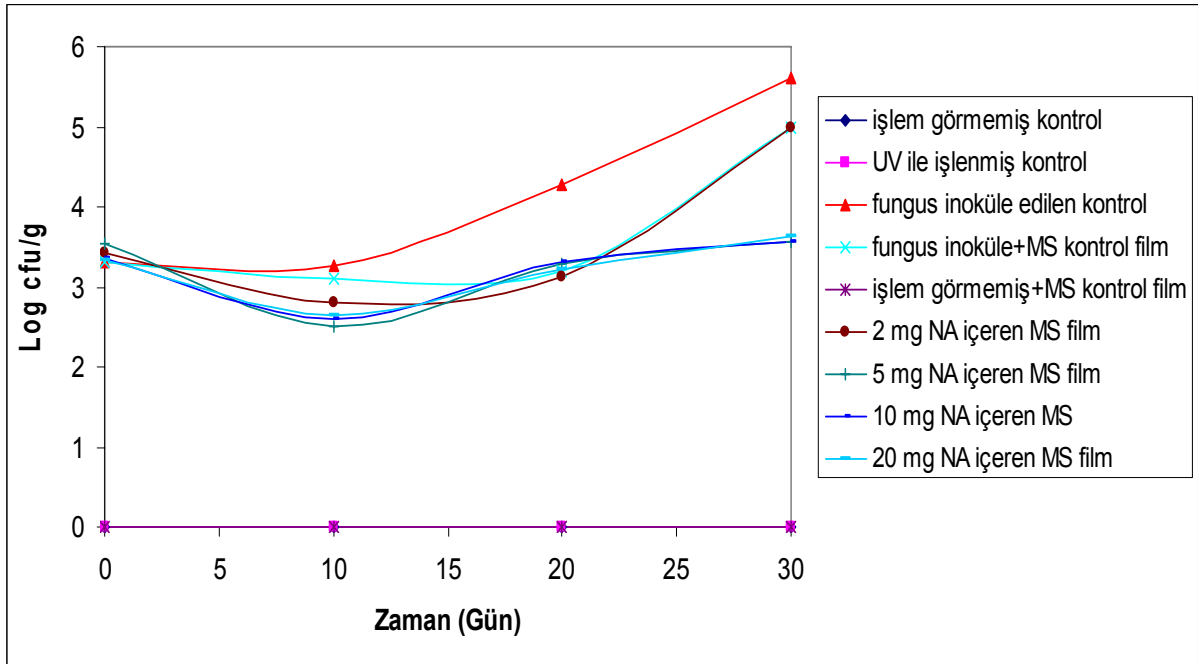
Çalışmanın bu bölümünde üzerlerine  $10^5$  spor/ml *A. niger* ve *P. roquefortii* inoküle edilmiş kaşar peynirleri, NA içeren MS ve G filmleri ve NA+BE içeren MS filmleri ile sarılmış ve  $10^\circ\text{C}$ 'de 30 gün süre ile saklanmıştır. Mikrobiyal yükün zamanla nasıl değiştiğini gösteren sonuçlar Şekil 4.19-4.24 ve Tablo 4.9-4.14'de verilmiştir.

NA içeren ve kontrol MS filmlerin peynir yüzeyine inoküle edilen *A. niger* üzerine etkisi Şekil 4.19'daki grafikte gösterilmiştir. Görüldüğü üzere 2 mg NA/10 g film solüsyonu içeren MS film, NA içermeyen kontrol filme göre mikrobiyal büyümeyi engellemekte bir farklılık göstermemiştir. Ancak 30 gün sonunda 5, 10 ve 20 mg NA/10 g film solüsyonu içeren filmlerin hepsi spor sayısını kontrol filmlerle sarılmış peynirlere göre 2 log düşürmüştür (Şekil 4.20). Bu sonuca göre polimer içerisine 5 mg NA/10 g fs'dan daha fazla NA eklemenin mikrobiyal büyümeyi engellemeye daha fazla katkısı olmamaktadır. MS filmlerin besiyerindeki çalışmalarda MIC değeri 2 mg NA/10g fs iken peynir uygulamalarında mikrobiyal etkinin görüldüğü konsantrasyon 5 mg NA/10g fs olarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal film ve kaplamaların, yapıları daha karışık olan gerçek gıdalara oranla besiyerlerinde daha etkili sonuç verdikleri başka çalışmalarda da bildirilmiştir (DAWSON ve DİĞ., 2002).

Tablo 4.9 NA içeren MS filmlerin saklama sırasında kaşar peyniri üzerindeki *A. niger* yüküne (log CFU/g) etkisi

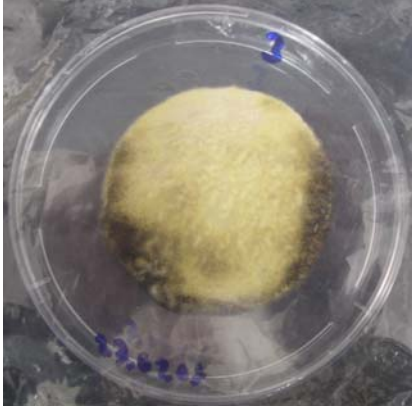
İşlem	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün
1	0	0	sayılamayacak kadar çok	
2	0	0	sayılamayacak kadar çok	
3	3,3±1,3	3,26±0,56	4,28±0,59	5,61±0,49
4	3,3±1,3	3,1±0,51	3,19±0,57	5±0,85
5	0	0	sayılamayacak kadar çok	
6	3,43±1,44	2,81±0,24	3,13±0,15	4,99±1,36
7	3,54±1,54	2,51±0,28	3,29±0,55	3,57±0,69
8	3,35±1,35	2,6±0,21	3,3±0,36	3,56±1,29
9	3,34±1,35	2,65±0,11	3,21±0,15	3,63±0,85

1= işlem görmemiş peynir, 2= UV uygulanmış peynir, 3= *A. niger* inoküle edilmiş peynir, 4= *A. niger* inoküle edilmiş +MS kontrol film, 5= işlem görmemiş +MS kontrol film, 6= MS film-2 mg NA/10g fs, 7= MS film-5 mg NA/10g fs, 8= MS film-10 mg NA/10g fs, 9= MS film-20 mg NA/10g fs



Şekil 4.19 NA içeren MS filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilen *A. niger* üzerine etkisi

a)



b)



Şekil 4.20 Otuz gün saklama süresi sonunda MS filmlerin peynir yüzeyindeki *A. niger*'a etkisi  
a) kontrol b) 5 mg NA/10g fs

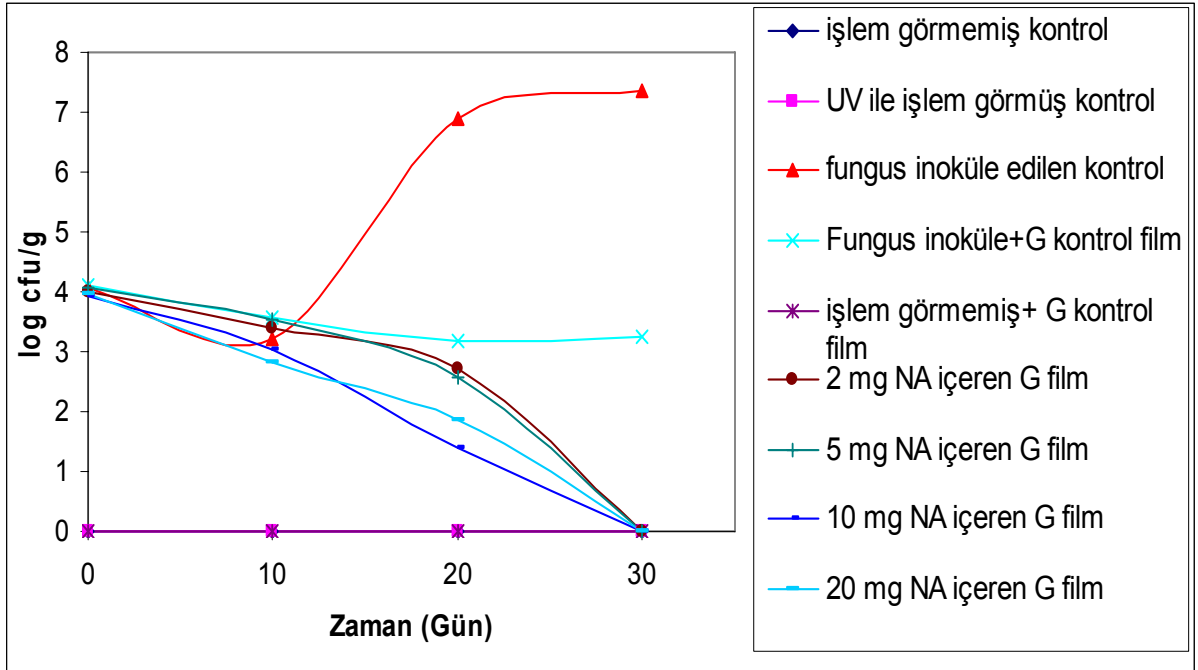
G filmlerin yine peynir üzerine inoküle edilen *A. niger* üzerine etkisi Tablo 4.10 ve Şekil 4.21 ve 22'de sunulmuştur. Sonuçlara göre değişik konsantrasyonlarda NA içeren G filmlerle sarılmış peynirlerde spor sayısı zamanla azalmış ve 30 gün sonunda da hiç spor sayılamamıştır. MS filmlerle sarılmış peynirlerde spor yükü sıfıra inmezken G filmlerde yükün sıfırlanması bu iki film arasındaki yapı farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Depolama süresince G filmler su ile plastize olmakta ve peynirler üzerine iyice yapışmaktadır. Bu nedenle NA büyük olasılıkla tamamen peynir üzerine salınmaktadır. Ancak MS filmlerde bu yapışma gözlenmemektedir. Dolayısı ile MS filmlerde salınım daha kontrollü olmaktadır. Su absorpsiyonu ile ilgili benzer duruma başka bir çalışmada da rastlanmıştır (POCHAT-BOHATIER ve DİĞ., 2006). Ayrıca kontrol filmlerle sarılmış peynirlerde de mikrobiyal yük sabit kalmış ve artış göstermemiştir. Bu durum paket içine oksijen geçirgenliğinin azalmasına bağlanabilir.



Tablo 4.10 NA içeren G filmlerin saklama sırasında kaşar peyniri üzerindeki *A. niger* yüküne (log CFU/g) etkisi

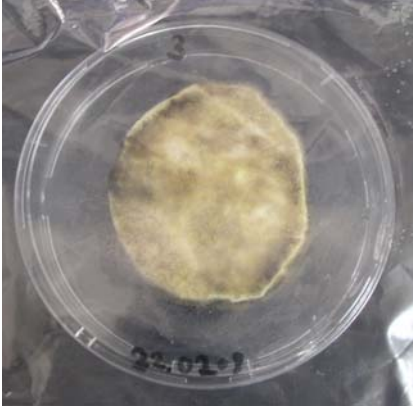
İşlem	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün
1	0	0	sayılamayacak kadar çok	
2	0	0	sayılamayacak kadar çok	
3	4,06±0,97	3,21±0,02	6,89±1,68	7,35±0,02
4	4,11±5,85	3,56±0,83	3,17±1,04	3,24±0,02
5	0	0	0	0
6	3,99±1,35	3,39±0,82	2,7±0,63	0
7	4,07±9,68	3,52±30,71	2,57±4,35	0
8	3,94±5,91	3,04±0,82	1,4±0,5	0
9	3,97±5,56	2,81±1,91	1,87±0,5	0

1= işlem görmemiş peynir, 2= UV uygulanmış peynir, 3= *A. niger* inoküle edilmiş peynir, 4= *A. niger* inoküle edilmiş + G kontrol film, 5= işlem görmemiş + G kontrol film, 6= G film-2 mg NA/10g fs, 7= G film-5 mg NA/10g fs, 8= G film-10 mg NA/10g fs, 9= G film-20 mg NA/10g fs



Şekil 4.21 NA içeren G filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilen *A. niger* üzerine etkisi

a)



b)



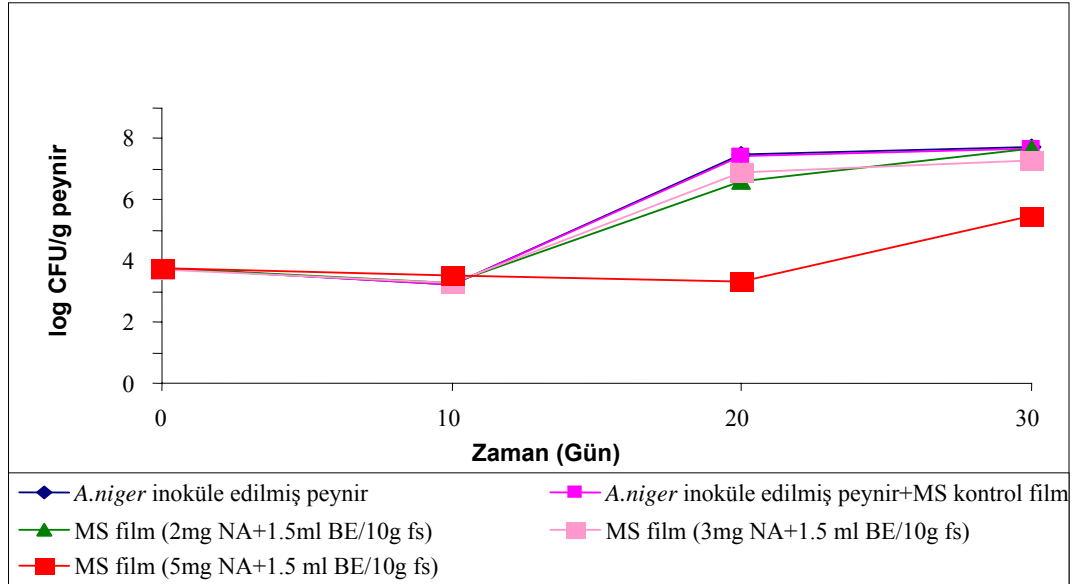
Şekil 4.22 Otuz gün saklama süresi sonunda G filmlerin peynir yüzeyindeki *A. niger*'a etkisi  
a) sarılmamış kontrol peynir b) G kontrol film

Besiyeri üzerinde yapılan çalışmada NA ve BE arasında sinerjistik bir etkiye rastlandığından MS polimeri içine eklenen NA+BE kombinasyonunun etkisi kaşar peyniri yüzeyindeki *A. niger* için de denenmiştir. Tablo 4.11 ve Şekil 4.23 ve 24 çeşitli konsantrasyonlarda NA+BE içeren MS filmler ile sarılmış ve *A. niger* ile inoküle edilmiş kaşar peynirindeki mikrobiyal gelişme değişimini göstermektedir. MS film ile sarılmış peynir üzerindeki *A. niger* sayısı 30 gün sonunda 7,73 log cfu/g'a yükselirken kontrol MS film ile sarılmış peynirde bu sayı 7,46 log cfu/g olmuştur. Bu küfün peynir üzerinde büyümesi NA+BE içeren MS film kullanıldığında önlenebilmiştir. 2 ve 3 mg NA + 1,5 ml BE içeren filmler herhangi bir log düşüşüne yol açmazken 5 mg NA + 1.5 ml BE içeren polimer *A. niger* inoküle edilmiş örneğe göre 2,25 log/cfu düşüşe neden olmuştur. Sadece 5, 10 ve 20 mg NA içeren MS filmlerde *A. niger* büyümesinde 2 log düşüş gözlemlendiği önceki paragraflarda belirtilmişti. Buna göre MS filmlere NA'nin yanı sıra BE eklenmesi önemli bir sinerjistik etki yaratmamıştır.

Tablo 4.11 NA+BE içeren MS filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş *A. niger* yüküne (log CFU/g) etkisi

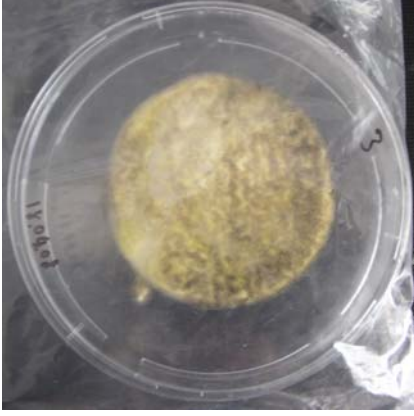
İşlem	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün
1	0	0	sayılamayacak kadar çok	
2	0	0	sayılamayacak kadar çok	
3	3,78±0,9	3,23±0,9	7,5±1,11	7,73±1,44
4	3,76±0,34	3,24±0,34	6,65±1,02	7,46±1,05
5	0	0	sayılamayacak kadar çok	
6	3,77±1,07	3,3±0,73	5,21±0,8	7,68±1,45
7	3,73±0,88	3,3±0,63	6,92±1,51	7,27±0,4
8	3,78±0,15	3,53±1,01	3,32±1,15	5,48±1,42

1= işlem görmemiş peynir, 2= UV uygulanmış peynir, 3= *A. niger* inoküle edilmiş peynir, 4= *A. niger* inoküle edilmiş +MS kontrol film, 5= işlem görmemiş +MS kontrol film, 6= MS film (2mg NA+1,5 ml BE/10g fs), 7= MS film (3mg NA+1,5 ml BE/10g fs), 8= MS film (5mg NA+1,5 ml BE/10g fs)



Şekil 4.23 Çeşitli konsantrasyonlarda NA+BE içeren MS filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş *A. niger* üzerine etkisi

a)



b)



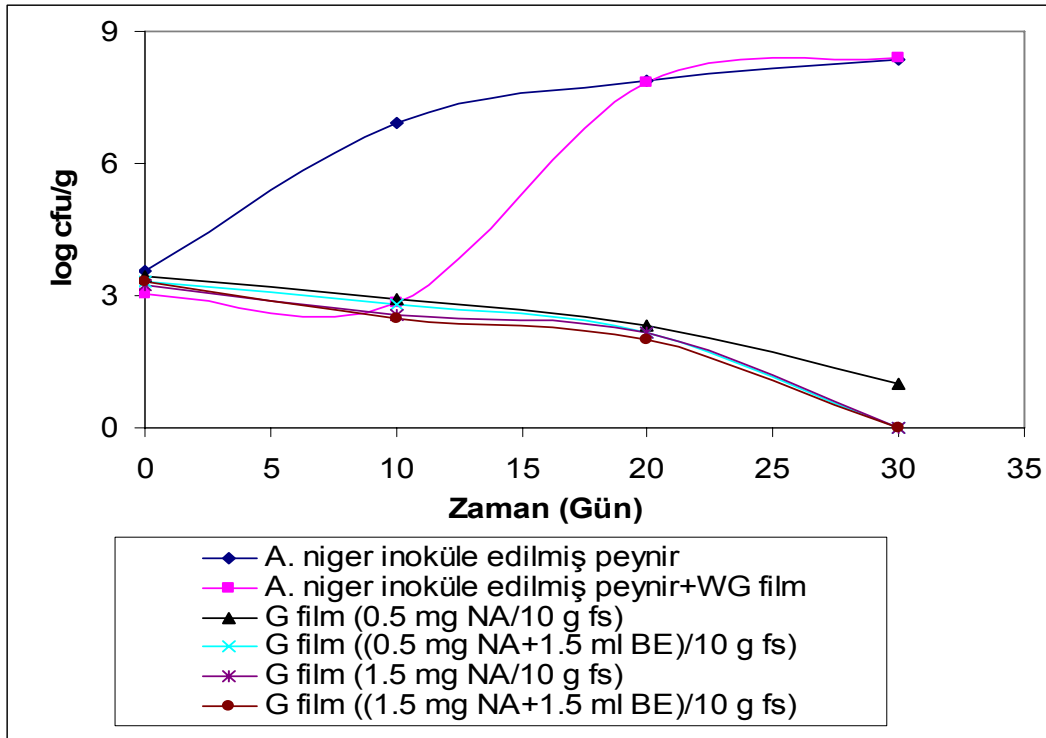
Şekil 4.24 Otuz gün saklama süresi sonunda MS filmlerin peynir yüzeyindeki *A. niger*'a etkisi  
a) sarılmamış kontrol peynir b) 5mg NA+1,5 ml RE/10g fs

G filmlere eklenen NA'nin 2, 5, 10 ve 20 mg seviyelerinde 30 gün sonunda peynir yüzeyindeki *A. niger* spor yükünü sayılamayacak düzeye indirdiği önceki paragraflarda belirtilmişti. Bu nedenle MIC değerine ulaşabilmek için sadece 0,5 ve 1,5 mg NA ve iki madde arasındaki etkileşimi belirlemek amacıyla da 0,5 mg NA+1,5 ml BE ve 1,5 mg NA+1,5 ml BE içeren G filmlerin peynir yüzeyindeki *A. niger* üzerine etkileri de denenmiştir. Tablo 4.12 ve Şekil 4.25'den de görüleceği üzere 1,5 mg NA sporları sayılamayacak düzeye indirmiştir. 0,5 mg seviyesinde ise yine NA ve BE arasında istatistiksel olarak çok önemli olmayan bir sinerji mevcuttur.

Tablo 4.12 NA+BE içeren G filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş *A. niger* yüküne (log CFU/g) etkisi

İşlem	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün
1	0	0		sayılamayacak kadar çok
2	0	0		sayılamayacak kadar çok
3	3,58±0,94	6,91±0,73	7,88±1,14	8,36±1,23
4	3,02±0,49	2,89±0,4	7,83±1,44	8,38±1,93
5	0	0		sayılamayacak kadar çok
6	3,45±0,45	2,9±0,15	2,3±0	1±0,15
7	3,33±0,42	2,8±0,31	2,18±0,14	büyüme yok
8	3,25±0,65	2,54±0,28	2,18±0,11	büyüme yok
9	3,34±0,65	2,48±0,21	2±0,15	büyüme yok

1= işlem görmemiş peynir, 2= UV uygulanmış peynir, 3= *A. niger* inoküle edilmiş peynir, 4= *A. niger* inoküle edilmiş +G kontrol film, 5= işlem görmemiş +G kontrol film, 6= G film (0,5 mg NA), 7= G film (0,5 mg NA+1,5 ml BE/10g fs), 8= G film (1,5 mg NA+1,5 ml BE/10g fs)



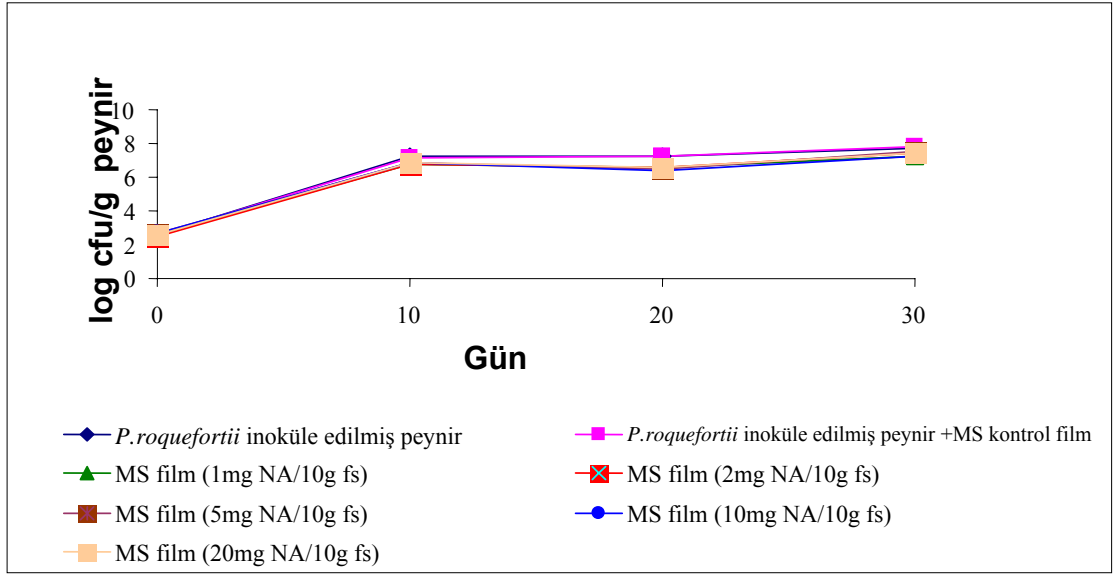
Şekil 4.25 Çeşitli konsantrasyonlarda NA+BE içeren G filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilmiş *A. niger* üzerine etkisi

NA içeren G ve MS filmlerin buzdolabı koşullarında saklama sırasında kaşar peyniri üzerine inoküle edilmiş *P. roquefortii*'ye karşı etkisi Tablo 4.13-14 ve Şekil 4.26-29'da gösterilmiştir. Otuz günlük saklama sırasında kontrol peynirleri üzerine inoküle edilen *P. roquefortii* sayısı 2,54'den 7,74 cfu/g'a yükselmiştir. Kontrol ve NA içeren MS ve G filmlerle sarılan peynirlerin spor sayısında önemli bir düşüş olmamıştır. Besiyerinde yapılan çalışmalarda NA bu küfe karşı etkili iken peynir üzerinde aynı etkinin görülmemesi ilginçtir. Bu çalışmalar sırasında *P. roquefortii* için peynirin oldukça iyi bir besiyeri olduğu görülmüştür. *P. roquefortii* peynir üzerinde besiyerine nazaran daha kısa zamanda ve dah iyi bir büyüme gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle bu küfün NA'e karşı direnci besiyeri ortamına göre daha çok olabileceği ve NA peynir üzerinde uygulandığında *P. roquefortii*'ye karşı etkisiz kalmış olduğu sonucuna varılabilir. Antifungal madde içeren filmlerle sarılmış örneklerde küf büyümesi özellikle kenarlarda olmuştur. Besiyerinde yapılan çalışmalarda, NA ve BE kombinasyonunun *P. roquefortii*'ye karşı herhangi bir sinerjistik etkisi gözlenmediğinden peynir uygulamalarında da bu madde kombinasyonlarının etkisi denenmemiştir.

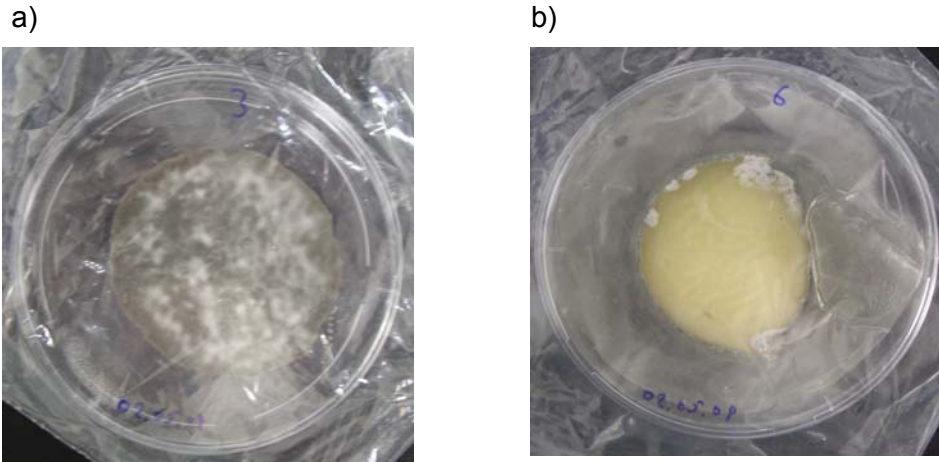
Tablo 4.13 NA içeren MS filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş *P. roquefortii* yüküne (log CFU/g) etkisi

İşlem	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün
1	0	sayılamayacak kadar çok		
2	0	sayılamayacak kadar çok		
3	2,54±0.17	7,22±1,38	7,25±1,9	7,74±0,64
4	2,6±0.33	7,17±1,31	7,23±1,61	7,84±0,83
5	0	sayılamayacak kadar çok		
6	2,54±0.18	6,76±1,35	6,57±1,06	7,27±0,88
7	2,48±0.09	6,77±1,41	6,60±1,33	7,41±1,13
8	2,68±0.49	6,86±1,25	6,47±1,66	7,49±0,98
9	2,65±0.05	6,87±1,06	6,40±1,67	7,25±0,74
10	2,60±0.27	6,90±0,78	6,57±1,73	7,40±0,24

1= işlem görmemiş peynir, 2= UV ile işlem görmüş peynir, 3= *P. roquefortii* inoküle edilmiş peynir, 4= *P. roquefortii* inoküle edilmiş +MS kontrol film, 5= işlem görmemiş+MS kontrol film, 6= MS film (1 mg NA/10g fs), 7= MS (2 mg NA/10g fs), 8= MS film (5 mg NA/10g fs), 9= MS film (10 mg NA/10g fs), 10= MS film (20 mg NA/10g fs)



Şekil 4.26 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren MS filmlerin kaşar peyniri üzerine inoküle edilmiş *P. roquefortii* üzerine etkisi

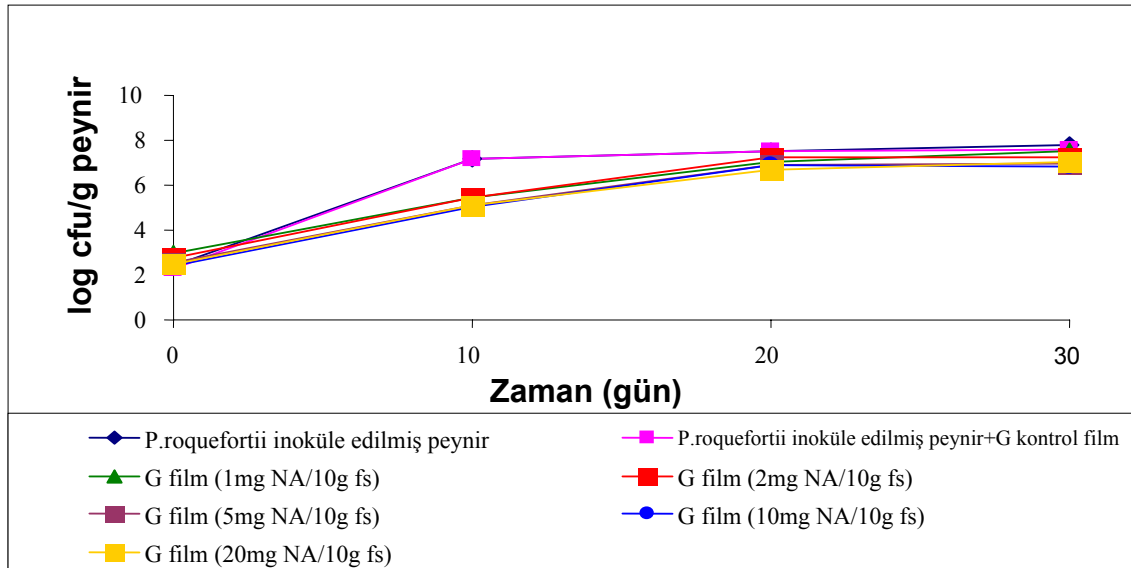


Şekil 4.27 Otuz gün saklama süresi sonunda MS filmlerin peynir yüzeyindeki *P. roquefortii*'ye etkisi a) sarılmamış kontrol peynir b) 5mg NA/10g fs

Tablo 4.14 NA içeren G filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş *P. roquefortii* yüküne (log CFU/g) etkisi

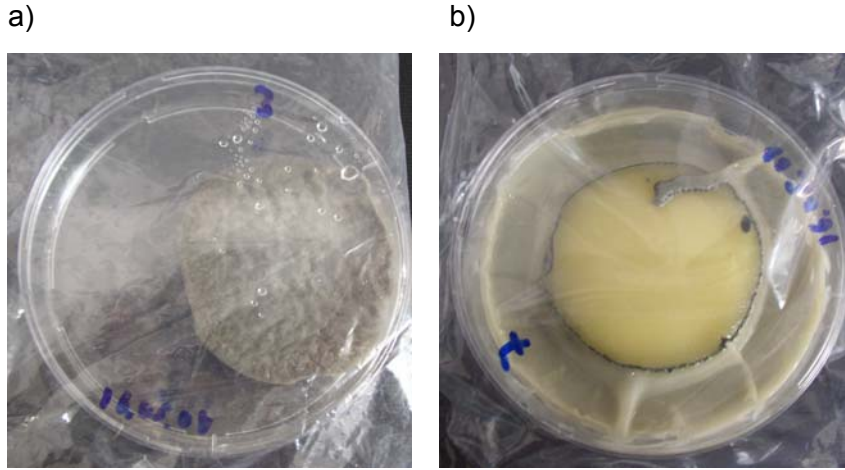
İşlem	0. Gün	10. Gün	20. Gün	30. Gün
1	0	sayılamayacak kadar çok		
2	0	sayılamayacak kadar çok		
3	2,40±0	7,14±1,84	7,55±1,67	7,78±0,73
4	2,30±0	7,15±1,73	7,52±1,95	7,61±1,66
5	0	sayılamayacak kadar çok		
6	2,94±0,31	5,47±1,95	7,06±1,8	7,50±1,76
7	2,76±0,65	5,44±0,63	7,25±1,79	7,24±1,7
8	2,54±0,28	5,11±1,73	6,89±1,43	6,99±1,33
9	2,40±0	5,05±1,88	6,91±2,6	6,83±1,06
10	2,51±0,18	5,13±0,79	6,66±1,44	7,05±1,13

1= işlem görmemiş peynir, 2= UV ile işlem görmüş peynir, 3= *P. roquefortii* inoküle edilmiş peynir, 4= *P. roquefortii* inoküle + G kontrol film, 5= işlem görmemiş+ G kontrol film, 6= G film (1 mg NA/10g fs), 7= G film (2 mg NA/10g fs), 8= G film (5 mg NA/10g fs), 9= G film (10 mg NA/10g fs), 10= G film (20 mg NA/10g fs)



Şekil 4.28 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren G filmlerin kaşar peyniri yüzeyine inoküle edilmiş *P. roquefortii* üzerine etkisi





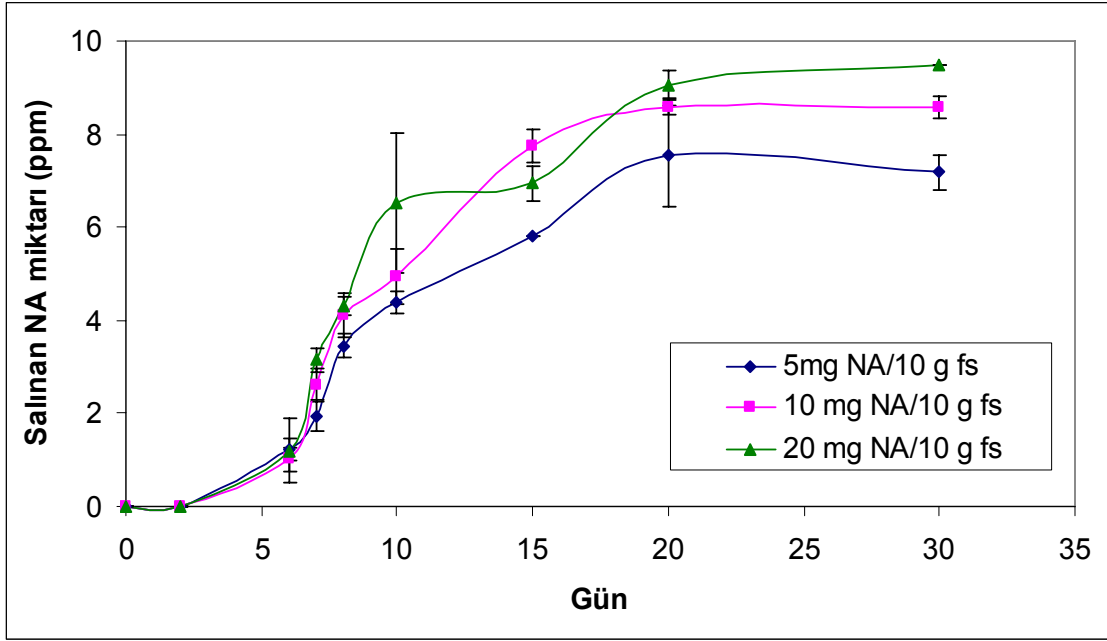
Şekil 4.29 Otuz gün saklama süresi sonunda G filmlerin peynir yüzeyindeki *P. roquefortii*'ye etkisi a) sarılmamış kontrol peynir b) 5mg NA/10g fs

Literatürde biyopolimerler içine eklenen NA'nin antifungal etkisi üzerine değişik çalışmalar mevcuttur. Örneğin Hami kavunlarının paketlenmesinde kullanılan NA eklenmiş kitosan-polietilen mikroemulsiyon çift tabakalı filmi 20 günlük oda sıcaklığı depolaması sırasında *Alternaria alternate* ve *Fusarium semitectum* patojenik küflerinin büyümesini engellemiştir (CONG ve DİĞ., 2007). Başka bir çalışmada ise %0,05 NA içeren polivinil asetat malzemesi peynirlerin yüzeyinde oluşan ve istenmeyen küf büyümesini engellemiştir (REPS ve DİĞ., 2002).

Bu çalışmanın bu bölümünün sonuçları özetlenecek olursa 30 gün süresince 10°C'de saklama sırasında NA içeren MS ve G filmler kaşar peyniri üzerine inoküle edilen *A. niger*'a karşı antifungal etki göstermişlerdir. 5 mg NA/10g fs içeren MS filmler yüzeydeki küf büyümesini kontrol örneklere göre 1,5 log düşürmüştür. 2 mg NA/10g fs içeren G filmler ise büyümeyi tamamen durdurmuştur.

#### 4.7 Biyopolimerlerden Antimikrobiyal Maddelerin Salınımı

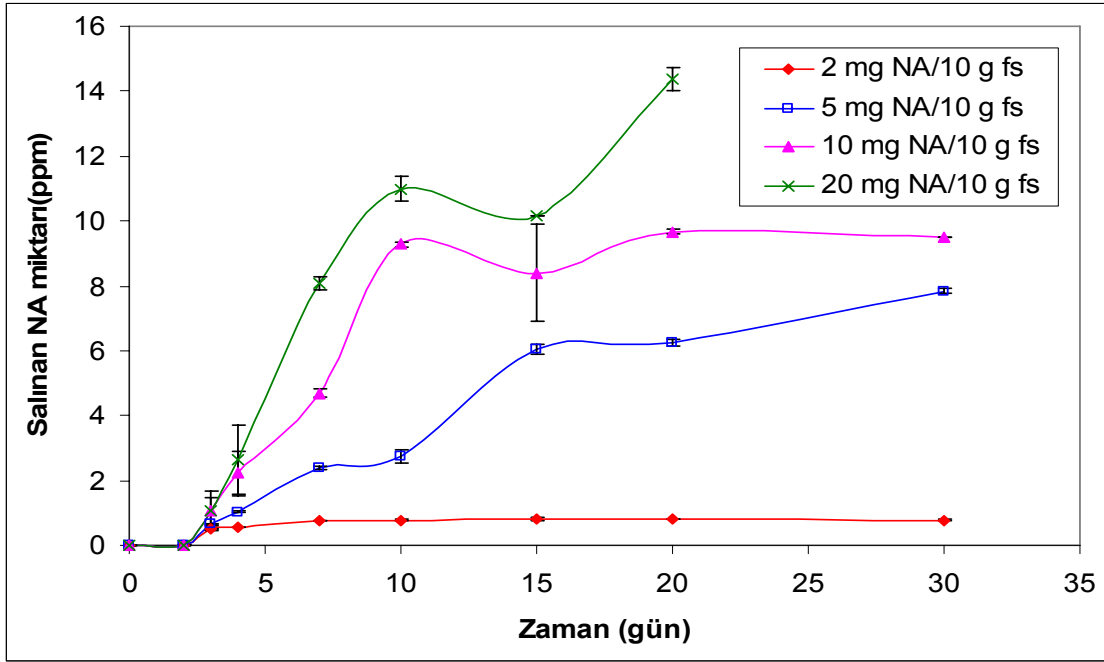
Antifungal etkinlikleri belirlenen biyopolimerlerin aktif madde salınım profilleri de tespit edilmiştir. Şekil 4.30 ve 4.31 değişik konsantrasyonlarda NA içeren MS ve G filmlerden buzdolabı koşullarında NA'in zamana karşı salınım grafiklerini göstermektedir. İlk grafiğe göre 10 ve 20 mg NA içeren filmlerin salınım profilleri arasında istatistiksel bir farklılık yoktur. 5 mg NA içeren filmde salınım 10 ve 20 mg NA içeren filmlere göre daha azdır. Bu polimerlerden salınım yaklaşık 15 gün civarında bir platoya ulaşmaktadır. Ancak bu üç film de *A. niger* sayısında 2 log düşüşe yol açarken *P. roquefortii*'nin büyümesini engelleyemektedir. Sonuç olarak MS filme 5 mg NA'den fazlasını eklemek gereksizdir.



Şekil 4.30 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren MS filmlerden NA kaşar peynirine 8°C'de salınım profilleri

Şekil 4.30 değişik konsantrasyonlarda NA içeren G filmlerden buzdolabı koşullarında NA'nin zamana karşı salınım grafiğini göstermektedir. Bu grafiğe göre 2 mg NA içeren filmlerden salınım diğerlerine göre oldukça azdır. Salınım filmlerin NA içeriğine bağlı olarak artmaktadır. 2 mg NA içeren filmlerden salınım 3-4 gün içinde kararlı duruma ulaşırken bu durum daha yüksek konsantrasyonlarda 10-15 günü bulmaktadır.

Otuz gün sonunda G ve MS filmlerinden salınım miktarları karşılaştırıldığında sadece 20 mg NA/10 g fs içeren G ve MS filmlerden salınım miktarlarında önemli bir farklılık görülmektedir. 5 ve 10 mg NA/10 fs içeren filmlerde G filmde salınım MS filmlere göre daha yüksek olsa da aradaki fark çok belirgin değildir. Bu da uygulaması yapılabilecek konsantrasyonlarda NA salınımının film matrisinden bağımsız olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.31 Çeşitli konsantrasyonlarda NA içeren G filmlerden NA kaşar peynirine 8°C'de salınım profilleri

## 5. Sonuçlar

Bu çalışmanın ilk amacı doğal kaynaklı ALF, BE, JG ve NA'nin tek tek ve kombinasyonlar halinde gıda bozulmalarında önemli olan üç patojenik bakteri (*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*) ve iki küfe (*A. niger* ve *P. roquefortii*) karşı etkilerini belirlemektir. Bunun için iki tip antimikrobiyal test kullanılmıştır: mikropłaka ve disk difüzyon testleri. Mikropłaka testi sıvı ortamda gerçekleştirilirken difüzyon testi katı ortam kullanılarak yapılmıştır. Antimikrobiyal maddelerin gıdaya hangi yolla uygulanacağına bağlı olarak antimikrobiyal aktivite testinin seçilmesinin önemi de bu çalışmanın bir sonucu olarak görülmüştür. Örneğin ALF, sıvı ortamda oldukça etkin antimikrobiyal özelliğe sahipken katı ortamda herhangi bir etki göstermemiştir. Bunun sonucu olarak da ALF batırma tipi uygulamalarda antimikrobiyal etki gösterirken paket malzemelerine eklendiğinde herhangi bir olumlu sonuç vermemiştir.

Mikropłaka yöntemine göre ALF'nin üç bakteriye karşı da oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. MIC değerleri sırası ile *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* için %0,1, %1 ve %0,5'dir. BE, %15 ve daha yüksek konsantrasyonlarda *L. monocytogenes*'in büyümesini tamamen durdurmuştur. *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis*'in büyümesi %30 BE konsantrasyonu ile kısmen engellenmiştir. JG'nin bu çalışmada kullanılan

bakterilerin büyümesini durdurmadığı gözlenmiştir. BE, *E. coli* O157:H7'ye karşı kullanıldığında ALF'nin aktivitesini 2-3 kat artırmıştır. Et yüzeyine solüsyona batırma yolu ile yapılan uygulamalarda alınan sonuçlara göre ALF sırasıyla %0,5 ve %3 konsantrasyonlarında *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 sayısını yaklaşık 2 log düşürmüştür. *S. Enteritidis* üzerindeki etkisi ise daha azdır ve %2,5 seviyesinde 0,8 log bir düşüş sağlanmıştır. BE, %45 seviyesinde kullanıldığında üç patojenik mikroorganizmanın da et üzerinde büyümesinin engellenmesinde oldukça etkili olmuştur. BE ayrıca saklama süresinde ette oksidasyonun engellenmesinde de etkili olmuştur. Bu sonuçlara dayanarak ALF ve BE'nin et yüzeyinde batırma yolu ile kullanılmasının gıda kaynaklı hastalıklara yol açan önemli patojen bakterilerin sayısının azaltılmasında etkili olduğu söylenebilir. Çelik yüzeylerin özellikle %45 seviyesinde BE'na batırılması da yüzeyde *E. coli* O157:H7 büyümesini önemli ölçüde düşürmüştür.

Disk difüzyon testleri, ALF, JG ve BE'nin *A. niger* and *P. roquefortii*'ye karşı herhangi bir fungal aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Ancak, NA bu küflere karşı oldukça etkilidir. NA'nın *A. niger* and *P. roquefortii*'ye karşı MIC değerleri 750 ppm olarak belirlenmiştir. Peynirlerin NA'e batırma yolu ile uygulanması da oldukça olumlu sonuçlar vermiştir ve iki küfünde peynir üzerinde büyümesi önemli ölçüde önlenmiştir. İki küf içinde büyümenin durdurulduğu NA konsantrasyonu 750 ppm'dir.

Bu doğal maddeler aynı zamanda G ve MS'dan yapılan biyopolimerlere de eklenmiştir. Filmlere eklenen aktif maddeler arasında sadece NA içeren biyopolimerler *A. niger* and *P. roquefortii*'ye karşı etkili olmuşlardır. Besiyeri üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite testlerine göre NA içeren MS ve G filmlerin sırası ile *A. niger* ve *P. roquefortii*'ye karşı etki gösterdikleri en düşük konsantrasyonlar 2 ve 1 mg NA/10g fs'dur. BE tek başına antifungal etkiye sahip olmasa da *A. niger*'in büyümesinin engellenmesinde NA ile sinerjik etkileşime girmiştir.

NA'nin iki biyopolimere de eklenmesi bu malzemelerin su buharı geçirgenliklerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak, yüksek NA konsantrasyonlarında MS filmlerin mukavemet özelliklerinde az da olsa bir değişme olmuştur. Ayrıca NA ile beraber BE içeren G filmlerin mekanik özelliklerinde de bir düşme gözlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu sonuçlarına göre NA yüksek konsantrasyonlarda film içinde kristallenmektedir.

*A. niger* inoküle edilmiş kaşar peynirinin NA içeren G ve MS filmler ile sarılmasıyla gerçekleştirilen ve 10°C'de 30 gün süren çalışma sonucunda bu filmlerin küflerin engellenmesinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. MS filmler 5 mg NA/10 g fs konsantrasyonunda peynir yüzeyindeki *A. niger* sayısında 2 log düşüş sağlarken G filmler 2 mg NA seviyesinde büyümeyi engellemişlerdir. Ancak bu iki filmde peynir yüzeyindeki *P. roquefortii* üzerinde etkili olmamışlardır. Gerek küf gerekse bakteriler üzerinde yapılan

alışmalar antimikrobiyal maddelerin, besiyerlerinde mikroorganizmalar üzerinde oldukça etkiliyken gıda üzerinde bu etkilerinin zayıfladığını veya yok olduğunu göstermiştir. Bundan dolayı bu tür çalışmalarda antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde sadece besiyeri değil uygun gıdanın da kullanılması gerekli olduğu sonucu çıkmaktadır. Ayrıca bu filmlerden NA salınım profilleri, G filmlerden salınımın MS filmlere göre çok önemli olmamakla biraz daha fazla olduğunu göstermiştir. NA, gerek batırma yolu ile gerekse biyofilmlere eklenerek peynirde bozulmaya yol açan küflerin önlenmesinde oldukça etkili olmuştur.

## Kaynaklar

- ABDEL-HAFEZ, S.I.I., El-said, A.H.M., Effect of Garlic, Onion and Sodium Benzoate on the Mycoflora of Pepper, Cinnamon and Rosemary in Egypt, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39:67-77, (1997).
- AN, D.S., Kim, Y.M., Lee, S.B., Paik, H.D., Lee, D.S., Antimicrobial Low-Density Polyethylene Film Coated with Bacteriocins in Binder Medium, *Food Science & Biotechnology*, 9, 4-20, (2000).
- ANDERSON, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W., Baker, E.N., Structure of Human Lactoferrin: Crystallographic Structure Analysis and Refinement at 2,8Å Resolution, *Journal of Molecular Biology*, 209, 711-734, (1989).
- APPENDINI, P., Hotchkiss, J.H., Review of Antimicrobial Food Packaging, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 113-126, (2002).
- ASTM, *Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, D882-91*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, (1996).
- ASTM, *Standard Test Methods for for Water Vapor Transmission of Materials, E96*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, (1980).
- BAKER, S.H., Ekinci, F.Y., Quattlebaum, T.R., Barefoot, S.F., Sensitization of Gram-negative and Gram-positive Bacteria to Jensenin G by Sublethal Injury, *Journal of Food Protection*, 67, 1009-13, (2004).
- CELİKTAS, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., Baser, K.H.C., Antimicrobial Activities of Methanolic Extract and Essential Oils of *Rosmarinus officinalis*, Depending on Location and Seasonal Variations, *Food Chemistry*, 100, 553-9, (2005).
- CERVENKA, L., Peskova, I., Foltynova, E., Pejchalova, M., Brozkova, I., Vytrasova, J., Inhibitory Effects of Some Spice and Herb Extracts against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*, *Current Microbiology*, 53, 435-9, (2006).
- CEYLAN, E., Fung, Y.C., Antimicrobial Activity of Spices, *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12, 1-55, (2004).
- CONG, F., Zhang, Y., Dong, W. Use of Surface Coatings with Natamycin to Improve the Storability of *Hami melon* at Ambient Temperature, *Postharvest Biology and Technology*, 46: 71-75, (2007).
- COWAN, M.M., Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-82, (1999).

CUTTER, C.N., Siragusa, G.R., Growth of *Brochothrix thermosphacta* in Ground Beef Following Treatments with Nisin in a Calcium Alginate Gel, *Food Microbiology*, 14, 425-430, (1997).

DAVIDSON, P.M., Branen, A.L., *Antimicrobials in Foods*, CRC Press, Boca Raton, FL, ABD, (1993).

DAWSON, P.L., Acton, J.C., Han, I.Y., Padgett, T. Orr, R., Larsen, T., Incorporation of Antibacterial Compounds into Edible and Biodegradable Packaging Films, *Research and Development Activities Report for Military Food and Packaging Systems*, 47, 203-210, (1995).

DAWSON, P.L., Carl, G.D., Acton, J.C. Han, I.Y., Effect of Lauric Acid & Nisin Impregnated Soy-Based Films on the Growth of *Listeria monocytogenes* on Turkey Bologna, *Poultry Science*, 81, 721-726, (2002).

DE OLIVEIRA, T.M., Soares, N.F.F., Pereira, R.M., Fraga, K.F., Development and Evaluation of Antimicrobial Natamycin-Incorporated Film in Gorgonzola Cheese Preservation, *Food Packaging and Technology*, 20, 147–153, (2007).

DEL CAMPO, S., Amiot, M.J., Nguyen-The, C. Antimicrobial Effect of Rosemary Extract, *Journal of Food Protection*, 63, 1359-1368, (2000).

DRAUGHON, F.A., Use of Botanicals as Biopreservatives in Foods, *Food Technology*, 58, 20-27, (2004).

DUFOUR, M., Simmonds, R.S., Bremer, P.J., Development of Method to Quantify *in vitro* Synergistic Activity of “Natural” Antimicrobials, *International Journal of Food Science*, 85, 249-58, (2003).

ERDOHAN, Z.Ö., Turhan, K.N., Barrier and Mechanical Properties of Methylcellulose –Whey Protein Films, *Packaging Technology and Science*, 18, 295-302, (2005).

GARREN, D., Harrison, M., Barefoot, S., Inhibitory Potential of the Bacteriocin, Jensenin G, on *Clostridium botulinum* types A, B, and E Spore Germination, the Joint Meeting of the North Carolina, South Carolina, and Southeastern Branches, American Society for Microbiology, Athens GA, November 3-5, 1994.

GENNADIOS, A. *Protein-Based Films and Coatings*, CRC Press, Boca Raton, FL, (2002).

GENNADIOS, A., Hanna, M.A., Kurth, L.B., Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review, *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 30, 337-350, (1997).

GRINSTEAD, D.A., Barefoot, S.F., Jensenin G, a Heat Stable Bacteriocin Produced by *Propionibacterium jensenii* P126, *Applied Environmental Microbiology*, 58, 215-220, (1992).

HA, J.U., Kim, Y.M., Lee, D.S., Multilayered Antimicrobial Polyethylene Films Applied to the Packaging of Ground Beef, *Packaging Technology and Science*, 15, 55-62, (2001).

HOOVER, D., Bacteriocins: Activities and Application, *Encyclopedia of Microbiology*, ed. Lederberg, J., Vol.1, Academic Press, New York, (1992).

ISO, *Cheese, cheese rind and processed cheese -- Determination of natamycin content -- Part 2: High-performance liquid chromatographic method for cheese, cheese rind and processed cheese*, 9233-2, International Organization for Standardization, Geneva, (2007).

KAPLAN, D.L., Mayer, J.M., Ball, D., Mccassie, J., Allen, A.L., Stenhouse, P., Fundamentals of Biodegradable Polymers, *Biodegradable Polymers in Packaging*, Technomic Publication, Basel, (1993), Pp. 1-42.

KIM, Y., Paik, H., Lee, D., Shelf Life Characteristics of Fresh Oysters and Ground Beef as Affected by Bacteriocin Coated Plastic Packaging Film, *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 82, 998-1002, (2002).

KO, S., Janes, M.E., Hettiarachchy, N.S, Johnson, M.G., Physical and Chemical Properties of Edible Films Containing Nisin and Their Action against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Science*, 66, 1006-11, (2001).

KROCHTA, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M., *Edible Coating and Films to Improve Food Quality*, CRC Press, Boca Raton, FL, ABD, (1994).

LEAL, P.F., Braga, M.E.M., Sato, D.N., Carvalho, J.E., Marques, M.O.M., Meireles, M.A.A., Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2520-2525, (2003).

LIMJAROEN, P., Ryser, E., Lockhart, H. Harte, B., Development of a Food Packaging Coating Material with Antimicrobial Properties, *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 19, 95-109, (2003).

LOCKE, L.L., Morgan, J.B., Naidu, A.S. Activated Lactoferrin. *Antimicrobial Spray*, 1:4, (2003).

MADSEN, H.L., Sorensen, B., Skibsted, L.H., Bertelsen, G., The Antioxidative Activity of Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in Dressing Stored Exposed to Light or in Darkness, *Food Chemistry*, 63, 173-80, (1998).

McCORMICK, K. F., Han, I.Y., Acton, J.C., Sheldon B. W., Dawson, P.L., In-Package Pasteurization Combined with Nisin Impregnated Packaging Film to Inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in Turkey Bologna, *Journal of Food Science*, (2003).



McHUGH, T.H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J.M., Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects, *Journal of Food Science*, 58, 899–903, (1993).

MEAD, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, P.M., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., Food-related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, 5, 607-625 (1999).

MILLER, K.S., Krochta, J.M., Oxygen & Aroma Barrier Properties of Edible Films: a Review, *Trends in Food Science & Technology*, 8, 228-237, (1997).

MING, X., Weber, G.H. Ayres J.W., Sandine, W.E., Bacteriocin Applied to Food Packaging Materials to Inhibit *Listeria monocytogenes* on Meats, *Journal of Food Science*, 62, 413-415, (1997).

MOREIRA, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I., Inhibitory Parameters of Essential Oils to Reduce a Foodborne Pathogen, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 38, 565-570, (2005).

NAIDU, A.S., Activated Lactoferrin - A New Approach to Meat Safety, *Food Technology*, 56, 40-5, (2002).

NAIDU, A.S., Tulpinski, J., Gustilo, K., Nimagudda R., Morgan, J.R., Activated Lactoferrin Part 2: Natural Antimicrobial for Food Safety, *Agro Food Industry Hi-Tech*, May/June, 27-31, (2003).

ORR, R.V., Han, I.Y., Acton, J.C., Dawson, P.L., Comparison of the Zone Inhibition and Enumeration Assay for Evaluating the Effectiveness of Antimicrobial Packaging Films, *Proceedings of 42nd International Congress of Meat Science & Technology*, Vol. 43, American Meat Science Association, (1997), Pp.26-28.

OUSSALAH, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. Inhibitory Effect of Selected Plant Essential Oils on the Growth of Four Pathogenic Bacteria: *E .coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 18, 414-420, (2007).

OZELHASTANELER.

[http://www.ozelhastaneler.org.tr/images/dosyalar/belgeler/istatistik/Hastanelere\\_](http://www.ozelhastaneler.org.tr/images/dosyalar/belgeler/istatistik/Hastanelere_)

[Yatan\\_Hastalarin\\_Secilmis\\_150Hastalik\\_Nedenine.xls](#), (2008).

PADGETT, T., Han, I.Y., Dawson, P.L., Incorporation of Food Grade Antimicrobial Compounds into Biodegradable Packaging Films, *Journal of Food Protection*, 61, 1330-1335, (1998).

PRANOTO, Y., Rakshit, S. K., Salokhe, V. M., Enhancing Antimicrobial Activity of Chitosan Films by Incorporating Garlic Oil, Potassium Sorbate and Nisin, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 38, 859-865, (2005).

POCHAT-BOHATIER, C., SACHEZ, J., GONTARD, N., Influence of Relative Humidity on Carbon Dioxide Sorption in Wheat Gluten Films, *Journal of Food Engineering*, 77, 983-91, (2006).

QUATTARA, B., SIMARD, R.E., HOLLEY, R.A., PIETTE, G.J.P., BEGIN, A., Antibacterial Activity of Selected Fatty Acids and Essential Oils against Six Meat Spoilage Organisms, *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162, (1997).

QUINTAVALLA S., VICINI, L. Antimicrobial Food Packaging in Meat Industry, *Meat Science*, 62, 373-380, (2002).

RAGHAVAN, S., RICHARDS, M.P., Comparison of Solvent and Microwave Extracts of Cranberry Press Cake on the Inhibition of Lipid Oxidation in Mechanically Separated Turkey, *Food Chemistry*, 102, 818-826, (2007).

RAYNER, J. VEEH R., FLOOD, J., Prevalence of Microbial Biofilms on Selected Fresh Produce and Household Surfaces, *International Journal of Food Microbiology*, 95, 29-39, (2004).

REPS, A., DRYCHOWSKI, L., TOMASIK, J., NIEWSKA, K., Natamycin in Ripening Cheeses, *Pakistan Journal of Nutrition*, 1:243-247, (2002).

ROBLES-SIMENTAL, M.C., GALLEGOS-INFANTE, J.A., MORALES-CASTRO, J., Evaluation of an Edible Film Containing Oregano Essential Oil as Antimicrobial Agent, IFT Annual Meeting, Las Vegas, NV, (2004).

ROJAS-GRAÜ, M., AVENA-BUSTILLOS, R.J., OLSEN, C., FRIEDMAN, M., HENIKA, P., MARTIN BELLOSO, O., PAN, Z., MCHUGH, T.H., Effects of Plant Essential Oils and Compounds on Mechanical, Barrier and Antimicrobial Properties of Alginate-Apple Puree Edible Films, *Journal of Food Engineering*, 81, 634-41, (2007).

ROLLER, A., COVILL, N., The Antifungal Properties of Chitosan in Laboratory Media and Apple Juice, *International Journal of Food Microbiology*, 47, 67-77, (1999).

SAĞLIK BAKANLIĞI, Türkiye’de Hastanelere Yatan Hastaların A Listesine Göre Dağılımı, [http://www.saglik.gov.tr/TR/Genel/dosyagoster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=9410&DOSYAISIM=053\\_58.htm](http://www.saglik.gov.tr/TR/Genel/dosyagoster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=9410&DOSYAISIM=053_58.htm), (2001).

SAMBROOK, J., RUSSELL, D., *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY, ABD, (2006).

SANTOS, A.C.P., Soares, N.F.F., de Andrade, N.J., Silva, L.H.M., Camilloto, G.P., Bernardes, P.C., Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation, *Packaging Technology and Science*, 21, 375-383, (2008).

SEBTİ, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S., Coma, V., Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination, *Journal of Food Science*, 70, M100–M104, (2005).

STARK, J, *Natamycin: An Effective Fungicide for Food and Beverages*, *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*, ed: Roller, S., Woodhead Publishing, Cambridge, İngiltere, (2003).

SUPPAKUL, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S.W., Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and Its Applications, *Journal of Food Science*, 68, 408-420, (2003).

THEIVENDRAN, S., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters, *Journal of Food Science*, 71, 39–44, (2006).

TURHAN, K. N. Şahbaz, F., Water Vapor Permeability, Tensile Properties and Solubility of Methylcellulose-Based Edible Films, *Journal of Food Engineering*, 61, 459-66, (2004).

ÜNLÜTÜRK, A., Turantaş, F., *Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi*, Meta Basım, Bornova-İzmir, (2002).

WEBER, C.J., Haugaard, V., Festersen, R., Bertelsen, G., Production and Application of Biobased Packaging Materials for the Food Industry, *Food Additives and Contaminants*, 19, 172-177, (2002).

WEINBRENNER, D.R., Barefoot, S.F., Grinstead, D.A., Inhibition of Yogurt Starter Cultures by jenseniin G, a Propionibacterium Bacteriocin, *Journal of Dairy Science*, 80, 1246-1253, (1997).

VAR, Z., Sahan, N., Kabak, B., Golge, O., The Effects of Natamycin on the Shelf Life of Yogurt, *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 55, 7-9, (2004).

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J.A., Antifungal Activities of Thyme, Clove and Oregano Essential Oils, *Journal of Food Safety*, 27, 91-101, (2007).

ZIVANOVIC, S., Chi, S., Draughon, A.N., Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils, *Journal of Food Science*, 70, 45-51, (2005).

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No: 104 O 543</b>
<b>Proje Başlığı:</b> Gıdalarda Doğal Antimikrobiyallerin Kullanıldığı Biyoaktif Koruma Sistemleri Geliştirilmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Doç. Dr. F. Banu Özen, Yrd Doç. Dr. Ferda Soyer Dönmez, Doç. Dr. Yeşim Ekinci
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Urla-İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> TÜBİTAK, TOVAG Atatürk Bulvarı No:220, Kavaklıdere, Ankara
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 1 Nisan 2005-1 Ekim 2009
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu çalışmada amaç aktif laktoferrin, biberiye ekstraktı, Jenseenin G ve natamycin'in ve kombinasyonlarının antimikrobiyal özelliklerinin önce besiyerinde tespit edilmesi ve daha sonra bunlardan etkili olanların gıdalara batırma, püskürtme ve biyopolimerler içine dahil edilme yolu ile uygulanmasıdır. Aktif laktoferrin ve biberiye ekstraktı et üzerine batırma yolu ile uygulandıklarında patojenik bakterilerin sayılarının düşmesinde etkili olmuşlardır. Natamycin ise batırma ve biyopolimerlerin içine eklenerek peynirlerde küf oluşumunu engellemede kaydedeğer bir etki göstermiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Aktif laktoferrin, natamycin, biberiye ekstraktı, jenseenin G, biyopolimer, metil selüloz film, gluten film
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <u>Bilimsel Dergilerde Yayınlanan Makaleler:</u> TURE, H., Eroglu, E., Ozen, B., Soyer, F., Physical Properties of Biopolymers Containing Natamycin and Rosemary Extract, <i>International Journal of Food Science and Technology</i> , 44, 402-8, (2009). TURE, H., Eroglu, E., Soyer, F. Ozen, B., Antifungal Activity of Biopolymers Containing Natamycin and Rosemary Extract against <i>Aspergillus niger</i> and <i>Penicillium roquefortii</i> , <i>International Journal of Food Science and Technology</i> , 43, 2026-32, (2008).

#### Uluslararası Konferanslarda Sunulan Bildiriler:

SOYER, F., Eroglu, E., Ture, H., Ozen, B., Antimicrobial Activities of Activated Lactoferrin and Rosemary Extract against *L. monocytogenes* on Meat, 2nd Safe Consortium International Congress on Food Safety, Girona-Spain, (2009) pp:68.

TURE, H., Eroglu, E., Soyer, F. Ozen, B., Antifungal Activities of Natamycin and Natamycin Incorporated Biobased Films against *Penicillium roquefortii*, 2nd International Congress on Food and Nutrition, Istanbul, (2007) p: 226.

EROGLU, E., Ture, H., Soyer, F. Ozen, B., Activity of Activated Lactoferrin on *L. monocytogenes* in Different Media Strength, 2nd International Congress on Food and Nutrition, Istanbul, (2007) p:137.

SOYER, F., Eroglu, E., Ture, H., Ozen, B., Effect of Natural Antimicrobial Agents on Foodborne Pathogens, American Society of Microbiology 107<sup>th</sup> General Meeting, Toronto-Canada, (2007).

EROGLU, E., Ture, H., Ekinci, Y., Ozen, B., Soyer, F., Interaction of Active Lactoferrin and Jensenin G Against Foodborne Pathogens, American Society of Microbiology 107<sup>th</sup> General Meeting, Toronto-Canada, (2007).

TURE, H., Eroglu, E., Soyer, F., Ozen, B., Antifungal Activities of Natamycin and Natamycin Incorporated Wheat Gluten and Methyl Cellulose Biofilms, American Society of Microbiology 107<sup>th</sup> General Meeting, Toronto-Canada, (2007).

TURE, H., Eroglu, E., Soyer, F. Ozen, B., Testing the Antimicrobial Properties of Edible Films Incorporated with Natamycin and Rosemary Extract, 2nd Safoodnet Seminar, Istanbul, (2007) p:104.

TURE, H., Eroglu, E., Soyer, F., Ozen, B., Antimicrobial Effect of Natural Antimicrobial Agents on Food Borne Pathogens, 2nd Safoodnet Seminar, Istanbul, (2007) p:91.

#### Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

TÜRE, H., Eroğlu, E., Özen, B., Soyer, F., Natamycin İçeren Biyopolimerlerin Kaşar Peynirinde Gelişen *Aspergillus niger* Üzerine Antifungal Etkisi, Gıda Mühendisliği 6. Kongresi, Antalya, (2009) p:225-229.

TÜRE, H., Eroğlu, E., Soyer, F., Özen, B., Natamycin İçeren Antifungal Metil Selüloz Filmlerin Fiziksel Özellikleri, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, (2008) p:1017-1020.

SOYER, F., Eroğlu, E., Türe, H., Ekinci-Kitiş, Y., Özen, B., Doğal Bakteriyostatik ve Bakteriyosidal Ajanların Gıda Kaynaklı Patojenler Üzerine Olan Etkileri, XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, (2006) p:386.

#### Tezler:

TÜRE, H., Physical and Antimicrobial Properties of Biofilms Containing Natural Antimicrobial Agents (Doğal Antimikrobiyal Madde İçeren Biyofilmlerin Fiziksel ve Antimikrobiyal Özellikleri), (Yüksek Lisans Tezi), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2008).

EROĞLU, E., Efficacy of Natural Antimicrobials on Food-borne Pathogens and Their Applications (Doğal Antimikrobiyallerin Gıda Kaynaklı Patojenler Üzerine Etkisi ve Uygulamaları), (Yüksek Lisans Tezi), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2008).