

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**İZMİR BÖLGESİNDE SATIŞA SUNULAN ET VE ET
ÜRÜNLERİNİN PATOJEN MİKROORGANİZMALAR
AÇISINDAN ANALİZİ VE PCR İLE BAKTERİYOSİN
ÜRETİMİNİN SAPTANMASI**

Serra TUNALIGİL

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş tarihi: 08 / 07 / 2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

Bornova-İzmir

III

Serra TUNALIGİL tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak sunulan “İzmir Bölgesinde Satışa Sunulan Et ve Et Ürünlerinin Patojen Mikroorganizmalar Açısından Analizi ve PCR ile Bakteriyosin Üretiminin Saptanması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve/...../2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ÖZET**İZMİR BÖLGESİNDE SATIŞA SUNULAN ET VE ET
ÜRÜNLERİNİN PATOJEN MİKROORGANİZMALAR
AÇISINDAN ANALİZİ VE PCR İLE BAKTERİYOSİN
ÜRETİMİNİN SAPTANMASI**

TUNALIGİL, Serra

Doktora Tezi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

Temmuz 2009, 176 sayfa

Yapılan çalışmalar sonucunda İzmir ilinden 129 adet sucuk, sosis, salam ve kıyma örneği toplanarak, marka, paketlenme, satış sezonu gibi kriterlere göre sınıflandırılmıştır. Bu örneklerde Mezofilik Aerobik Canlı sayımı, *Staphylococcus aureus* sayımı, *Bacillus cereus* sayımı, Maya-Küf sayımı, Koliform sayımı, Laktik asit bakterisi sayımı, *Clostridium perfringens* sayımı ve *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* analizleri yürütülmüş, ayrıca Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesi ve bakteriyosin aktivitesi de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, sucukta bu oranların ortalaması sırasıyla $2,8 \times 10^7$ kob/g, $1,3 \times 10^3$ kob/g, $1,7 \times 10^3$ kob/g, $4,7 \times 10^4$ kob/g, 71 EMS/g, $1,0 \times 10^8$ kob/g bulunurken, bir üründen *Salmonella* sp. izole edilmiş, *Listeria* spp. izole edilmemiştir. Sosiste bu oranlar sırasıyla $5,3 \times 10^5$ kob/g, $3,9 \times 10^2$ kob/g, $9,8 \times 10^1$ kob/g, $4,4 \times 10^1$ kob/g, 30 EMS/g, $1,3 \times 10^2$ kob/g bulunurken,

VI

salamda Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı ortalaması $9,9 \times 10^4$ kob/g, *Staphylococcus aureus* ortalaması $2,2 \times 10^2$ kob/g, *Bacillus cereus* sayısı ortalama $7,7 \times 10^1$ kob/g, Maya-Küf sayısı $1,4 \times 10^2$ kob/g, Koliform sayısı tayin limitinin altında, Laktik Asit Bakterisi sayısı ortalama $6,5 \times 10^2$ kob/g bulunmuştur. Sosis ve salamda ikişer örnekte *Salmonella* spp. izole edilmiş, salamda bir örnekte ise *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Kıymada sayım sonuçları sırasıyla ortalama, Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $5,8 \times 10^7$ kob/g, *Staphylococcus aureus* sayısı $9,0 \times 10^2$ kob/g, *Bacillus cereus* sayısı, $1,2 \times 10^3$ kob/g, Maya-Küf sayısı $4,6 \times 10^3$ kob/g, Koliform, 126 EMS/g, Laktik Asit Bakterisi Sayısı, $5,0 \times 10^2$ kob/g, olarak tespit edilirken, 2 kıyma örneğinde *Salmonella* spp., bir örnekte ise *Listeria monocytogenes* izole edilmiştir. Muhtemel *Clostridium perfringens* sayısı ortalamaları sucuk, sosis, kıyma ve salam için tayin limitinin altında bir değer olarak bulunmuştur. Paketli-Açık ürünler ve Markalı- Markasız örnekler arasındaki farklar bazı kriterler için istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Bakteriyosin aktivitesi sadece 3 laktik asit bakterisi izolatında saptanırken, antimikrobiyal aktivitenin bakteriyosin ile birlikte birçok faktöre bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Sucuk, Sosis, Salam, PCR, Bakteriyosin, Gıda Patojeni, Laktik Asit Bakterisi, Nisin, Enterocin, Pediocin

ABSTRACT

**THE ANALYSIS OF MEAT AND MEAT PRODUCTS SOLD IN
IZMIR REGION FOR PATHOGENIC MICROORGANISMS AND
THE DETECTION OF BACTERIOCIN PRODUCTION WITH
PCR.**

TUNALIGİL, Serra

PHD. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

July 2009, 176 pages

As a result of our work, 129 Turkish sucuk, Frankfurter type sausage, salami and ground meat samples were taken from the Izmir province and were classified according to criteria such as brand, packaging and season. In these samples, Mesophilic aerobic bacterial count, *S.aureus* count, *B.cereus* count, Yeast-Mold Count, Coliform bacteria count, *C. perfringens* count and *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* analyses were carried out. Apart from these, the antimicrobial and bacteriocinogenic activity of lactic acid bacteria have been investigated. According to the work, the average of the microbial analyses in sucuk samples were 2.8×10^7 cfu/g for Total Aerobic Mesophilic Bacteria Count, 1.3×10^3 cfu/g for Staphylococcus aureus count, 1.7×10^3 cfu/g for Bacillus cereus count, 4.7×10^4 cfu/g for Yeast-Mold Count, 71 MPN/g for Coliform Count, and 1.0×10^8 cfu/g for Lactic Acid Bacteria Count. For Frankfurter type sausages these were found to

VIII

be 5.3×10^5 cfu/g, 3.9×10^2 kob/ gr, 9.8×10^1 cfu/g, 4.4×10^1 cfu/g, 30 MPN/g, and 1.3×10^2 cfu/g for Total Mesophilic Aerobic Count, *Staphylococcus aureus* count, *Bacillus cereus* count, Yeast Mold Count, Coliform Count and Lactic Acid Bacteria Count respectively and for salami they were 9.9×10^4 cfu/g for Total Aerobic Mesophilic Count, 2.2×10^2 cfu/g for *Staphylococcus aureus* count, 7.7×10^1 cfu/g *Bacillus cereus* count, 1.4×10^2 cfu/g for Yeast Mold Count, and for Lactic Acid Bacteria count; 6.5×10^2 cfu/g. In salami samples, Coliform bacteria were found to be below detection limit. 2 of the sausage and salami samples were found to be positive for *Salmonella* spp. and one of the salami samples was found to contain *Listeria* spp. Ground meat counts were respectively 5.8×10^7 cfu/g, 9.0×10^2 cfu/g, 1.2×10^3 cfu/g, 4.6×10^3 cfu/g, 126 MPN/g, and 5.0×10^2 cfu/g for Total Aerobic Mesophilic Count, *Staphylococcus aureus* count, *Bacillus cereus* count, Yeast-Mold Count, Coliform Count, and Lactic Acid Bacteria Count. *Clostridium perfringens* count average values were found to be under the detection limit for sucuk, Frankfurter sausage, salami and ground meat samples. The difference between packaged and non – packaged products and branded and non-branded products were statistically different for certain criteria. As bacteriocin activity was detected only in 3 lactic acid bacterial isolates, the antimicrobial activity was decided to be a result of various factors along with bacteriocins.

Key words: Turkish Sucuk, Franfurter sausage, Salami, PCR, Food Pathogen, Bacteriocin, Lactic Acid Bacteria, Nisin, Pediocin, Enterocin

IX

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma sűresince hiçbir konuda ilgisin, yardımını ve en önemlisi, sabrını eksik etmeyen deęerli hocam Prof. Dr. Sanver Ekmekçi'ye teŐekkűrlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca Bornova Veteriner Kontrol ve AraŐtırma Enstitűsű çalıŐanlarına destek ve yardımları için teŐekkűr ederim.

Bu alıŐma Ege Ŭniversitesi Rektrlűęű AraŐtırma Fon Saymanlıęı tarafından desteklenmiŐtir (2006/Fen/021). Bu nedenle, ayrıca AraŐtırma Fonu Yönetim Kuruluna teŐekkűr ederim.

ArkadaŐım Elvin Gűngr alıŐkan'a destek ve ilgisi için;

En son olarak, aileme bana verdikleri manevi destek ve ilgileri için teŐekkűr ederim

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XV
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Et ve Et Ürünleri.	4
2.1.1. Sucuk	4
2.1.2. Emülsiyon Tipi Et Ürünleri (Sosis-Salam).....	6
2.1.3. Et ve Kıyma	8
2.2. Gıdalarda Patojen Bakteriler ve Fungal Etkenler.....	9
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.2.2. <i>Clostridium</i> spp.....	12
2.2.3. <i>Bacillus cereus</i>	14
2.2.4. <i>Salmonella</i> spp.....	16
2.2.5. Koliform Bakteriler ve <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.6. <i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.2.7. Maya ve Küfler	22
2.3. Türkiye’de Et ve Et Ürünleri İle İlgili Çalışmalar ve Mikrobiyolojik Kalite ile İlgili Sorunlar	24
2.4. Et Ürünlerinde Starter Kültürler.....	30

XII

2.4.1. Laktik Asit Bakterileri	30
2.4.2. Laktik Asit Bakterileri ve Genetik.....	35
2.4.3. Starter Kültürler	41
2.4.4. Bakteriyosinler.....	46
2.4.5. Sınıflandırma	49
2.4.6. Bakteriyosinlerin Özellikleri	52
2.4.7. Gıda Sistemlerinde Bakteriyosinlerin Kullanımı ve Etkinlikleri	55
3. MATERYAL VE YÖNTEM	62
3.1. Örnekleme	62
3.2. Materyal	62
3.2.1. Bakteriyolojik Analiz Materyali	62
3.3. Yöntem	95
3.3.1. Bakteriyolojik Analizler	95
3.3.2. Bakteriyosinlerin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi.....	104
3.3.3. Kirby- Bauer Disk Difüzyon Metodu:.....	105
3.3.4. PCR ile Bakteriyosin üreticisi türlerin tayini	106
3.3.5. İstatistiksel Analizler	109
4. BULGULAR.....	110
4.1. Bakteriyolojik Analiz Bulguları.....	110
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu, Antibakteriyel İnhibisyon Yeteneğinin ve Bakteriyosin Aktivitesini Belirlenmesi	122
4.3. PCR Amplifikasyonu Bulguları	132
4.4. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları	135

XIII

5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	141
5.1. Sucuk Örneklerinin Analiz Sonuçları	142
5.2. Salam ve Sosis Örneklerinin Analiz Sonuçları	147
5.3. Kıyma Örneklerinin Analiz Sonuçları.....	151
5.4. Örneklerin Mevsimsel Açıdan Değerlendirilmesi.....	153
5.5. Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosin Aktivitesi.....	154
KAYNAKLAR	159
EKLER.....	172
ÖZGEÇMİŞ	176

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. Laktik asit bakterilerinin Filogenetik Ağacı	33
4.1. <i>L.lactis</i> sub sp. <i>lactis</i> ile <i>E. faecalis</i> için Disk Difüzyon	127
4.2. Antimikrobiyal İnhibisyon.....	128
4.3. Bakteriyosin aktivitesi.	129
4.4. <i>Enterococcus faecalis</i> 'e karşı bakteriyosin aktivitesi ile genel antimikrobiyal aktivitenin kıyaslanması.	130
4.5. Bakteriyosin aktivitesi.	131
4.6. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PCR amplifikasyon sonuçları.	132
4.7. <i>E.faecalis</i> PCR amplifikasyon sonuçları.	133
4.8. <i>Pediococcus acidilactici</i> PCR amplifikasyon sonuçları.	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. Farklı fermente et ürünlerinde kullanılabilir starter kültürlerine genel bir bakış.....	44
2.2. Laktik asit bakterilerinin metabolik ürünlerinin ticari önemi.....	45
2.3. Bakteriyosin Üreticisi Önemli Türler.....	47
2.4. Klaenhammer'ın (1993) sınıflandırmasına göre bakteriyosinler.....	52
2.5. Nisin'in gıda sistemlerinde etkin kullanımı ile ilgili örnekler	57
2.6. Gıda korucusu olarak bakteriyosinler ve gıda sistemlerinde uygulamaları	58
3.1. Biyokimyasal testlerde kullanılacak karbonhidratların distile suda çözünme oranları.....	90
3.2. Kullanılan primerler, dizilimleri, ve oluşturdukları amplikonların boyutlarını gösteren çizelge.....	91
4.1. Sucuk örneklerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen analiz sonuçları.....	113
4.2. Kıyma (Açık- Paketli veya vakum paketli hazır kıyma) örneklerinin analiz sonuçları	115
4.3. Salam (Sade-Etli- dilli- fıstık katkılı) örneklerinin analiz sonuçları	116
4.4. Sosis örneklerinin analiz sonuçları.....	118
4.5. Elde edilen sonuçların, örneklerin paketli- açık olma özelliğine göre ortalaması	120

4.6. Elde Edilen sonuçların, örneklerin markalı-markasız olma özelliğine göre ortalaması.....	121
4.7. Elde edilen sonuçların sezona göre ortalaması	121
4.8. Laktik Asit Bakterilerinin bazı genuslarının biyokimyasal özellikleri.....	123
4.9. Saf olarak izole ve identifiye edilebilen laktik asit bakterilerini ve antibakteriyel aktiviteleri.....	124
4.10. İnhibisyon Yeteneğinin Değerlendirilmesinde kullanılan Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yönteminde Zon Çapları.....	125
4.11. Standart suşlar ve çalışma sonucu elde edilen izolatlarda bakteriyosin aktivitesinin proteaz, ısı ve pH'a göre değişimi.....	125
4.12. Salam için, markalı ve markasız arasındaki farkın incelenmesi	135
4.13. Sucuk için, markalı ve markasız arasındaki farkın incelenmesi	135
4.14. Sosis için, markalı ve markasız arasındaki farkın incelenmesi	136
4.15. Salam için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi	136
4.16. Sucuk için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi	137
4.17. Kıyma için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi	137
4.18. Sosis için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi.....	138
4.19. Salam için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi.....	138
4.20. Sucuk için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi.....	139

XVII

4.21. Kıyma için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi	139
4.22. Sosis için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi.....	140
5.1. Et ürünlerine göre elde edilen ortalama değerler	142

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PCA	: Plate Count Agar
LAB	: Laktik Asit Bakterisi
LST	: Lauryl Sulfate Tryptose Broth
MRS	: De Mann Rogosa Sharp Agar
RCM	: Reinforced Clostridial Medium
EMS	: En Muhtemel Sayı Yöntemi
Mlı-A	: Markalı Açık
Msız-A	: Markasız Açık
Mlı-P	: Markalı Paketli
Msız-P	: Markasız Paketli
IY	: Ilkbahar-Yaz Sezonu
SK	: Sonbahar-Kış Sezonu
TAMB	: Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı
kob	: Koloni Oluşturan Birim
Bp	: Base Pair
L.A	: Tayin limitinin altında

1. GİRİŞ

Ülkemizde sevilerek tüketilen et ve et ürünleri aynı zamanda bir çok gıda kökenli enfeksiyonunun ve gıda zehirlenmesinin kökeninde yer almaktadır.

Et ürünlerinin daha lezzetli hale getirilmesinin yanı sıra mikrobiyolojik açıdan da daha güvenli olmalarını sağlamak, araştırmacıların amaçları arasında yer almaktadır.

İkinci Dünya Savaşından bugüne uzanan süreçte, gıda güvenliği ve teknolojisi üzerine yapılan AR-GE çalışmalarında büyük gelişme kaydedilmiştir. Yine de gerekli teknolojik ve hijyenik kurallara uyulmaması sonucu istenmeyen mikroorganizmalar üreyebilmekte ve ürünlerin kalitesini düşürerek insan sağlığını tehdit edebilmektedirler. Bu mikroorganizmaların arasında *S.aureus*, *C. perfringens*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve bazı *E.coli* suşları ile çeşitli maya ve küfler yer almaktadır. Toplam gıda intoksikasyonları ve gıda enfeksiyonlarının % 54,7'sinin et ve et ürünlerinin tüketilmesi sonucu ortaya çıktığı bildirilmiştir (Gökmenve Alisharlı., 2003). Avusturalya'da yapılan bir çalışmada, 1999-2000 yılları arasında meydana gelen 190 gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonun, %12'si *S.aureus*, %11'i *C.perfringens*, %9'u *Bacillus cereus*, ve %6'sı *Salmonella* spp. nedeniyle oluştuğu belirlenmiştir (Gökmen ve Alisharlı, 2003). Bu gıda patojenlerinin ve bunların metabolit ve toksinlerinin yarattığı sorunlar uzun yıllardır devam etmektedir; üstelik bu patojenlerin yeni veya daha

az bilinen strain ve türleri ve mikroorganizmaların antibiyotik dirençliliği gibi yeni sorunlar da ortaya çıkmıştır. Türk Gıda Kodeksi kalite standartlarını belirlemek adına, tıpkı diğer gıdalarda olduğu gibi et ve et ürünleri ile ilgili tebliğler yayınlamıştır (Anonymous, 2001; Anonymous, 2006; Anonymous, 2009)

Türkiye’de de et ve çeşitli et ürünleriyle ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, farklı şehirlerde farklı yıllarda yapılmış; sonuçları bazen birbirleriyle benzer, bazen farklı bulunmuştur. Boyacıoğlu, 1970-2007 yılları arasında Türkiye’de gıda güvenliği ile ilgili ulusal ve uluslar arası 634 yayın tek tek incelemiş ve gıda güvenliği konularını detaylandırmıştır. Türkiye adresli olup “Gıda Güvenliği” alanında yayınlanmış çalışmalar ağırlıklı olarak; mikotoksinler ve patojenik bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır (148 adet). Bu çalışmaları, ise ağır metal ve pestisit bulaşmaları ile antibiyotik kalıntılarının analizleri izlemektedir (Boyacıoğlu, 2007).

Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek veya en azından etkisini azaltmak amacıyla, özellikle fermente et ürünlerinde mikroflorayı kontrol altına alma gereksinimi ortaya çıkmıştır. İkinci Dünya Savaşı sonrası, fermente et ürünlerine olan talebin artması sonucu, araştırmacılar et ürünleri için fermentasyon sürecini standardize ederek, kaliteyi arttıracak starter kültürlerin geliştirilmesine başlamışlardır. 1940 yılında Jensen ve Paddock tarafından *Lactobacillus* spp. fermente sucuk hamuruna inokule edilerek başlatılan süreç, starter kültürlerin gelişmesine ve farklı firmaların değişik starter kültür karışımlarını piyasaya sürmesiyle çeşitlenmiştir. Gen mühendisliği ile yeni, tat ve aroma gelişiminde veya

gıda güvenliğinde, daha etkin starter kültürler, probiyotik ve prebiyotikler yaratma isteği doğmuştur. Bu nedenle, özellikle starter kültürler arasında, ayrıcalıklı yere sahip olan laktik asit bakterileri ile ilgili araştırmalar da yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada İzmir ilinde tüketilen prestijli-markalı veya markasız, piyasaya açık veya kapalı sunulan sucuk, sosis, salam ve kıyma gibi ürünler, hem patojen ve indikatör mikroorganizmalar yönünden hem de bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri açısından, sezona bağlı olarak incelenmiş; bu ürünlerin olumlu ve olumsuz yönleriyle genel bir profili ile farklı sunum şekilleri, sezonlarına göre mikrobiyal zenginliklerindeki değişimler ortaya konmaya çalışılmıştır.

Ayrıca, *Enterococcus faecalis* ile *Enterococcus faecium* tarafından üretilen enterocin AS-48, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin, *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen Pediocin AcH/PA-1 için, spesifik primerler yardımıyla bu genlerin izole edilen laktik asit bakterilerindeki varlığı incelenmiş, ve bu bakteriyosinlerin et ürünlerindeki mevcudiyeti araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Et ve Et Ürünleri.

2.1.1. Sucuk

Türk sucuğu ülkemizde et ürünleri piyasasının önemli bir bölümünü oluşturmakta ve et ürünleri içerisindeki payı % 42'ye kadar çıkabilmektedir. Türkiye'de kaliteli bir sucuk yaklaşık %38 su, %30 yağ, %30 protein ve %2 NaCl içermektedir (Çon et al., 2002).

Fermente et ürünleri genel olarak, düşük pH ve düşük su aktivitesi (a_w), yüksek tuz konsantrasyonu, düşük nem içeriği ile uzun raf ömrüne sahip ürünlerdir. Fermente et ürünleri genellikle belli oranda et ve yağ parçacıklarının emülsiyonu, tuz, kür maddeleri, baharatlar v.b.'nin belli bir kılıf içerisinde fermentasyonu ve kurutulmasından ibarettir (Çon et al., 2002).

Türk sucuğu granül yapıda ve kurutulmuş bir fermente et ürünüdür. Sucuk, kürlenmeden sonra fermentasyona tabi tutulur. Takip eden kurutma işlemi ile üretim tamamlanır. Bu tür ürünler kuru, tam kuru, yarı kuru, az kuru olarak hazırlanır. Tam kuru sucuklar yaklaşık %30-35 civarında su içerirken, yarı kuru %40-50, az kuru ürünler ise % 50'den fazla su içermektedirler. Geleneksel Türk tipi sucuk, baharatlı – acı, yarı kuru, fermente bir et ürünü olarak tanımlanmaktadır. Ülkemizde son zamanlarda bazı firmalar sucuklara üretim sırasında ısıl işlem uygulamakta böylece hem daha ekonomik üretim yapmakta hem de

bakteriyolojik açıdan daha güvenli ürün elde etmektedirler. Bu işlem sırasında sucuklara merkezi sıcaklık 46-63 derece olacak şekilde ısıtım işlemi uygulanmakta, bu şekilde elde edilen sucukları tanımlamak için pastörize sucuk deyimini kullanılmaktadır.

Sucuk yapım aşamaları geleneksel olarak ; Hamurun hazırlanması, bekletilmesi, kılıflara hamurun doldurulması, fermentasyon, kurutma, paketlenme ve depolama aşamalarından oluşmaktadır.

Hamur yapımı sırasında soğuk et ve yağlar 1,3-2,5 cm çapındaki delikli aynalardan geçirilerek, doğranır. Üzerine kürelemede kullanılan tuzlar ve baharatlar eklenir. Homojen bir karışım oluşturulur. Daha sonra sucuk karışımı doğal/ yapay kılıflara basınç altında doldurulur. Sucuk yapımı sırasında hamurun bekletilmesi, fermentasyon ve kurutma, ile depolama sırasında sıcaklık kontrolleri yapılmalıdır.

Sucuk yapımı sırasında oluşabilecek mikrobiyal kontaminasyonun çeşitli nedenleri vardır; baharattan ileri gelen kontaminasyonlar, yetersiz küreleme, yetersiz fermentasyon, starter kültürün direkt olarak nitrit/nitrat ile temas etmesi, yeterince hijyenik çalışılmaması, paketlenme sonrası ürünün iyi muhafaza edilmemesi gibi nedenler yüzünden ortaya çıkabilir.

Sucuğa starter kültür katılması zorunlu değildir. Starter kültür kullanımını her ne kadar yaygınlaştırsa da özellikle küçük işletmeler geleneksel üretim yöntemlerini tercih etmektedirler (Çolak et al., 2007).

Sucuk üretimi Türk Gıda Kodeksinde Fermente Et Ürünleri için belirtilen standartlara (Anonymous, 2009) uygun şekilde gerçekleştirilmek zorundadır.

2.1.2. Emülsiyon Tipi Et Ürünleri (Sosis-Salam).

Ülkemizde salam ve sosis olarak ikiye ayrılan emülsiyon tipi et ürünlerinin dünyada 250 kadar değişik şekil ve yapıda olanı mevcuttur. Emülsiyon, birbiri içerisinde çözülmeyen iki maddenin (yağ-su) üçüncü bir madde yardımıyla bir arada tutulması olayıdır. Gıda ürünlerinde iki tip emülsiyon mevcuttur;

- a. Su içinde yağ: Salam-sosis
- b. Yağ içinde su: Mayonez

Et olarak üçüncü sınıf etler kullanılabilen, sıcak et tercih edilmektedir. Bunun dışında, kabuk ve kuyruk yağı bağ doku ve sakatat ta emülsifiye et ürünü üretimi için tercih edilebilir. Sosis ve salam yapımında su karışıma buz şeklinde katılarak sıcaklığın artmasını önler, emülsiyona belli bir akıcılık kazandırır, ürüne belirli bir tekstür kazandırılmasına yardımcı olur. Tuz katılımı da aynı şekilde önemlidir. Tuz, suda çözünen myofibriler proteinlerin ekstraksiyonunu sağlayarak, emülsiyon oluşumuna katkıda bulunur, etin su bağlama kapasitesini, lezzetini artırır ve kısmen de olsa antimikrobiyal etkisi vardır. Bütün bunlardan başka, un ve nişasta gibi dolgu maddeleri, antimikrobiyaller, tat ve aroma vericiler, baharatlar, askorbik asit, sitrik asit, fosfat, renk maddeleri gibi ek malzemeler de katılarak hamur hazırlanır. Emülsiyon

için ortamın optimum sıcaklığı 11-15 °C civarındadır. 21 dereceden fazla olursa emülsiyon kırılır.

Sosis yapımında, kutere öncelikle yağsız et parçaları, tuz, nitrat, baharat, antimikrobiyaller eğer arzu edilirse bitkisel protein takviyesi konulur. Yağlı et ve yağ daha sonra eklenir. Unlar ve nişasta sürecin son aşamasında eklenmelidir. Sıcaklığın bu sırada 5-10 °C olması gerekmektedir. Kuterde yapılan karışım için 1500-3000 rpm kuter hızı tercih edilmelidir, aşırı hız emülsiyon kapasitesini düşürmektedir.

Kuterde yapılan karıştırmadan sonra elde edilen homojen karışım doğal/yapay kılıflara mümkün olduğunca düşük sıcaklıklarda doldurulur. Doldurulup duşlanan sosisler, önce 20-25 dakika boyunca 40-45 derecede kurutulur, sonra da aroma oluşumuna yardımcı olmak için 60-65 derecede 20 dakika boyunca tütülenirler. Daha sonra haşlanarak ısıl işleme tabi tutulan sosisler, paketlemeye alınabilirler. Sosislerde ısıl işlem 70-80 derecede yaklaşık 2 saat boyunca uygulanır.

Haşlama yoluyla ısıl işlem uygulamasının amacı; proteinlerin koagüle ve jelatinize olmasını sağlayarak kararlı bir yapı ve tekstür oluşumunu sağlamak, sosisin tipik renginin myoglobin pigmentinin denatürasyonu yoluyla oluşumunu sağlamak, ürünün pastörize edilmesi, ürüne pişmiş tat, aroma ve lezzet katılmasına yardımcı olmak olarak özetlenebilir.

Salam üretimi de sosis üretimi ile benzerlikler göstermektedir. Karkas halindeki büyük baş hayvanların etleri kuterde kıyıldıktan sonra

katkı maddeleri ve yağ ile emülsifiye edilir. Kılıflara dolum yapıldıktan sonra 40-45 derecede 20-25 dakika kurutulur, 60-65 derecede 20-30 dakika dumanlanır, ve bundan sonra 80-85 derecede 60-90 dakika boyunca haşlanarak ısıl işlem görür. Salam üretiminde eğer salama kuşbaşı et veya dil eklenecekse temel hamura karıştırmadan önce bunları kürlenmesi gerekmektedir. Eğer zeytin, antepfıstığı, tane karabiber eklenecekse bunların soyma parçalama gibi ön işlemlerden geçirildikten sonra tüketilebilecek şekilde son aşamada hamura katılması gerekmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği (Anonymous, 2001) sucuk için olduğu kadar; sosis ve salam için de gerekli kalite standartlarını belirlemekteydi. Yeni kodekste, sosis, salam, döner, kavurma, köfte, jöle işkembe gibi ısıl işlem görmüş et ürünleri bir grup içerisinde yer almakta; mikrobiyal kriterler bu grup için ayrıca belirlenmektedir (Ek Çizelge 1;2;3).

2.1.3. Et ve Kıyma

Türk Gıda Kodeksi, Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Et Karışımları Tebliğine göre, “Çiğ Kırmızı Et, modifiye atmosfer yöntemi veya vakum ile ambalajlanmış kırmızı etler de dahil olmak üzere soğutma, dondurma, veya hızlı dondurma dışında herhangi bir koruyucu işlem görmemiş, parçalanmış veya parçalanmamış taze kırmızı et” anlamına gelmektedir. Bu ürünler kendine has, tat, koku, görünüş ve yapıda olmalı, bozulmamış olmalı ama bozulmayı engelleyici bir madde de eklenmemiş olmalıdır.

Kıyma ise kasaplık hayvanların kemiklerinden ayrılmış çiğ kırmızı etinin kıyma makinesinden geçirilmesi ile veya bıçak ve satırla doğranmasıyla elde edilmektedir. Hazırlanmış et karışımlarının, et ve kıymadan farkı; çiğ ete diğer gıda maddeleri ve lezzet verici katkıların eklenmesi ile oluşturulmalarıdır. Bu karışımlara eklenen baharat ve gıda katkıları, doğal olarak, ürünün mikrobiyal yükünü etkilemektedir (Elmalı ve Yaman, 2005).

Türk Gıda Kodeksine göre çiğ et +4 C'nin üzerinde, kıyma ise +2 C'nin üzerinde depolanmamaktadır. Direkt olarak tüketime sunulacak olan kıyma ve hazırlanmış et karışımlarının üretimlerini takiben hijyenik olarak ambalajlanması gerekmektedir. Ambalajlı ve ambalajsız ürünlerin birbirleriyle temasının olmaması gerekmektedir. Yine de ülkemizde bu ürünlerle ilgili yürütülen çalışmalar, bu kurallara tamamen uyulmadığını ortaya koymuştur (Bkz.Bölüm 2,5,3).

Yeni gıda kodeksinde yukarıda belirtilen temel tanımlarda önemli bir değişiklik olmamasına rağmen, mikrobiyolojik kriterler, hazırlanmış kanatlı ve kırmızı et karışımları, çiğ kırmızı et ve kıyma ile sakatat için ayrı başlıklar altında ele alınmıştır. (Anonymous, 2009)

2.2.Gıdalarda Patojen Bakteriler ve Fungal Etkenler

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Gram pozitif küçük kok şekilli *S.aureus*, sıklıkla gıda zehirlenmelerine neden olan bir bakteridir. *Staphylococcus* genusu insan

epidermisi ve solunum sistemi mikroflorasının bir parçası olarak sık sık fırsatçı patojenler olarak görülürler. *Staphylococcus aureus*'un gıda zehirlenmeleriyle ilişkilendirilmesinin nedeni, ısıya dayanıklı enterotoksinlere sahip olmasıdır. Enterotoksinleri içeren gıda tüketildiğinde bulantı, kusma, ishal ile karakterize gastroenterit tablosu kendini 1-6 saatte gösterir. *S.aureus* 7 farklı enterotoksin üretir: A, B, C1, C2, C3, D ve E. Enterotoksin A gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan süper antijen yapıları enterotoksindir. Superantijenler yüksek sayıda T hücrelerinin uyarılmasına ve sitokin salınımına neden olurlar, böylece barsaklarda gastroenterit tablosu ile sonuçlanan genel bir yangısal reaksiyon ortaya çıkar.

S.aureus enterotoksin A, kromozomal bir gen tarafından kodlanan 30 000 Da boyutunda küçük bir peptiddir. *ent A* geninin ve diğer toksinleri kodlayan genlerin klonlanması ve dizi analizi çalışmaları sonucunda bu toksinlerin genetik açıdan ilişkili oldukları ortaya konmuştur. *ent A* geni kromozom üzerinde olsa da Tip B ve C enterotoksinlerinin genleri plasmidler, transposonlar veya lizojenik fajlar üzerinde kodlanmış olabilir.

A.B.D.'de her yıl yaklaşık 185,000 *Staphylococcal* gıda zehirlenmesi vakası bildirilmektedir. Zehirlenmelerde en çok rol oynayan etkenler kremalı tatlılar, et ve et ürünleri, tavuk etleri, et suları ve soslar, yumurtalı ve etli salatalar ve kremalı salata sosları olmaktadır. Bu tür gıdaların saklanması soğuk zincir kurallarına uyulmazsa hızlı bakteriyel üreme ve enterotoksin üretimi ortaya çıkabilir. Bu durumda

ürünün yeniden ısıtılması yetersiz kalabilmektedir çünkü toksin ısıya oldukça dayanıklıdır ve aktivitesini koruyabilir (Madigan and Martinko, 2006).

Et ürünlerinde ve çiğ etten *S.aureus* rahatlıkla izole edilebilir. *Staphylococcus* genusu tuz ve nitrite karşı oldukça dirençlidir ve anaerobik koşullarda zorlansa da hayatta kalabilir. Bu yüzden çiğ ette olduğu gibi sucuk, sosis, salam gibi ürünlerde- özellikle tam olgunlaşmamış ürünlerde- *S.aureus*'un enterotoksin üretmesi mümkündür. *S. aureus* düşük pH ve sıcaklık düzeyine karşı duyarlıdır. *S. aureus* sayımı özellikle sucuk üretimi sırasında *Lactobacillus* gelişiminin lag (uyum) fazı sırasındaki yüksek fermentasyon ısısı nedeniyle özellikle ürünün dış katmanlarında yükselebilir. *S.aureus*'un kontrolü için ürünün başlangıç pH'ı ve laktik asit bakterilerinin aktivitesinin özellikle önemli olduğu ortaya konmuştur. 24-26 C⁰'lik fermentasyon sıcaklıklarında eğer başlangıç *S. aureus* sayımı 10⁴ kob/g 'dan düşük olursa risk düşük olacaktır. Bazı ülkelerde – mesela – A.B.D'de, 43⁰C 'ye çıkan fermentasyon sıcaklıkları yaygındır; bu durumda erken dönemde pH'da hızlı bir düşüş *S.aureus* inhibisyonunu garantileyebilecektir. Laktik asit bakterilerinin *S.aureus*' u baskılamasının büyük ölçüde peroksitler ve benzeri bileşiklere bağlı olduğu da bilinmektedir (Yaman et al.,1998). Stres altındaki *S.aureus* hücreleri peroksitlere karşı çok duyarlıdır, bu da bu organizma için seçici olan ortamlara piruvat eklenmesinin altındaki neden olabilir. *Staphylococcus* sayımlarında ayrıca, tuz oranı yükseltilmiş, yaklaşık % 7,5 oranında sodyum veya lityum klorür içeren bir ortam selektiviteyi arttırmak için uygun olabilir.

Türk Gıda Kodeksinin en son biçimine göre, *S.aureus*, sucuk ile emülsifiye et ürünlerinde 5 örneğin ikisinde en fazla 10^3 kob/g oranında, kıyma ve çiğ ette ise en fazla 10^4 kob/g oranında bulunabilir.

2.2.2. *Clostridium* spp.

Clostridium perfringens ve *Clostridium botulinum* ciddi seyreden gıda zehirlenmelerinde etken olabilen, zorunlu anaerob, Gram pozitif, sporlu, çomak şekilli bakterilerdir.

Clostridium perfringens: Doğada yaygın olarak bulunan, spor oluşturan Gram pozitif çomaklardır. Bir çok hayvanın barsak mikroflorasının içerisinde yer almakta, bu nedenle lağım ve atık sistemlerinde bulunabilmektedir. A.B.D’de gıda zehirlenmesi vakalarının önemli bir bölümünü oluşturmakta, bu ülkede her yıl yaklaşık 248,000 vaka bildirilmektedir.

Hastalık tablosu kontamine gıdalarla yüksek oranda *C.perfringens* alınması sonucu ortaya çıkar. *C. perfringens* için minimum infeksiyon dozu 10^6 kob/g düzeyindedir. Bazı kaynaklarda ise minimum infeksiyon dozunun 10^8 kob/g olduğu bildirilmektedir (Madigan and Martinko, 2006). Özellikle et, tavuk eti, deniz ürünleri riskli gıdalar sınıfında yer almaktadırlar. Özellikle büyük miktarlarda, kazanlarda pişirilen yiyeceklerde ısı transferi yetersiz ve yavaş olduğu için *C.perfringens* gelişimi baskılanmayabilir. Anoksik koşullar sporulasyonu hızlandırabilir. Ama asıl toksin oluşumu kontamine gıdayı tüketen kişinin barsaklarında gerçekleşir ve toksin barsak epitheliumunun geçirgenliğini

arttırarak mide bulantısı, abdominal kramplar ve ishal semptomlarının ortaya çıkmasına neden olur. Ateş veya kusma genellikle görülmezken, vaka nadiren ölümle sonuçlanır.

Türk Gıda Kodeksinin en son şekline göre, ısıtılmış sosis, salam gibi et ürünlerinde ve fermente sucukta *C. perfringens* 5 örneğin ikisinde en fazla 10^3 kob/g oranında bulunabilir (Anonymous, 2009)

Clostridium botulinum: *Clostridium botulinum*, Gram (+), zorunlu anaerob, sporlu çomaklardır. Doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar, hem tarımsal hem de ormanlık arazilerde, sulak alanların dip sedimentinde, memeli hayvanların ve deniz canlılarının gastrointestinal kanallarında rastlanabilirler. *Clostridium botulinum* sporları ısıya oldukça dayanıklıdır ve özellikle işlem görmemiş ya da hatalı şekilde işlenmiş gıdalarda kolaylıkla hayatta kalabilmektedirler. Özellikle pH seviyesinin 4,6'nın üzerinde olması etkeninin gelişmesi ve toksin üretmesi için uygun olmaktadır.

Bildirilen botulizm vakalarının çoğunluğu, özellikle konserve gıdaların tüketilmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Ev yapımı konserve bu açıdan özellikle tehlikelidir. Et ürünleri, özellikle fermente sucuklar, konserve sebzeler ve deniz ürünleri riskli gıdalar arasında yer almaktadırlar.

Botulismus hastalığı nörotoksin nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır. 7 tip botulizm tanımlanmıştır: A, B, C, D, E, F ve G. A, B ve F tipleri insan botulismusuna neden olmaktadır. Toksin, ısıya

duyarlıdır ve 80 °C veya daha yüksek sıcaklıklarda 10 dakika boyunca ısı işlem uygulanması toksinin etkinliğini kaybetmesi için yeterlidir. Sporlar ise ısıya dayanıklıdır ve hayatta kalabilmektedirler.

Botulinum toksini adı verilen bu neurotoksin, motor sinirlerinin myoneural kavşaklarda bloke edilmesine neden olarak, flassid (gevşek) paralize neden olur. Bu felç durumu baştan ayaklara doğru simetrik olarak ilerler. Diyafram ve göğüs kasları tam anlamıyla paralize olduğunda, solunum baskılanır ve asfeksi sonucu ölüm şekillenir. Gıda kökenli botulismus vakaları için önerilen tedavi *Clostridium botulinum*'a karşı geliştirilmiş antitoksinin erken uygulanması ve yoğun destekleyici bakımdır (Madigan and Martinko, 2006).

Sodyum nitrit eklenmesi ve pH'nın 4,6 'nın altında olmasının sağlanması, özellikle et ürünlerini tüketilmesi sonucu ortaya çıkabilecek botulismus vakalarının kontrolünde önem taşımaktadır. Türk tipi sucukta, pH genellikle 5,10.-5,20 arasında kaldığından bu yönden riskli olduğu düşünülebilir (Yaman et al.,1998). Bu nedenle kütleme işlemine özellikle dikkat edilmesi önerilebilir

2.2.3. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus, Gram (+), fakültatif aerob, sporlu çomaklardır. Etken, et ve et ürünleri, sebzeler, süt ürünleri, balık ve deniz ürünlerinde yaygınlıkla bulunmaktadır. Özellikle pirinç, patates, makarna gibi nişasta oranının yüksek olduğu besinler ve hazır çorbalar, pudingler, soslar gibi hazır gıda karışımları *Bacillus cereus* gelişimi için özellikle uygun

ortamlardır. *Bacillus cereus* sayımının 10^6 kob/g'dan fazla olması bir gıda için organizmanın aktif olarak geliştiğinin ve sağlık için tehlike arzettiğinin göstergesi olmaktadır.

Bacillus cereus enterotoksini, sulu ishal, abdominal kramplar ve mide bulantısı ile seyreden ama kusmanın nadiren görüldüğü bir intoksikasyona neden olmaktadır. Bu durum *Clostridium perfringens* nedeniyle ortaya çıkan gıda zehirlenmelerine benzemektedir. *Bacillus cereus* intoksikasyonlarının bir diğer tipinde ise kusma sıklıkla görülmekte ve teşhiste vaka sık sık *S. aureus* intoksikasyonlarıyla karıştırılmaktadır (Madigan and Martinko, 2006).

Çiğ sucuk/ sosis karışımları kaynağı, büyük ölçüde baharatlar olan, *Bacillus* spp. sporlarını yüksek oranda içerir. Uygun koşullar altında *Bacillus* spp. sporları nedeniyle proteoliz gibi bozulma belirtileri görülebilmektedir, fakat çiğ sucuk/ sosis karışımlarında hatalı olgunlaştırma koşulları seçilse bile, *Bacillus* spp. kaynaklı bozulma nadirdir. *Bacillus* spp. sporlarının sayısının olgunlaştırma işlemi sırasında büyük ölçüde sabit kaldığı ama kurutma işleminin vejetatif bakterilerin sayısını azalttığı ortaya konulmuştur. *Bacillus* spp.'nin fermente et ürünlerinde düşük su aktivitesi, düşük pH değeri, ve anaerobiosis gibi koşulların kombinasyonu ile kontrolünün gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Gökmen et al., 2003).

Türk Gıdası kodeksinin en son biçiminde et ve et ürünlerinde *B.cereus* ile ilgili herhangi bir kriter bulunmamaktadır (Anonymous, 2009).

2.2.4. *Salmonella* spp.

Salmonellosis, çoğu zaman “gıda zehirlenmesi” adı altında bildirilmektedir fakat aslında, gıda kaynaklı bir gastrointestinal enfeksiyondur. Semptomlar, etken barsak epitelini kolonize ettikten sonra ortaya çıkar.

Salmonella spp. *Enterobacteriaceae* familyasından Gram negatif, fakültatif aerobik çomaklardır. Neredeyse tüm *Salmonella* spp. insanlar için patojendir. *S. typhi*, tifo hastalığının etkeni olup, özellikle gelişmekte olan ülkeler için ciddi bir sorundur ama gıda yoluyla bulaşan ve gastroenteritis nedeni olan başka *Salmonella* spp. üyeleri de vardır. Farklı türlere ait yaklaşık 1400 *Salmonella* spp. serotipinin insanlar için patojen olduğu bilinmektedir. A.B.D’de her yıl yaklaşık 45,000 Salmonellosis vakası bildirilmektedir. Bildirilen Salmonellosis vakalarının, toplam vakaların sadece % 4’ü olduğu sanılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, A.B.D’de her yıl toplam 1,300.000’den fazla Salmonellosis vakası olduğu düşünülebilir.

Gıda kökenli *Salmonella* spp. enfeksiyonunun en önemli kaynakları insanlar ve diğer sıcakkanlı hayvanların barsaklarıdır. Mikroorganizma, gıdalara, gıdaların işlenmesinden sorumlu kişiler nedeniyle fekal kontaminasyon yoluyla bulaşabilir. Kümes hayvanları ve sığırlar, patojen *Salmonella* türlerini yumurta, et, süt gibi taze gıdalara bulaştırabilirler.

Salmonella spp. nedeniyle ortaya çıkan gıda kökenli enfeksiyonların nedeni, çoğu zaman, çiğ yumurtayla pişirilen tatlılar, süt

ve süt ürünleri, et ve krlenmiş ama pişirilmemiş et ürünleri, kümes hayvanlarının etleri olabilir (Madigan and Martinko, 2006).

Salmonella spp. sucuk, sosis, salam gibi et ürünlerinin üretimi sırasında, bir çok faktöre bağlı olarak gelişebilmektedir. Bu faktörler, sürecin başlangıcında su aktivitesinin, pH değerinin ve olgunlaşma sıcaklığının yüksek olması, fermente edilebilir karbonhidrat miktarının düşük olması, taze sucuk/ sosis karışımında laktik asit bakterilerinin yetersiz olması, ve krleme işlemi sırasında yetersiz düzeyde nitrit kullanılması olarak sayılabilir. Normal koşullarda, *Salmonella* spp. dahil Enterobacteriaceae'nin kurutma işlemi sırasında yavaş yavaş inaktive olması beklenmektedir (Gökmen et al., 2003).

Salmonella spp. için Minimal İnfeksiyon Dozu, $10^5 - 10^8$ olarak bildirilmiştir (Madigan and Martinko, 2006). Hastalık semptomları, gıda yoluyla etkenin alınmasından 8- 48 saat sonra ortaya çıkmaktadır. Belirtiler; baş ağrısı, ürperme, kusma, ishal ve birkaç gün süren ateş olarak özetlenebilir. Hastalık 2-3 gün sürdükten sonra genellikle kendiliğinden iyileşmekte ama hastalar, iyileştikten sonra birkaç hafta boyunca etkeni samaktadırlar. Hatta, bazı kişiler kronik taşıyıcı durumuna geçerek, aylar boyunca etkeni çevreye bulaştırmaya devam ederler. *S.typhi* nedeniyle ortaya çıkan tifo hastalığında, sistemik enfeksiyon ve haftalarca süren ateş nedeniyle, tedavi edilmeyen vakalarda, mortalite oranı % 15' e kadar çıkabilmektedir.

Gıda üretilen, işlenen ve satılan mekanlarda, *Salmonella* spp. ile enfekte olan kişilerin art arda yapılan üç *Salmonella* taramasından negatif sonuç alınıncaya kadar işten uzaklaştırılmaları gerekmektedir.

Türk Gıda Kodeksinde et ve et ürünlerinde 25g/ml örnekte *Salmonella* spp. bulunmamalıdır. Bu kriterde zaman içerisinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

2.2.5. Koliform Bakteriler ve *Escherichia coli*

Koliform Grup bakteriler 37 °C'de 24- 48 saat içerisinde laktozdan asit ve gaz oluşturan Gram negatif, sporsuz çomak şekilli bakterilerdir. Bu tanıma göre, *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Klebsiella pneumoniae* koliform bakteriler içerisinde tanımlanmıştır. Fekal koliformlar ise ayrı bir gruptur.

Koliform bakteriler gıda hijyeni açısından “indikatör bakteriler” olarak görülürler, gıdalarda koliform bakteri sayısının yüksek olması hijyen açısından bir eksikliğin göstergesidir. Gıdalarda grup üyelerinin içerisindeki primer patojen olan *E.coli* O157:H7 serotipi ile fırsatçı bazı patojenler bulunmaktadır.

Gıda sanayinde tartışma konusu olan; *Klebsiella pneumoniae* gibi fırsatçı patojenlere gıda örneklerinde rastlandığı zaman sağlık açısından nasıl yargıya varılacağıdır. Bir bakış açısına göre bu bakterilerin rastlandığı gıda ne olursa olsun insan sağlığı açısından tehlikelidir. Türk

Gıda Kodeksi Çiğ Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliğinde, *E.coli* O157:H7'nin ne çiğ et ve kıymada ne de hazırlanmış et karışımlarında bulunmaması gerektiği bildirilmiş ama diğer fırsatçı patojenler veya genel koliform sayısı hakkında bir kriter belirlenmemiştir. Yeni gıda kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine göre *E.coli* O157:H7 dışında koliform bakteri sayımı ya da *E.coli* varlığı ile ilgili bir kriter ne fermente et ürünleri, ne ısıtılmış et ürünleri, ne çiğ et ne de kıyma için bulunmaktadır (Anonymous, 2001; Anonymous, 2006; Anonymous,2009).

Escherichia coli Enterobacteriaceae familyasının tipik özelliklerini taşıyan bir bakteridir. Gram negatif, sporsuz, çomak şekillidir. Hazır gıdalardan *E.coli* izole edilmesi genellikle dışkı ile bir bulaşma olduğunun göstergesidir. Bu nedenle Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliğinin bir önceki göre ısıtılmış et ürünlerinde hiç bulunmamalıdır; ısıtılmamış ürünlerde, alınan 5 örneğin 4'ünde en fazla 5×10^1 kob/g oranında, kalan 1 örnekte ise en fazla 1×10^2 kob/g oranında bulunabilir. Bu tebliğ şu anda yürürlükte değildir. (Anonymous, 2001).

Enterik *E.coli* serolojik özellikleri ve virülens özelliklerine göre 5 alt grup içerisinde toplanmaktadır. Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) insan, domuz, koyun, keçi, sığır köpek ve ata ishal etkenidir. ETEC fimbrial adhesinler ile ince barsaktaki enterositlere bağlanır ve iki protein yapılı enterotoksin üretirler. Enteropatojenik *E.coli* (EPEC) ise tıpkı ETEC gibi hayvanlarda ishal etkenidir ama kolonizasyon ve etyolojisi farklıdır.

EPEC fimbria'ya sahip değildir. İntimin isimindeki adhesin ile enterositlere bağlanmaktadır. Enteroinvazif *E.coli* (EIEC) sadece insanlarda görülen Shigellosis'e benzer yüksek ateş ve yoğun ishalle seyreden non toksijenik bir hastalık etkenidir. Enteroaggregatif *E.coli* (EAggEC) ise sadece insanlarda görülen, invazif olmayan ishal etkeni olup, isimlerini doku kültüründe hücrelerin agregasyonuna neden olan fimbriae'ya sahip olmalarından alırlar.

Enterohemorajik *E.coli* O157:H7 serotipi (EHEC) oldukça tehlikeli gıda kaynaklı patojenlerden biridir. Hemolitik-üremik sendroma neden olabilmekte ve böbrek yetmezliklerine yol açabilmektedir. Hücrelere bağlanmak için bakteriyel fimbria kullanabilmektedir ve orta derecede invaziftir. En önemli özelliği bir faj tarafından kodlanan bir Shiga toksine sahip olmasıdır. Sütçü ve etçi sığırlar *E.coli* O157:H7'nin asıl rezervuarıdır, semptom göstermeksizin etkeni taşır ve saçarlar. *E.coli* O157:H7 intoksikasyonlarının ilişkili olduğu gıdalar, çiğ kıyma, çiğ tohum ve yapraklı bitkiler, çiğ süt, pastörize edilmemiş meyve suları ve gıda sektöründe çalışanlar tarafından fekal-oral yolla kontamine edilen gıdalar olarak belirtilmektedir (Madigan and Martinko, 2006).

A.B.D FDA (Food and Drug Administration) tarafından, fekal oral bulaşmanın gıdanın ısıtılma tabii tutulması, çapraz kontaminasyonun engellenmesi, gıda sektöründe çalışanlar için eldiven kullanımı gibi koruyucu önlemler alınması, pastörizasyon, kişisel hijyen uygulamalarına dikkat edilmesi, çalışanlara hastalandıklarında tedavi imkanı sağlanması gibi önlemlerin önemi vurgulanmıştır (Madigan and Martinko, 2006).

2.2.6. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, önemli bir gıda kökenli patojen etkidir. Asit tolerant, psikrotolerant, fakültatif anaerobik, halotolerant, Gram pozitif, sporsuz çomaklardır. Toprak ve suda yaygın olarak bulunur. Taze gıdaların hiçbiri *Listeria monocytogenes* ile kontamine olma olasılığından uzak değildir. Soğuğa karşı dayanıklı olduğu için, normalde mikrobiyal büyümeyi yavaşlatan, gıdayı soğuk zincir altında koruma önlemi işe yaramaz. Bu nedenle, hazır gıdalar, et ve et ürünleri ile uzun süre buzdolabı ısısında (+ 4 C⁰) tutulan süt ile süt ürünleri Listeriosis için uygun kaynaklardır.

İnsan Listeriosis'i ateş, septisemi, meningoencephalitis, düşükler veya ölü doğumlarla seyreden ciddi bir enfeksiyondur. Bazı durumlarda kusma, ishal gibi gastrointestinal sistem belirtilerinin Listeriosis'in daha ciddi belirtilerinden önce ortaya çıkabildiği bildirilmiştir. Meningoencephalitis olgularında ölüm oranı %70'e kadar çıkabilmektedir. A.B.D'de her yıl en az 1600 Listeriosis vakası görülmekte, bunların 415'i ölümlle sonuçlanmaktadır. Vakaların çoğunluğu sporadik olarak ortaya çıkmakta, bu durum da epidemiyolojik çalışmalar yoluyla kişinin tükettiği gıdaya ulaşmayı zorlaştırmaktadır.

Listeriosis çok çeşitli gıdalarla bulaşabilmektedir. Bunların arasında, çiğ süt ve süt ürünleri, özellikle yumuşak krem peynirler, dondurma, çiğ sebzeler, et ve fermente et ürünleri, kümes hayvanlarının etleri, balık ve diğer deniz ürünleri bulunmaktadır (Madigan and Martinko, 2006).

Listeria monocytogenes üremesinin kontrol altına alınması tıpkı diğer gıdalarda olduğu gibi et ve et ürünlerinin güvenliği ile ilgili bir çok araştırmanın odağı olmuştur. Alves et al., (2006) ısıtma işlemi görmüş jambonda *Lactobacillus sakei* kullanımının *Listeria monocytogenes* üremesi üzerindeki etkisini araştırmışlar ve *L. sakei*'nin *L.monocytogenes* üzerindeki inhibe edici etkisini belgelemişlerdir. Aymerich et al., (2000). İspanyol tipi fermente sucuklardan izole ettikleri *L.sakei*, *L.curvatus* ve *L. plantarum*'un bakteriyosin üreten suşlarının *L.monocytogenes* ve *S.aureus* üzerindeki baskılayıcı etkisini araştırmışlar ve bu etkiyi göstererek bu bakterilerin bakteriyosinlerini karakterize etmişlerdir. Ostergaard et et al., (1998), Tayland tipi fermente deniz ürünlerinden elde edilen laktik asit bakterilerinin anti-listerial etkisini belgelemişlerdir. Benzer çalışmalar Türkiye'de de gerçekleştirilmiştir. Çolak et al., 2007 yılında yaptıkları çalışmada, sucuklarda *L.monocytogenes* görülme sıklığını belirlemişler, 2007 yılında ise Hampikyan ve Uğur nisin katkısının sucuklarda *L.monocytogenes*'i baskıladığını belirlemişlerdir.

Türk Gıda Kodeksinde et ve et ürünlerinde 25gr/ml örnekte *L. monocytogenes* bulunmamalıdır. Bu kriterde zaman içerisinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

2.2.7. Maya ve Küfler

Doğada yaygın olarak bulunan funguslar ökaryotik, heterotrof mikroorganizmalardır. Küfler, basitçe miselyum oluşturan filamentöz funguslar olarak tanımlanırken, mayalar çoğunlukla tek hücreli ve miselyum oluşturmeyen yapılar olarak tanımlanmaktadır.

Maya ve küf türleri, ekmek, bira, şarap, peynir üretiminde olduğu gibi bazı et ürünlerinde de ekonomik öneme sahiptir. Endüstriyel alanda çeşitli maya ve küflerden elde edilen fungal enzimler, vitaminler ve antibiyotikler (Penisilinler, Sefalosporinler) başarıyla kullanılmaktadırlar. Buna rağmen, birçok türün fermentasyon ve gıda sanayinde istenmeyen kontaminantlar olarak görüldüğü bilinmektedir. Bu türler içerisinde, gıdaların bozulmasına neden olanlar olduğu gibi, salgıladıkları toksik metabolitler, mikotoksinler nedeniyle insan sağlığını da tehdit edebilmektedirler (Madigan and Martinko, 2006).

Maya ve küfler oldukça geniş bir pH aralığında (pH: 2-9), depolama sıcaklığında (10-35 °C), ve su aktivitesinde üreyebilmektedirler. Yüksek tuz ve şeker oranlarında gelişme yeteneğine sahip oldukları gibi, kompleks karbonhidratları, organik asitleri, protein ve lipidleri de kullanabilmektedirler.

Üründe bulunan Maya-Küf sayısı özellikle açık hava ile fazla teması olan, öğütülerek paketlenen, soğutulma, dondurulma gibi işlemlerden geçirilen gıdalar için özellikle önemli olmaktadır.

Et ürünlerinde olgunlaştırma ve kurutma evrelerinde, maya ve küfler, türlerine, ürüne, kuruma derecesine ve çevre koşullarına göre yoğun veya seyreltik lekelere yol açarlar. Önce küçük koloniler halinde başlayan kusur ürünün tüm yüzeyine yayılabilmektedir. Küfler genellikle yeşil-siyah renkte görülürken, özellikle lipolitik karakterli mayalar, nemli, yapışkan bir tabaka oluştururlar. Yüksek sıcaklığın, nisbi nemin ve olgunlaştırma-kurutma yapılan ortamların düzgün

havalandırılmamasının, durumun özellikle kötüleşmesine neden olduğu bildirilmektedir (Kıvanç et al., 1992).

Özellikle Türk sucuğu ile ilgili yapılan bir çalışmada, sucuğun 28 günlük olgunlaşma süreci boyunca yaklaşık 10^4 düzeyinde seyreden Maya-Küf sayısının fermentasyon sürecinin sonuna doğru 10^2 düzeyine düştüğü belirtilmiştir (Tekinşen, et al., 1982). Bir başka çalışmada 49 adet sosis, sucuk, salam ve kavurma örneği, farklı maya ve küf türleri açısından incelenmiş, örneklerin %75'inde *Penicillium* spp. izole edilirken, hiç *Aspergillus flavus* veya *Aspergillus parasiticus*'a rastlanmamıştır (Kıvanç et al., 1992). Araştırmacılar, başta sucuk olmak üzere et ürünlerinin bu *Aspergillus* türleri için yetersiz bir ortam olduğunu belirtmişlerdir (Kıvanç et al., 1992).

Maya-Küf sayımı yeni kodeks kriterlerinde birbirinden ayrılmıştır. Örneğin sucuk gibi fermente ürünlerde sadece küf sayılırken (üst sınır 10^3 kob/g), emülsifiye tip et ürünlerinde maya-küf birlikte sayılacaktır (üst sınır 10^3 kob/g).

2.3.Türkiye’de Et ve Et Ürünleri İle İlgili Çalışmalar ve Mikrobiyolojik Kalite ile İlgili Sorunlar

Boyacıoğlu, 1970-2007 yılları arasında Türkiye’de gıda güvenliği ile ilgili ulusal ve uluslar arası 634 yayın tek tek incelemiş ve gıda güvenliği konularını detaylandırmıştır. Türkiye adresli olup “Gıda Güvenliği” alanında yayınlanmış çalışmalar ağırlıklı olarak; mikotoksinler ve patojenik bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır (148 adet).

Bu çalışmaları, ise ağır metal ve pestisit bulaşmaları ile antibiyotik kalıntılarının analizleri izlemektedir (Boyacıoğlu, 2007). Bu bölümde, bu çalışmaların bir bölümü ve bulgular değerlendirilmiştir.

Türkiye’de özellikle fermente bir et ürünü olan sucuk ile emülsifiye tip ürünlerden sosis ve salam yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Bu ürünlerin üretimi, depolanması, satışı ve tüketimi sırasında özellikle mikrobiyal kaynaklı sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Türkiye’nin çeşitli illerinde farklı tipte et ve et ürünlerinin, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri yapılmış ve birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Et ürünlerinde tespit edilen mikroflora ürünlerin mikrobiyolojik kalitesini ortaya koymaktadır. Yüksek kaliteli et ürünlerinde genellikle arzu edilen mikroorganizmalar mikrofloraya hakimdir. Gerekli teknolojik ve hijyenik kurallara uyulmaması sonucu ürünlerde istenmeyen mikroorganizmalar üreyebilmekte ve ürünlerin kalitesini düşürerek insan sağlığını tehdit edebilmektedirler.

Ülkemizde et ürünleri üzerine yapılan araştırmalar tüketimi son derece yaygın olan ve Türkiye’ye özgü fermente bir ürün olan sucuk üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmalar ülke genelinde sucukların mikrobiyolojik kalitesini inceleyebildikleri gibi (Sırıkan et al.,2006), iller bazında sucukların mikrobiyolojik kalitelerini, bazen diğer et ürünleriyle birlikte değerlendirmişlerdir. Yayınlar, Afyon’da (Çon et al.,2002), Aydın ilinde (Kök et al., 2007), Kahramanmaraş’ta (Erdoğrul et al.,2005), Konya’da (Özkalp et al., 2006), Van’da (Sancak et al., 2007)

ve İstanbul'da (Çolak et al.,2007) satışa sunulan sucukların incelendiği çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır.

Afyon'da incelenen 30 sucuk içerisinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı ortalama $2,9 \times 10^7$ kob/g oranında bulunmuş, *S.aureus* sayısı ortalama $3,8 \times 10^4$ kob/g oranında, *Enterobacteriaceae* sayımı ortalama $1,3 \times 10^3$ kob/g oranında bulunmuştur. *Clostridium perfringens* ise % 7 oranında izole edilmiştir. Kahramanmaraş'ta satışa sunulan 60 sucukta toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $3,2 \times 10^7$ kob/g olarak belirlenmiştir. Toplam koliform sayısı 244 EMS/g olarak bulunmuştur. 1 örnekte *Salmonella* spp., 9 örnekte *E.coli* izole etmişlerdir. Aydın ilinde yapılan çalışmada (Kök et al.,2007) ise 100 örneğin 5 tanesinde *Salmonella* spp., 4 tanesinde *L.monocytogenes*, 10 tanesinde diğer *Listeria* spp. izole edilmiştir.

Listeria monocytogenes, insanlarda ciddi bir hastalık etkeni olduğu için, et ürünlerinde en çok üzerinde durulan patojenlerden biridir. Birçok araştırmada sucuğun hammaddesi olan kıymanın sıklıkla *L.monocytogenes* içerdiği bildirilmiştir (Başkaya et al.,2004, Kök et al., 2007). Van'da ambalajlı ve ambalajlanmamış sucuk, sosis ve salamlarda *Listeria monocytogenes* %15, %25 ve %10 oranında izole edilmiştir. Vakum paketli sucuk ve salamlarda *Listeria monocytogenes* belirlenmemiş, paketli sosislerin %5'inde ise izole edilmiştir. Soyutemiz et al (2001) fermente sucuk örneklerine inokule ettikleri *L.monocytogenes*'in olgunlaşmadan sonra da hayatta kalabildiğini

belirtmişler ve bu nedenle starter kültür kullanımının ve pastörizasyon işleminin çok önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Sucuk örneklerinde *E. coli* ve *Salmonella* spp. bulunması barsak kökenli bulaşmaların olduğunu ve etin hijyenik kalitesinin yetersiz olduğunun göstergelerinden bazılarıdır, TS 1070'e ve Türk Gıda Kodeksine göre bu iki bakteri sucukta bulunmamalıdır (Anonymous, 2000). Yapılan çalışmaların çoğunluğunda koliform bakteri sayımları da genellikle, standartlarda belirtilen rakamların üzerinde bulunmuştur. Yeni gıda kodeksi, *Salmonella* spp. ile ilgili bir değişiklik yapmamasına rağmen, koliform analizlerini *E.coli* O157:H7 ile sınırlamıştır.

Sucuk örneklerinde markalı ve markasız ürünler arasında da mikrobiyolojik kalite açısından farklar bulunabilmektedir. Konya'da satışa sunulan sucuklarda markalı ürünlerde koliform bakteri sayımları ve *Staphylococcus aureus* sayısı açısından istatistiksel açıdan önemli fark elde edilmiş fakat toplam mezofil aerobik bakteri sayısında önemli bir fark bulunamamıştır (Özkalp et al.,2006). Araştırmacılar toplam mezofil aerobik bakteri sayısının markalı ürünlerde de markasız ürünlerde olduğu kadar fazla oluşunun nedeninin markalı ürünlerde starter kültür kullanımı ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir.

Emülsifiye tipli et ürünleri de çeşitli yönlerden araştırılmışlardır. Türkiye'de değişen beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak, bu tip ürünlerin tüketiminde artış gözlemlenmiştir. Bu tür ürünler fermente ürünler değildirler ve üretim sırasında ısı işlem görürler, bu nedenle son üründe mikrobiyal yükün az olması beklenmektedir. Yine de üretim

sırasında kullanılan baharatlar tıpkı depolama koşulları ve satıcıların hijyen kurallarına dikkat etmeleri kadar son ürünün mikrobiyal yükü üzerine etkilidir.

Kars'ta yapılan bir çalışmada, paketli ve açık salam ile Frankfurter sosis örneklerinin mikrobiyal kalitesi araştırılmış, 100 adet ürünün toplam aerobik bakteri sayısı, *Pseudomonas* spp. sayısı, *Enterococcus* spp. sayısı, Enterobacteriaceae sayısı, *Clostridium perfringens* sayısı, *S.aureus* sayısı ve Maya-Küf sayısı gerçekleştirilmiştir (Elmalı et al., 2005) Sonuçta paketli ürünlerde *Clostridium perfringens* hariç bütün bu sayımların $2,0 \times 10^2$ 'den düşük olduğu gözlemlenmiştir. *Clostridium perfringens* sayısı ise 12 paketli sosis ve salam örneğinde daha yüksek bulunmuştur. Açık ürünlerde ise durum biraz farklıdır. Toplam aerobik bakteri sayısı ortalama $1,3 \times 10^4$, *Pseudomonas* spp. sayısı ortalama $6,0 \times 10^4$, Koliform sayısı $2,4 \times 10^3$, *Enterobacteriaceae* sayısı $2,8 \times 10^3$, *Enterococcus* sayısı $1,1 \times 10^3$, *Staphylococcus aureus* sayısı $2,6 \times 10^3$ olarak tespit edilmiştir. 35 açık sosis örneğinin 25'inden *E.coli* izole edilmiştir. *C. perfringens* tüm örneklerden izole edilmiş, sayısı 10^2 - 10^4 arasında bulunmuştur. Araştırmacılar, açık ürünler ile paketli ürünler arasındaki bu farkların depo koşulları ve kişisel hijyen ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Elmalı et al., 2005).

Erzurum piyasasından elde edilen 4 farklı firmaya ait salamların değerlendirilmesi sonucunda Enterobacteriaceae, koliform grubu bakteri, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. sayıları saptanabilir sınırların altında bulunmuştur (Apaydın, 2003).

Ayrıca bu salamların *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp. içermedikleri saptanmıştır. Oysa 1988 yılında yapılan bir başka çalışmada İstanbul piyasasında satılan salam örneklerinin % 24'ünde fekal koliform, % 4'ünde *Salmonella* spp. izole edilmiştir (Aran., 1988).

Sucuk, sosis ve salam gibi et ürünlerinin dışında çiğ et, kıyma ve köfte karışımlarının mikrobiyolojik kalitesi de araştırılmıştır. Özellikle kıyma, bakterilerin gelişmesi için çok elverişli bir ortamdır. Etin yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar kıymanın hazırlanması, özellikle çekilmesi ve karıştırılması sırasında tüm ürüne bulaşarak gelişmekte ve kıymanın raf ömrünün kısalmasına neden olmaktadır. Kayseri'de yapılan bir çalışmada Kayseri piyasasında satışa sunulan kıymalarda toplam aerobik canlı sayısı $7,4 \times 10^5$ kob/g- $5,3 \times 10^9$ kob/g arasında, koliform sayısı $8,6 \times 10^1$ kob/g- $4,5 \times 10^8$ kob/g, *E.coli* sayısı $<1,0 \times 10^1$ kob/g- $5,2 \times 10^5$ kob/g arasında, koagulaz pozitif *Staphylococcus* spp. sayısı $8,0 \times 10^2$ kob/g- $8,2 \times 10^3$ kob/g arasında bulunmuştur (Gönülalan et al., 2003).

Van ilinde yapılan bir çalışmada, 100 adet sığır ile 100 adet koyun kıyması *Salmonella* spp., *L.monocytogenes*, *C. perfringens* ve *B. cereus* yönünden incelenmiş; sığır kıyması örneklerinde *Salmonella* spp. %3, *L. monocytogenes* %22, *C. perfringens* %15, ve *B. cereus* ise %5 oranında tespit edilirken, koyun kıyması örneklerinde, bu oranlar sırasıyla; %4, %11, % 9, ve %5 olarak belirlenmiştir. Türk gıda kodeksine göre çiğ et ve kıyma için *Bacillus cereus* ve *C. perfringens* için bir mikrobiyolojik kriter belirlenmemiştir. Sadece hazırlanmış et karışımlarında, *Bacillus*

spp. en fazla $1,0 \times 10^4$ - $1,0 \times 10^5$ kob/g arasında, *C. perfringens* ise, $2,0 \times 10^1$ - $1,0 \times 10^2$ kob/g arasında bulunabilir (Gökmen, 2003).

İstanbul'da satışa sunulan hazır kıymalarla ilgili bir başka çalışmada ise, Toplam aerobik canlı ortalama $2,7 \times 10^6$ kob/g oranında, koliform $4,1 \times 10^4$ kob/g oranında, *E.coli* $7,2 \times 10^3$ kob/g oranında, koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus* $3,2 \times 10^3$ kob/g oranında, *Bacillus cereus* $9,5 \times 10^3$ kob/g oranında tespit edilmiştir (Başkaya et al., 2004). Ayrıca 27 örneğin üçünde *Salmonella* spp. saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca hazır kıymalarda sıklıkla ürünün içerisine fazla miktarda yağ doku ve sakatat karıştırıldığı da tespit edilmiştir.

2.4. Et Ürünlerinde Starter Kültürler

2.4.1. Laktik Asit Bakterileri

Firmicutes Phylum'u ve *Lactobacillales* takımı içerisinde yer alan bir çok bakteri genusu "Laktik Asit Bakterileri" adıyla bilinen bakteri grubunu oluşturmaktadır. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* laktik asit bakterisi (LAB) olarak tanınmaktadır (Holzapfel et al., 2001). Laktik asit üreten ama *Actinobacteria* phylumuna ait olan *Aerococcus*, *Microbacterium* ve *Propionibacterium* ile *Bifidobacterium* genusları da genomik açıdan farklı olsalar da fonksiyonları ve fizyolojileri nedeniyle LAB içerisinde değerlendirilirler (Holzapfel et al., 2001).

İlk kez 19. yüzyıl sonlarında sütte fermentasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda *Lactobacillaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmışlardır. Morfolojik açıdan değişik özellik gösteren (kısa veya uzun çomak ya da kok şekilli) familya üyeleri fizyolojik açıdan oldukça benzer özellikler göstermektedirler. Tüm üyeler Gram pozitif, katalaz negatif (düşük oranda şeker içeren ortamda pseudokatalaza sahip suşlar görülebilmektedir.), sporsuz, fakültatif anaerobik, *Pediococcus* genusu hariç yalnız tek düzlemde bölünen, bazı istisnalar hariç hareketsiz, çubuk veya kok şekilli bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Çon ve Gökalp, 2000). Fermentatiftirler ve asıl fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Hem grubu içermeksizin (katalaz, sitokrom) oksijen varlığında gelişebilen nadir organizmalardır (Çon ve Gökalp, 2000).

Doğal ortamları, süt ve süt mamulleri, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvanların barsak mukozaları ve içerikleridir. Bunların dışında et ve et ürünleri, sebzeler, deniz ürünleri içecekler, fırıncılık ürünleri gibi gıdalardan, toprak, su, gübre ve atık sulardan izole edilmişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterileri, et, deniz ürünü ve içeceklerde bozulma etkeni olarak da görülebilmektedirler (Çon ve Gökalp, 2000). Bağışıklık sistemi baskılanmış insanlarda, özellikle *Lactobacillus rhamnosus* başta olmak üzere, fırsatçı patojen olarak hastalık etkeni olabilmekte, diş çürümelerinde katılımcı olarak rol oynayabilmektedirler (Cleveland et al, 2001). Bazı *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* strainleri

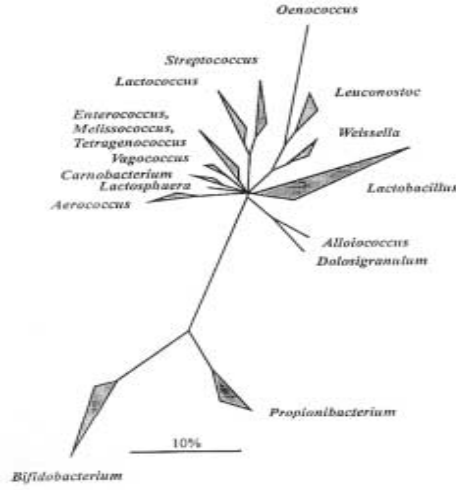
antibiyotik direnci geliştiren patojenler olarak insan sağlığını tehdit edebilmektedirler (Cleveland et al, 2001).

Laktik asit bakterileri fermentatif özelliklerine göre homofermentatif veya heterofermentatif olarak sınıflandırılabilirler. Homofermentatif laktik asit bakterileri; şekerleri fruktozdifosfat (FDP) yolu ile fermente ederek saf veya hemen hemen saf (<%90) laktik asit üretmektedir. Fermentasyon işleminin son safhasında pirüvik asitin laktik asite indirgenmesi için gliseraldehit 3-fosfat'ın dehidrogenasyonundan elde edilen NADH+H kullanılmaktadır (Çon ve Gökalp, 2000).

Heterofermentatif laktik asit bakterileri FDP yolunun önemli enzimlerinden aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz enzimine sahip değillerdir. Bu yüzden heterofermentatif türler FDP yolunu kullanamamaktadır. Glukozun yıkımı pentozfosfat (PP) yolu ile olmakta sonuçta laktat ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol ve karbondioksit üretilmektedir (Çon ve Gökalp, 2000).

Bir kısım heterofermentatif laktik asit bakterileri ise Asetil - P'yi ya kısmen ya da tamamen asetik asite dönüştürebilmektedir.

Laktik asit bakterilerininin 16S ribosomal RNA (rRNA) dizi analizine dayanan taksonomik sınıflandırmasına fenotipik özelliklerin filogenetik ilişkilerle birebir uyuşmadığını ortaya koymuştur (Holzapfel et al., 2001).



Şekil 2.1. Laktik asit bakterilerinin Filogenetik Ağacı (Holzapfel et al., 2001)

16S r RNA genlerinin karşılaştırmalı analizine dayanan, laktik asit bakterilerinin önemli filogenetik gruplarını ve onlarla genetik açıdan ilişkili olmayan Gram pozitif *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium* genuslarını gösteren filogenetik ağaç bu bakterilerin genetik çeşitliliğini ortaya koymaktadır (Holzapfel et al., 2001).

Laktik asit bakterileri, doğada yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretimi ve olgunlaştırılmalarında olumlu ve önemli rol oynamaları nedeniyle gıda teknolojisinde önemli yer tutmaktadırlar (Champomier Verges et al., 2002).

Çiğ materyalin laktik asit bakterileri yardımıyla fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda koruma yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Süt

ürünleri, fermente et ürünleri, farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit bakterilerinin fermentasyon süreci sonucu ortaya çıkmaktadırlar (Çon ve Gökalp, 2000).

Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya starter kültür olarak kullanılan bir çok laktik asit bakterisinin, gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenleri içeren bazı mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu anatagonistik aktivitenin farklı bazı mekanizmalar sonucu oluştuğu bilinmektedir (Çon ve Gökalp, 1999; Parada et al, 2007). Bunlar aşağıda maddelenmiştir:

1. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu laktik ve asetik asit gibi organik asitler üretilmektedir. Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma bu organik asitlere ve bunlar nedeniyle düşen pH'a karşı duyarlıdır.
2. Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen H_2O_2 , birçok mikroorganizma üzerinde inhibitör etki gösterebilmektedir.
3. Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli peptidler özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermektedir.
4. Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO_2 gibi metabolitlerin de inhibitör etkisi bulunmaktadır.

Tüm bu bileşenlerin ayrı ayrı inhibitör etkide bulunabilmesine rağmen laktik asit bakterilerinin diğer bakterilere karşı inhibitör etkisi bunların sadece birisine bağlı olmayıp, bunların kombinasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (Cleveland et al., 2001; Çon ve Gökalp, 2000; Parada et al., 2007).

2.4.2. Laktik Asit Bakterileri ve Genetik

Laktik asit bakterilerine hayatımızın çeşitli dönemlerinde gıda ve çevresel kaynaklar yoluyla maruz kalırız. Laktik asit bakterileri bir çok farklı genusu içerdiğinden, nişleri çeşitlilik gösteren bu bakterilerin, metabolik son ürün olarak laktik asit üretmeleri önemli bir ortak noktadır (Cleveland et al., 2001; Çon ve Gökalp, 2000; Parada et al.,2007).

Bugüne kadar, laktik asit bakterileri üzerine yapılan moleküler çalışmalar genetik ve metabolik özelliklerinin ve kapasitelerini araştırılması, evrimsel geçmişlerinin keşfi, gen mühendisliği ile yeni starter ve prebiyotik türlerin geliştirilmesi gibi amaçlarla yürütülmüştür (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Bu güne kadar 20 adet Laktik asit bakterisinin genom dizi analizi tamamlanmış ve yayınlanmıştır (Valenzuela et al., 2008). Laktik asit bakterilerinin genomları düşük GC içeriğine sahiptirler ve birçok LAB genomunun biyosentetik kapasitesi gastrointestinal sistem veya süt gibi besinden yana zengin ortamlara uyum süreci sırasında küçülmüştür. LAB genomu, *Oenococcus oeni*'nin 1,8 Mb'lık genomundan 3,3. Mb

boyutunda olan *Lactobacillus plantarum*'a kadar değişik boyutlarda olabilmektedir (Nes and Johnsborg, 2004).

Lactobacillales takımının *Bacilli* içerisindeki atalarından ayrılması 600-1200 kadar genin kaybı ile sonuçlanmıştır. Biyosentez ile ilgili enzimler ve sporulasyon genleri kaybedilen genlerin arasındadır. Bu genomik farklılaşmaya en güzel örnek; patojen *Streptococcus* spp.den ayrılan *Streptococcus thermophilus*'un antibiyotik direnci ve adhezyon gibi virülens özellikleri ile ilişkili genlerini kaybederek geçirdiği değişimdir (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Gen kazanımları ise, spesifik nişlere organizmanın adaptasyonunu sağlamak amacıyla gerçekleşmiştir. *Lactobacillales* takımının ayrışmasından sonra, karbonhidrat metabolizması ve taşınması ile ilişkili genler ile amino asit transportu ve protein sentezi ile ilişkili genlerde bir duplikasyon gerçekleşmiştir. Bu şekilde farklı laktik asit bakterilerinin protein ve karbonhidrat açısından zengin ortamlara adaptasyonu gerçekleşmiştir. Mesela, et ürünlerinde yaygınlıkla kullanılan bir starter kültür olan *Lactobacillus sakei*'nin genomu, türün ilk izolasyonunun gerçekleştirildiği fermente sucuk ortamına nasıl adapte olduğunu yansıtmaktadır. Osmotik ve ortam ısısındaki değişimlere karşı koruyucu proteinleri kodlayan bir çok ORF (Open reading frame) identifiye edilmiş, bunun dışında heme kullanımı ve oksidatif strese karşı direnç sağlayan genler de bulunmuştur. *Lactobacillus sakei*, zorlu fermentasyon koşullarına karşı bu stres tolerans genlerinin yardımıyla karşı koymaktadır (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Laktik asit bakterilerinin genomik özelliklerinin ve evrimsel geçmişlerinin aydınlatılması ile ilgili çalışmalar dışında bu bakterilerin gıda endüstrisi ve insan sağlığındaki rolü kapsamında araştırmalar yapılmaktadır (Nes and Johnsborg, 2004; De Vuyst and Leroy, 2007). Bu tip çalışmalar genellikle endüstriyel veya medikal amaçlarla laktik asit bakterilerinden sağlanan yararların gen mühendisliği yardımıyla daha da artırılmasına yöneliktir. Bu çalışmalar, laktik asit bakterilerinin gıda fermentasyonlarında kullanılan strainlerin genetik potansiyelinin iyileştirilmesi ve gıdalara daha iyi tat ve aroma kazandırılması ile birlikte, bu suşların antimikrobiyal etkilerinin optimize edilmesini, yeni prebiyotik ve probiyotiklerin geliştirilmesini, ayrıca bu bakterilerin olası zararlı etkilerinin ortaya çıkarılmasını, böylece insan sağlığının korunmasını amaçlamaktadır (Nes and Johnsborg, 2004; De Vuyst and Leroy, 2007).

Fermentasyon teknolojisi ile uğraşan bilim insanları için strain geliştirme devamlılık gösteren bir uğraştır. Bu çalışmaların sonucunda, yüksek kalitede ürünlerin hızlı bir fermentasyon süreci sonucunda eldesi amaçlanmaktadır. Bakteriyel genom yapısının açıklığa kavuşturulmasıyla, bir suşun tüm biyosentetik kapasitesini değerlendirmek olası hale gelmektedir. Mesela, *L. helveticus* CNRZ32'nin proteolitik sistemini aydınlatmak için yapılan çalışmalar sonucunda, proteolitik enzimleri kodlayan 12 gen keşfedilmiş, ve buna bu strainin genom dizisinin belirlenmesi çalışmaları ile proteolizis sırasında etkinlik gösteren başka gen dizileri eklenmiştir. Proteolizis peynir yapımında önemli rol oynamaktadır. Proteolizis ile ilişkili genlerin

aydınlatılması ile bu strainin proteolitik aktivitesinin düzenlenmesi mümkün olabilecektir (Klaenhammer, 1993).

Laktik asit bakterilerinin daha genel metabolik yolluğunun aydınlatılması dışında, antimikrobiyal aktivitelerinin keşfedilmesi ve düzenlenmesi de genetik çalışmalarının odağındadır. Özellikle bakteriyosinler başta olmak üzere bu bakteriler tarafından sentezlenen antimikrobiyal ajanlar (Ehrmann, 2000), yapı-fonksiyon ilişkilerinin keşfi (Fregeau Gallagher et al., 1997), yeni bakteriyosinlerin klasik yöntemlere dayanmadan daha hızlı bir şekilde belirlenmesi (Elegado et al., 2004), bakteriyosinlerin ve diğer antimikrobiyal maddelerin farklı özelliklerinin- direnç mekanizmalarının gelişimi gibi- açığa çıkarılması gibi amaçlarla genetik çalışmalara konu olmaktadır (Nes and Johnsborg, 2004; Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Hem sınıf I hem de sınıf II bakteriyosinlerin yapı-fonksiyon ilişkileri ciddi şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalar en iyi bilinen lantibiyotik olan nisin (Nes and Johnsborg, 2004). Pediocin ve pediocin benzeri sınıf II bakteriyosinler (Eijsink et al., 1998), Leucocin A (Fregeau Gallagher et al., 1997) ve carnobacteriocinler (Wang et al., 1999) üzerinde yürütülmüş, bu bakteriyosinlerin antimikrobiyal etkilerinin hedef hücrelerde spesifik bir reseptörle ilişki kurmalarına bağlı olduğu görülmüştür. Bu araştırmaların nihai amacı doğal olarak, gen mühendisliği ile yeni ve daha güçlü bakteriyosinlerin tasarlanabilmesi için gerekli bilgiyi sağlamaktır.

Yeni ve daha etkin bakteriyosinlerin identifikasyonu için laktik asit bakterilerinin genomu hakkındaki bilgimizi kullanabiliriz. Her ne kadar farklı bakteriyosin lokuslarının yapısı farklı olsa da bazı organizasyon

özellikleri ortaktır. Korunmuş olan bu özellikler, bakteriyosin dizileri hakkındaki bilgilerle birlikte, bakteriyosin genlerinin araştırılmasında yardımcı olmaktadır.

Normal koşullarda bakteriyosin yapısal geni bir pre-kürsör peptid kodlar. Bu peptid daha sonra işlenir ve özel bir transport mekanizması ile salıverilir. Bu özel transport sistemi dizideki konsensüs elementleri tarafından tanınan tipik bir lider peptid kullanırlar. Nisin ve diğer lantibiyotikler hidrofilik bir lider peptid ile üretilirler. Bu lider, bakteriyosin lokusundaki bazı genlerle ortak transkripsiyon sürecinden geçen özel bir serin proteaz tarafından kesilir. Bazı lantibiyotikler ve Sınıf II bakteriyosinlerde görülen bir diğer lider peptid tipi ise çift glisin lideri adıyla bilinmektedir. Bu tip bakteriyosin prekürsörleri bir ABC Transporteri ve bir aksesuar proteinden oluşan, transkripsiyonu ortak gerçekleştirilen özel bir mekanizma tarafından işlenir ve salıverilir. Sınıf II bakteriyosin genleri ile ilgili bir başka özellik ise bakteriyosin kodlayan genlerin, bağışıklık geni ile ortak transkribe edilmesidir (Eijsink et al., 1998).

Bakteriyosin genleri derinlemesine araştırıldıkça, peptidlerin antimikrobiyal potansiyelinin anlaşılması, yeni peptidlerin sentezi, in vivo ekspresyon klonlaması, in vitro olarak transkripsiyon/translasyonun indüklenmesi, ve antimikrobiyal üretiminin arttırılması için özel koşulların kullanımı gibi çalışmalar kolaylaşacaktır (Nes and Johnsborg, 2004).

Geleneksel antibiyotiklerde olduğu gibi, bakteriyosinlerin durumunda da direnç gelişimi mümkündür. Direnç mekanizmaları büyük olasılıkla hücrelerin lipid kompozisyonunu değiştirme kapasitesinin

sonucu olarak gelişmektedir ama bunun spontan mutasyonların sonucu gelişip gelişmediği belli değildir. Direnç mekanizmaları hem pediocin grubu hem de nisin için araştırılmıştır. Mannoza fosfotransferaz sistemi bakteriyosinlere direnç gelişimi için önemlidir. Bakteriyosinlere dirençli veya duyarlı izojenik strainlerin transkripsiyon profillerinin çıkarılması, direnç mekanizmalarının gelişiminin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Probiyotik ve prebiyotik strainlerin geliştirilmesi ve araştırılması amacıyla da laktik asit bakterileri gen mühendisliği ile manipüle edilebilmektedir. “Probiyotik”, uygun miktarlarda alındığında konakçının sağlığını olumlu yönden etkileyen canlı mikroorganizmaları tanımlamakta, “Prebiyotik” ise sınırlı sayıda özgün bakterinin gelişimini seçici olarak uyaran ve konakçının sağlığını koruyan normalde sindirilebilir olmayan maddelere verilen isimdir. Probiyotik laktik asit bakterileri, özellikle *Lactobacillus* spp. sindirim kanalının zorlu koşullarında hayatta kalabilmektedirler. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* ve *L. salivarius*'de biyosentez yeteneklerinin yerine proteolitik sistemler ve makromolekül alım kapasitesinin geçmiş olması, asit ve safra içeren ve bakteri üzerinde stres yaratan koşullara dirençlilikleri ve gastrointestinal epitele adhezyon özellikleri ile farklılık arz etmektedirler. Laktik asit bakterilerinin genom projeleri içersinde adhezyonda rol oynayan hücre yüzey proteinlerinin aydınlatılması ayrı bir önem taşımaktadır. Örneğin *L. acidophilus* genomu hücre yüzeyine bağlanmayı sağlayan proteinleri kodlayan 26 gen içermektedir. Bu genlerin arasında mukus ve fibrinojen bağlayan proteinleri kodlayanlar da bulunmaktadır. Fonksiyonel analizler, bu proteinlerden üçünün in

vitro olarak barsak epitelyum hücrelerine adherens mekanizmasında rol oynadığını ortaya koymuştur (Pfeiler and Klaenhammer, 2007).

Laktik Asit bakterilerinin kullanımının insan sağlığı açısından da gözden geçirilmesi gerekmektedir. Laktik asit bakterileri genelde GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsünde olsalar da, özellikle bazı *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* strainleri Risk Grubu II içerisinde yer alan patojenlerdir. Bu enterokoklar ile birlikte bazı *Lactobacillus* spp. ve *Leuconostoc* spp.'nin teicoplanin ve vancomycine gibi antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu direnç, hareketli bir genetik element vasıtasıyla farklı bakteriyel strainlere aktarılabilir ve yeni dirençli tür ve suşların doğmasına neden olabilir. Özellikle, plasmid yoluyla genetik materyal akışının, Laktik asit bakterileri için, transposonlara göre daha önemli olduğu bildirilmiştir. Bu güvenlik konusu da araştırmacıların özellikle üzerinde durmasını gerektirmektedir (Klaenhammer, 1993).

2.4.3. Starter Kültürler

Etin fermentasyon yoluyla saklanması yüzlerce yıldır kullanılan bir tekniktir. Uzun zaman boyunca bu ürünlerin raf ömrü, ette bulunan doğal mikrofloraya, nitrat kullanımına ve yüksek oranda ürüne katılan tuza bağımlıydı. İkinci Dünya Savaşı sonrası, fermente et ürünlerine olan talebin artması sonucu, araştırmacılar et ürünleri için fermentasyon sürecini standardize ederek kaliteyi arttıracak starter kültürlerin geliştirilmesine başladılar. 1940 yılında Jensen ve Paddock tarafından *Lactobacillus* spp. fermente sucuk hamuruna inokule edilerek, olgunlaşma sürecinin kısaltılması ve aroma ile kalitenin artırılması sağlandı (Klaenhammer,1993). İlk laktik asit bakterisi olan et starter

kültürü, *Pediococcus cerevisae*'nin saf bir kültürüydü ve 1955 yılında A.B.D'de geliştirilmişti. Günümüzde bir çok firma, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus acidilactici*, *P.pentosaceus*, *Staphylococcus xylosus* veya *S. carnosus* strainlerinin saf kültürlerini veya karışımlarını piyasaya sunmaktadırlar (Alves et al, 2006).

Hammes'in tanımına göre (1996), et starter kültürleri "Ette istenilen metabolik aktivitenin gelişimini sağlayan mikroorganizmaları içeren karışımlar"dır (Cleveland et al., 2001). Bu mikroorganizmalar genel olarak heterofermentatif strainler olup heksoz şekerlerden laktik asit, pentoz şekerlerden ise hem laktik hem de asetik asit üretirler. Üretilen asetik asit miktarı tipik olarak laktik asit miktarının 1/10'udur (Çon ve Gökalp, 1999).

Fermente sucuk üretimi ve olgunlaşması sırasında gerçekleşen kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar sonucu proteinler peptidlere, dipeptidlere ve amino asitlere parçalanırken, lipidler ise yağ asitlerine ayrılır. Amino asitler daha da fazla dekarboksile olarak, biyojenik aminler veya aroma bileşiklerine dönüşürler. Biyojenik aminler, özellikle *Enterococcus* spp., *Carnobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Micrococcus* spp. ve et ürünlerinin florasında bulunan laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedirler. Bu bileşiklerin yüksek oranda tüketilmesi toksik etki yaratabilmektedir. Histamin ve Tiramin toksik etkileri belgelenmiş biyojenik aminlerdir (Çon ve Gökalp, 1999).

Starter kültür kullanımının fermente et ürününün pH'nın düşürülmesine, ürünün renk, tekstür, tat, su içeriği, hijyenik kalitesi ve raf ömrü üzerinde olumlu etkisi olduğu daha önce bildirilmiştir (Yaman et al., 1998).

Fermente et ürünlerine eklenebilecek olan starter kültürler, şu amaçlar için kullanılabilirler :

1. Laktik asit ve diğer organik asitler ile bakteriyosin üretilmesi (Biyo-koruyucu kültürler).
2. Renk ve tat oluşturulmasına katkıda bulunmak
3. Ürünün yüzeyinde tabaka oluşturmak (Küf ve mayalar).

Starter kültür kullanımının yarattığı birçok avantaj bulunmaktadır. Bunlar:

1. Bilinen sayı ve kalitede kültürlerdir. Fermentasyon sürecinin düzgün işlemesi, iyi bir renk elde edilmesinde daha garantilidirler.
2. Fermentasyon sürecini hızlandırabilmektedirler. Ticari kültürler farklı ısı aralıklarında çalışmak üzere optimize edilmektedirler, bu da geleneksel sucuk üretiminden daha kısa sürede daha güvenli ve kaliteli ürün eldesine yardımcı olmaktadır.
3. Üretim sürecinin standardize edilmesine yardımcı olurlar
4. Gıda patojeni olan veya gıdalarda bozulmaya yol açan istenmeyen mikroorganizmalarla rekabet ederek daha güvenli ürün elde edilmesini sağlarlar (Çon ve Gökalp,1999).

Çizelge 2.1. Farklı fermente et ürünlerinde kullanılabilir starter kültürlerine genel bir bakış (Çon ve Gökalp,1999):

Mikroorganizma	Genus	Tür	Etki
Laktik asit bakterileri	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.plantarum</i>	Antimikrobiyal etki
		<i>L.pentosum</i>	Antimikrobiyal etki
		<i>L.sakei</i>	Antimikrobiyal etki
		<i>L.curvatus</i>	Antimikrobiyal etki
	<i>Pediococcus</i>	<i>P.acidilactici</i>	Antimikrobiyal etki
		<i>P.pentosaceus</i>	
Renk ve aroma oluşumu için kullanılabilir türler	<i>Kocuria</i>	<i>K.varians</i>	Renk ve aroma
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S.xylosus</i>	Renk ve aroma
		<i>S.carnosus</i>	Renk ve aroma
Mayalar	<i>Debaryomeces</i>	<i>D.hansenii</i>	aroma
	<i>Candida</i>	<i>C.famata</i>	aroma
Küfler	<i>Penicillium</i>	<i>P.nalgiovense</i>	Beyaz küf
		<i>P.chrysogenum</i>	Beyaz küf

Laktik asit bakterileri, laktik asit ve bakteriyosin üreticisi oldukları gibi, asetik asit, H₂O₂, diasetil, CO₂, alkol gibi diğer antimikrobiyal etkili metabolitleri ile de patojen mikroorganizmaların inhibisyonuna katkıda bulunmaktadır (Çon ve Gökalp, 1999).

Çizelge 2.2.Laktik asit bakterilerinin metabolik ürünlerinin ticari önemi (Çon ve Gökalp,2000)

Metabolit	Yararlı Etki	Zararlı Etki
Laktik asit	Ürünün korunması, tat gelişimi	Asidifikasyon
Asetik asit	Aroma	Kötü tat
Diasetil	Aroma	Kötü tat (Birada)
CO ₂	Ürünün korunması, tat ve aroma gelişimi	Gaz oluşumu,şişkinlik
H ₂ O ₂	Ürün korunması	Dekolorasyon
Biyojenik Aminler	-	Sağlık (Gıda zehirlenmeleri)
Metan, thiol, H ₂ S	Aroma	Kötü tat ve koku
Bakteriyosinler	Ürünün korunması	Yararlı Laktik asit bakterilerinin baskılanması
Geniş spektrumlu anti mikrobiyaller	Patojen ve gıda bozulmasına neden olan mikroorganizmaların inhibisyonu	Barsak mikroflorasında direnç gelişmesi

Özellikle *Staphylococcus* spp. ve *Kocuria* spp. küreme süreci sırasında etkinlik göstermektedirler. Bunun için nitrat'tan nitrit üreterek renk, aroma ve ürünün güvenliğinin sağlanmasına yardımcı olurlar. Artık sodyum nitrit, nitratın yerini aldığı için, bu mikroorganizmalara ihtiyaç kalmamış gibi görünebilir ama yine de bazı durumlarda kullanılan nitritin tekrar nitrata dönüşebildiğini unutmamak gerekir. Bu durumda *Staphylococcus* spp. ve *Kocuria* spp.'ye ihtiyaç duyulacaktır (Yaman et al., 1998).

Küflerden *Penicillium* spp. özellikle Macaristan ve İtalya'da üretilen bazı geleneksel fermente et ürünlerinin dış yüzeyinde arzulan mermer görünümü veya tüylü bir görünüm vermeleri, mikotoksin üreten küf türleri ile rekabet etmeleri, ürüne özel tat ve aromalarını kazandırmaları için kullanılmaktadırlar (Kıvanç et al., 1992).

Her ne kadar, Türk tipi sucuk yapımında starter kültür kullanımı zorunlu olmasa da kullanımının renk, tat ve güvenlik sağlanması açısından olumlu etkisi olduğu kabul edilmelidir. Sucuk karışımına “hurdle” sisteminin bir parçası olarak eklenen starter kültür, sucuk karışımındaki olası patojenlerle nem, O₂, şekerler, protein gibi hücresel ihtiyaçlar için rekabet ederek bu patojenlerin gelişimini engelleyecektir (Erdoğrul et al., 2006).

Türkiye de de fermente et ürünleri üretiminin önemli bir bölümünü oluşturan sucuk yapımında da starter kültür kullanımı son 25 yılda yaygınlık kazanmaya başlamıştır. Türkiye’de sevilerek tüketilen sucuk üretiminde *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* çeşitli kombinasyonlar halinde kullanılmaktadır. Bunlara *Micrococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. de eklenebilmektedir (Erdoğrul et al., 2006).

2.4.4. Bakteriyosinler

Bakteriyosinlerle yapılan ilk çalışmalar *E.coli*’nin bir strainine ait, spesifitesi yüksek bir antimikrobiyal bileşiğin 1925 yılında Gratia tarafından keşfedilmesi ile başlamıştır. Bu ilk bakteriyosin Kolisin V olarak isimlendirilmiştir. Bundan sonra Enterobacteriaceae familyasının çeşitli üyeleri tarafından üretilen benzer yapıda antimikrobiyallerin bir grubu olduğu anlaşılmış ve genel bir isim olarak “kolisin” önerilmiştir.

Sonuçta “bakteriyosin” teriminin tanımı uzunca bir süre kolisinlere özgü karakteristik özelliklere göre yapılmaya çalışılmıştır. Jacob et al (1953) bakteriyosinleri çok dar spektrumlu özel hücre duvarı reseptörlerine bağlanma yeteneği olan bakteriyosidal proteinler olarak

tanımlamıştır (Klaebhammer, 1993). Daha sonraları bakteriyosin sentezinin plasmidlerle ilişkilendirilmesi söz konusu olmuştur.

Bakteriyosinler; ribozomal olarak sentezlenen, üretici bakteri ile yakın ilişkili türler üzerinde inhibe edici veya öldürücü etkisi bulunan antimikrobiyal proteinler veya peptidler olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım bakteriyosinlerin çoğunluğu için geçerli olmakla birlikte, bu antimikrobiyal peptidlerin, kendi üretici bakteri türü ile yakından ilişkili olmayan diğer bakteriler üzerinde de bakterisidal etkide bulunabildikleri bilinmektedir (Klaenhammer, 1993).

Laktik asit bakterilerinin tüm genusları içerisinde bakteriyosin üretimi belirlenmiştir. Buna rağmen farklı türlerin bakteriyosin üretme sıklıkları da birbirlerinden farklılık göstermektedir (De Vuyst and Leroy, 2007). Bakteriyosin üreticisi bazı önemli türler, bakteriyosinleri, bakteriyosinlerin özellikleri ve etki spektrumları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 2.3.Bakteriyosin Üreticisi Önemli Türler (Klaenhammer, 1993)

Üretici Tür	Bakteriyosin	Etki spektrumu	Özellikleri
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram (+) bakteriler	Sınıf I lantibiyotik, 3,5 kDa, 34 amino asit, ticari olarak kullanımı var
	Lacticin 3147	<i>Clostridium</i> sp. <i>L.monocytogenes</i> <i>S.aureus</i> <i>S.dysgalactiae</i> <i>E.faecalis</i> <i>S. mutans</i>	Sınıf I lantibiyotik, 4,2 kDa, ısıya dayanıklı, fizyolojik ve asidik pH altında aktif
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcin B	<i>Lactobacillus</i> spp.	Sınıf II bakteriyosin yaklaşık 5 kDa, dar etki spektrumu

Çizelge 2,3 (devam)

Üretici Tür	Bakteriyosin	Etki spektrumu	Özellikleri
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocin CH5	Özellikle <i>Lactobacillus</i> spp. başta olmak üzere Gram (+) bakteriler	Sınıf II bakteriyosin. Yüksek molekül ağırlıklı agregatlar oluşturur.
	Lactacin F	<i>L. fermentum</i> <i>E. faecalis</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i>	Sınıf II bakteriyosin 6,3 kDa, 57 amino asit, ısıya dayanıklı
	Lactacin B	<i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i>	Sınıf III bakteriyosin, 6,3 kDa ısıya dayanıklı, sadece pH 5,0-6,0 arasında gelişir.
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i>	Sınıf II bakteriyosin 4,8 kDa 50 amino asit dar etki spektrumu
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocin 705	<i>L.monocytogenes</i> <i>L. plantarum</i>	Sınıf II iki komponentli bakteriyosin 3,4 kDa
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocin A	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>L.monocytogenes</i>	Sınıf II, 3,9 kDa, 37 a.a., asidik pH'da kararlı, 100 C' de 20 dk. boyunca kararlı
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericin Y105	<i>E. faecalis</i> <i>L.monocytogenes</i>	Sınıf II, 3,8 kDa, 37 a.a., ısıya dayanıklı
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin F Pediocin PA-1	Gram (+)bakteriler	Sınıf II, 4,5 kDa, proteolitik enzimlere duyarlı, ısıya ve PH değişikliklerine dirençli
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin A	Gram (+)bakteriler	Sınıf II bakteriyosin 2,7 kDa, proteolitik enzimlere duyarlı ve ısıya dirençli
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocinler	<i>L.monocytogenes</i> Gram (+)bakteriler	Sınıf II, 4,8 kDa, ısıya dayanıklı
<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocin S	<i>Lactobacillus</i> spp.	Sınıf I, 3,7.kDa, 4,5 ve 5,5 pH arasında etkin
	Sakacin P	<i>L.monocytogenes</i>	Sınıf II bakteriyosin 4,4 kDa ısıya dayanıklı
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	<i>L.monocytogenes</i> <i>E.faecalis</i>	Sınıf II, 4,3 kDa
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i>	Sınıf III, 37 kDa, dar spektrumlu, proteolitik enzimlere duyarlı, ısıya duyarlı

2.4.5. Sınıflandırma

Bakteriyosinlerin sınıflandırılması, yeni moleküllerin keşfiyle ortaya çıkan farklılık ve benzerlikleri yansıtmak amacıyla sık sık yenilenmektedir (Cleveland et al.,2001).

Günümüzde en kabul gören sınıflandırmaya göre bakteriyosinler 3 gruba ayrılmaktadırlar (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996) Klaenhammer (1993) tarafından geliştirilen bu sisteme göre bakteriyosinler molekül ağırlığı, termostabilite, enzimatik duyarlılık, post translasyonel modifikasyonlar sonucu oluşan amino asitler, ve etki tarzı gibi özellikler göz önüne alınarak 4 gruba ayrılmaktadırlar.

Sınıf I bakteriyosinler lantibiyotikler olarak da bilinmektedirler ve lanthionine, methyl lanthionine, dehydrobutyrine ve dehydroalanine gibi az rastlanan amino asitleri içermektedirler. Sınıf I bakteriyosinler Grup Ia ve Ib olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadırlar. Grup I a üyeleri 5 kDa 'dan küçük molekül ağırlığına sahip, küçük esnek peptidlerdir. Bu grup hedef hücrenin membranında porlar oluşturarak membran bütünlüğünü bozmaya yarayan hidrofobik ve katyonik peptidleri içermektedir.1928 yılında keşfedilen nisin de bu grubun içerisinde yer almaktadır. Grup 1b ise globuler şekilli, Grup 1a'ya göre daha katı anyonik veya nötral peptidleri içerir. Grup 1b lantibiyotikler hücre duvarının biyosentezinin inhibisyonu yoluyla antimikrobiyal etki gösterirler. Bu grubun içerisinde mercacidin, cinnamicin ve actagradin yer almaktadır.

Sınıf II küçük ısıya dayanıklı, modifiye edilmeyen peptidleri içermektedir ve yine iki alt gruba ayrılabilir. Grup II a pediocin benzeri, N terminalde bir Tyr-Gly-Asp-Gly- Val konsensüs dizisi ve yine peptidin N terminal yarımında bir sülfid köprüsü oluşturan iki sistein içeren anti *Listerial* etkili bir peptid grubudur. Pediocin AcH/PA-1, Sakacin A ve P, Leucocin A, Carnobacteriocinler bu grup içerisinde yer almaktadırlar. Grup IIb aktif bir por oluşturma kapasitesi için, iki farklı peptid ihtiyaç duyan, iki komponentli bir sistemdir. Bu iki peptidin amino asit dizilimleri birbirinden farklıdır. Her biri kendi ilişkili geni tarafından kodlansa da, tek bir bağışıklık genine ihtiyaç duyarlar. Enterocin L50A ve B, Lactococcin G ve M/N, Plantaricin EF ve JK bu grup içerisinde yer alır.

Sınıf III bakteriyosinleri haklarında fazla bilgi olmayan > 30 kDa'luk ısıya duyarlı iri proteinlerdir. *L. helveticus* 481 tarafından üretilen helveticin J, *L. acidophilus* tarafından üretilen lacticin B bu sınıfın üyeleridir (Çizelge 2,4)

Klaenhammer bu yaygın kabul gören 3 grubun dışında 4. bir grup daha önermiştir. Bu grup glikoprotein veya lipoprotein yapısında kompleks bakteriyosinlerdir. Glikoprotein yapısında olan Lactocin 27 veya lipo-protein yapısında olan Lacstrepcinler bu gruba dahildir. Yine de bu bakteriyosinler henüz tam olarak saflaştırılmamıştır. Bu grupta yer aldığı düşünülen bakteriyosinlerin katyonik ve hidrofobik özellikleri nedeniyle diğer makromoleküllerle kompleksler oluşturma eğilimine

sahip oldukları ve bu nedenle bu kompleks bakteriyosinlerin aslında bir kalıntı olabilecekleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Klaenhammer'ın bu sınıflandırılması dışında, 2003 yılında Kemperman tarafından yeni bir sınıflandırma modeli daha önerilmiştir. Sınıf V isimli bu yeni sınıf, ribozomal olarak sentezlenen , modifiye edilmeyen, kuyruk-baş bağlantılı siklik antimikrobiyalleri içermektedir.

Cotter et al., (2005) daha radikal bir düzenleme önermiştir. Klaenhammer'ın ilk iki sınıfını (lantibiyotikler ile lanthionine içermeyen bakteriyosinler) büyük ölçüde kabul etmiş, sınıf III' e litik etkilerinden ötürü bakteriyosinler demiş, sınıf IV'ü ise reddetmiştir. Ayrıca Kemperman'ın sınıf V'ini sınıf IIc olarak ele almıştır. Sınıf II d adında yeni bir sınıf daha oluşturmuş ve lanthionine içermeyen ve sınıflandırılmayan bakteriyosinleri bu gruba dahil etmiştir.

Bakteriyosinlerin sınıflandırılması hala tartışılan bir konu olmaktadır.

Çizelge 2.4..Klaenhammer'ın (1993) sınıflandırmasına göre bakteriyosinler

Sınıf	Grup	Özellikler	Örnekler
I	Ia	Lantibiyotikler, <5kDa, Lanthionine ve beta methyl lanthionine içerirler. Esnek moleküllerdir.	Nisin
	Ib	Nötral veya anyonik globuler peptidler	Mercacidin Cinnamicin Actagardin
II	IIa	Küçük, termostabil peptidler. Anti- <i>Listerial</i> etki. N-terminalde bir konsensus dizisi.	Pediocin AcH/PA-1 Sakacin A ve P Leucocin A Carnobacteriocin'ler
	IIb	İki komponentli sistemler.	Lactococin G ve F Laktacin EF ve JK Helveticin J ve V-1829 Acidophilocin A
III		Isıya duyarlı iri moleküller	Lacticin A ve B

2.4.6. Bakteriyosinlerin Özellikleri

Düşük pH'da yüksek antimikrobiyal aktivitenin farklı nedenleri olabilir. Öncelikle bu durum, hidrofilik peptidlerin agregasyon oluşturma yeteneğinin azlığı ve duyarlı hücrelerle daha fazla etkileşime girme

zorunluluğu sonucu olabilir. Ayrıca hücre duvarına daha az molekül bağlandığından bakterisidal aktivite için daha çok molekül elde edilebilmektedir. Üçüncü olarak, hidrofilik bakteriyosinler duyarlı bakterilerin hücre duvarının hidrofilik bölgelerinden geçmek için yüksek kapasiteye sahiptirler. En son olarak, şunu söyleyebiliriz: Non lantibiyotik bakteriyosinlerin membran reseptörleriyle etkileşimi, yükselen pH düzeyleri ile birlikte inhibe olabilmektedir (Klaenahmmer, 1993).

Bakteriyosinler genellikle antibiyotiklerle karıştırılmaktadır ve bu durum bakteriyosinlerin gıda alanındaki kullanım alanını sınırlamıştır. Tıp alanında kullanılan antibiyotiklerden farklı olan bakteriyosinler, gıdalardaki hedef patojenlerin üremesinin güvenli şekilde kontrol edilmesine yardımcı olabilir. Bakteriyosinler antibiyotiklerden biyosentez, etki şekli, etki spektrumu, toksisite ve direnç mekanizmaları yönünden ayrılır. Bu farkları söyle maddeleyebiliriz:

1. Bakteriyosinler ribosomal olarak sentezlenen peptidlerdir, oysa antibiyotikler çok adımlı yol izleri aracılığıyla sentezlenen sekonder metabolitlerdir.
2. Bakteriyosinler genellikle antibiyotiklere göre daha dar etki spektrumuna sahip antimikrobiyallerdir.
3. Konukçu hücre, bakteriyosinlerine karşı bağışıklıdır çünkü, bu “bağışıklık proteinleri”ni kodlayan genler, bakteriyosin sentezi ile ilgili diğer genlerle yakın genetik lokasyonlarda bulunur. Yapısal bakteriyosin geni ve bağışıklık geninin aynı operon üzerinde, hatta yan yana olması sık rastlanan bir durumdur. Bu durum

konukçu hücre bağışıklığının görülmediği antibiyotiklerden farklıdır.

4. Hedef hücre dirençliliği bakteriyosinlerde genellikle hedef hücre membranında fizyolojik değişimden kaynaklanmaktadır. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç ise hücreler, strainler ve türler arasında direnç özelliğinin aktarımını sağlayan bir genetik determinantla ilgilidir. Yine de bakteriyosinlere karşı direnç gelişimi ile ilgili bazı çalışmalarda, mutasyonlar sonucu bakteriyosin direnci kazanılabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Mesela Gravesen et al (2000) yürüttükleri bir araştırmada, Pediocin AcH/PA-1'e dirençli *Listeria monocytogenes* mutantlarında beta glukosit spesifik fosfoenolpiruvat bağımlı fosfotransferaz sistemlerini (PTS) kodlayan gen fragmanlarında artan bir gen ekspresyonu oranı tespit etmişlerdir. PTS'in Pediocin ile nasıl etkileştiği ise henüz açığa kavuşturulmamıştır.
5. Bakteriyosinler genellikle por oluşturarak, transmembran potansiyeline etki etmektedirler. Bu sayede selüler içeriğin dışarı sızmasına neden olmaktadır. Nisin ve Pediocin AcH/PA-1'in etki mekanizması böyledir. Bazı durumlarda hücre duvarı biyosentezini bozdukları bilinmektedir. Mesela, Mercacidin peptidoglikan biyosentezini inhibe ederek etki gösterir..
6. Bakteriyosinlerin bilinen toksik etkileri bulunmamaktadır. Özellikle nisin ile ilgili, akut, kronik, subkronik toksisite çalışmaları, ayrıca ürogenital sisteme etkileri, sensitizasyon ve

çarpraz reaksiyonları üzerine yapılan araştırmalarda Nisin'in 2,9 mg/kg oranında günlük tüketiminin insan sağlığı açısından her hangi bir tehdit oluşturmadığı öngörülmüştür. Ayrıca yapılan çalışmalarda, nisin'in barsak mikroflorası üzerine herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilememiştir. Pediocin AcH/PA-1 ile ilgili yapılan çalışmalarda da henüz, herhangi bir zararlı etkiye rastlanmamıştır. Oysa antibiyotiklerin toksik etkileri olabileceği gibi farklı yan etkileri de bilinmektedir (on ve Gökalp, 1999; Klaenhammer,1993).

2.4.7.Gıda Sistemlerinde Bakteriyosinlerin Kullanımı ve Etkinlikleri

Özellikle fermente gıda üretiminde laktik asit bakterileri sıklıkla kullanıldığından bakteriyosin üreticisi olan türlerin starter kültür olarak kullanımı uzun zamandan beri araştırmacıların ilgi alanlarından biri olmuştur. Bunlar arasında *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in yanı sıra *Lactobacillus plantarum*, *L.sake*, *L. helveticus*, *Pediococcus acidilactici*, *P.pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium* spp., v.s. gibi bir çok tür bulunmaktadır. Bu konu daha önce starter kültürler ile ilişkili bölümde işlenmiştir.

Araştırmacılar ayrıca moleküler genetik metodların yardımıyla bakteriyosin kodlayan genlerin farklı türler içerisinde ekspresyonu üzerinde de çalışmışlardır. Mesela Pediocin AcH/PA-1'i kodlayan plasmidin *Lactococcus lactis* içerisinde ekspresyonu ile cheddar peynir üretiminde kalitenin artırılması (Buyong et al.,1998), yine Pediocin

AcH/PA-1'in *Streptococcus thermophilus* içerisinde (Coderre ve Somkuti,1999) veya *Saccharomyces cerevisiae* içerisinde (Schoeman et al., 1999) ekspresyonu da bu çalışmalara örnektir. Bir başka çalışmada Pediocin AcH/PA-1 ve Nisin'in, *Lactococcus lactis* içerisinde ko-ekspresyonunu başarıyla gerçekleştirilmiştir (Horn et al., 1999). Benzer bir çalışmada, Reviriego et al., (2007) yine Pediocin AcH/PA-1'in nisin üreten ve üretmeyen *L. lactis* strainleri içerisinde heterolog üretimini gerçekleştirmişlerdir. Smid et al., (2005) laktik asit bakterilerinin, istenilen metabolitlerin sentezletilebildiği fabrika-hücreler olarak nasıl geliştirilebileceğini araştırmıştır.

Bakteriyosinlerin gıda sistemlerinde kullanımının bir başka yolu da bakteriyosin karışımlarının ürünlere direkt olarak eklenmesidir. Nisin Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği üye ülkeleri tarafından onaylanan tek bakteriyosindir. Gıdalarda kullanılması Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1968'de, A.B.D'de kullanımı ise 1988'de onaylanmıştır. Günümüzde A.B. ülkeleri dahil 40'dan fazla ülkede kullanımına onay verilmiştir. Nisin A.B. ülkelerinde kullanılabilen gıda katkı maddelerinin listesinde E 234 olarak yer almakta, "koruyucu" veya "doğal koruyucu" olarak da etiketlenebilmektedir. Nisin farklı türlerde gıdalarda antimikrobiyal etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (Tablo2).

Çizelge 2.5. Nisin'in gıda sistemlerinde etkin kullanımı ile ilgili örnekler
(Cleveland et al., 2001)

Gıda Ürünü	Hedef Mikroorganizma	Etkin Nisin Derişimi (IU/ml)
Çökelek Peyniri	<i>L.monocytogenes</i>	2000
Ricotta Peyniri	<i>L.monocytogenes</i>	100
Süt	<i>B.cereus sporları</i>	4000
Bologna tipi sucuk	<i>Lactob.sake ve curvatus</i>	1000
Bonfile	<i>Bro. thermosphacta</i>	400
Kimchi	<i>Lactobacillus spp.</i>	100

Bir bakteriyosinin gıda koruyucusu olarak kullanılabilmesi için; kimyasal olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiş olması, etki şekli ve üretim tarzının açıklanması, kantitatif analizi ve standardizasyonuna ilişkin testlerin yapılması, toksikolojik verilerin bilinmesi gerekmektedir (Çizelge 1).

Doğal antimikrobiyal bileşiklerin Gıda koruyucusu olarak kullanımı için gerekli koşullar (Klaenhammer, 1993).

Toksikolojik verileri kabul edilebilir düzeyde olmalıdır.

Gıda ürününün organoleptik etkileri üzerinde olumsuz etki yaratmamalıdır.

Medikal alanda kullanımı olmamalıdır.

Görece olarak düşük konsantrasyonlarda etkinlik göstermelidir.

Kullanımdan önce depolama boyunca ve gıdanın raf ömrü boyunca kararlı kalabilme özelliği yeterli olmalıdır.

Maliyeti endüstri açısından uygun olmalıdır.

Gıda koruyucuları olarak bakteriyosinlerin ve starter kültürlerin kullanımı ile ilgili örnek ve önerilerin bazıları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3).

Çizelge 2.6. Gıda korucusu olarak bakteriyosinler ve gıda sistemlerinde uygulamaları
(Cleveland et al, 2001)

Bakteriyosin	Uygulaması	Sonuç	Referanslar
Nisin A	Nisin'in bağlayıcı bir sistemle birleştirilmesi	Yeniden şekillendirilen et ürünlerinde nisin istenmeyen bakterileri baskılayabilir.	(Cutter ve Siragusa,1998)
Pediocin AcH/PA-1	Olgunlaştırma sürecinin başında pediocin AcH/PA-1 üreticisi <i>Lactob. plantarum</i> ile Munster tipi peynirin yüzeyinin spreyleneşmesi	<i>L.monocytogenes</i> üremesinin baskılanması	Ennahar et al., 1996
Enterocin 4	Enterocin 4 üreticisi olan <i>Enterococcus faecalis</i> INIA4'ün starter kültür olarak Machengo peynirine eklenmesi	<i>Listeria monocytogenes</i> Ohio üremesi baskılanmış ama <i>L.monocytogenes</i> Scott A baskılanamamıştır.	Nunez et al.,1997
Leucocin A	Leucocine üreticisi Leu. Gelidum UAL 187'nin vakum paketli dana etine eklenmesi	8 hafta boyunca ette <i>Lactobacillus sake</i> 'ye bağlı bozulmanın engellenmesi	Leisner et al., 1996
Lactocin 705	Dana kıymasında <i>L.monocytogenes</i> üremesinin kontrolü için bakteriyosin eklenmesi	<i>L.monocytogenes</i> dana kıymasında inhibe edilmiştir.	Vignolo et al., 1996

Çizelge 3,6 (devam)

Bakteriyosin	Uygulaması	Sonuç	Referanslar
Pediocin AcH/PA-1	Tavuk Sosisi üretimi sırasında pediocin AcH/PA-1 üreticisi <i>P.acidilactici</i> eklenmesi	<i>P.acidilactici</i> starter kültürü <i>L.monocytogenes</i> 'in etkin şekilde azaltılmasına yardımcı olmuştur.	Baccus Taylor., 1993
Pediocin AcH/PA-1	Bu pediocin karışımı çiğ tavuk etine eklenmiştir.	5 °C'de <i>L.monocytogenes</i> üremesinin kontrolü	Goff et al., 1996
Pediocin AcH/PA-1	Sucuk fermentasyonunda pediocin üreticisi <i>Pediococcus acidilactici</i> 'nin starter kültür olarak kullanılması	<i>L.monocytogenes</i> inhibisyonuna Pediocin etkin bir şekilde katkıda bulunmuştur	Foegeding et al., 1992
Enterocin	Enterocin'in jambon, sucuk, domuz eti ve tavuk göğsüne katılması	<i>L.monocytogenes</i> üremesinin çeşitli koşullarda kontrolü	Aymerich et al., 2000

Bakteriyosinlerin gıda alanında bir çok uygulaması olsa da gıdaların korunması için sadece bakteriyosinlere güvenmek akılcı değildir. Bakteriyosinlerin çok faktörlü bir sistemin parçası olarak kullanılması daha başarılı sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Gıda güvenliğinin sağlanmasında, birden fazla antimikrobiyal faktörün bir arada kullanılması sonucu sinerjistik bir etkinin ortaya çıkmasına “Hurdle Etkisi” denilmektedir. Bu kombine yöntemlerle gıdaların muhafazasında tek başına yeterli olmayan bir çok faktör – sıcaklık, su aktivitesi, pH, oksidasyon/ redüksiyon potansiyeli, farklı antimikrobiyal maddeler – bir araya getirilerek, bunların interaksyonları sonucu kümülatif bir etki yaratılmaktadır.

Nisin ve Pediocin AcH/PA-1 “Hurdle Teknolojisi” uygulamalarında en sık kullanılan bakteriyosinler olmuşlardır. Nisin’in CO₂ ile kombine edilmesi nisine dirençli *L.monocytogenes* mutantlarına karşı başarı sağlamıştır (Nilsson et al., 2000). Nisin A’nın süt laktoperoksidazı ve düşük sıcaklık faktörleriyle kombine edilmesi sonucu *L.monocytogenes*’e karşı artan oranda inhibisyon gözlemlenmiştir (Rodriguez et al.,1997). Pediocin AcH/PA-1 hidrostatik basınç ve yüksek sıcaklık seviyesi ile birleştirildiğinde *S.aureus*, *L.monocytogenes*, *E.coli* O157:H7, *Lactobacillus sake* ve *Leuconostoc mesenteroides*’i başarıyla inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Cleveland, 2001). Pediocin AcH /PA-1 üreticisi olan *Pediococcus acidilactici* ile İspanyol “Alheira sucuğunun inokulasyonu sonucunda, test bakterisi olarak kullanılan *Listeria innocua* strainlerinin tayin limitlerin altına çekildiği gözlemlenmiştir (Albano et al., 2008).

Laktik asit bakterilerine ette ve et ürünlerinde sıklıkla rastlandığından, bakteriyosinler et ürünlerinden izole edilmiş ve kullanımları araştırılmıştır (Schillinger and Lücke, 1989; Cintas et al., 1995; De Martinis et al., 1998, Erol et al., 1999; Noonpakdee et al., 2000; Erdoğan et al., 2006; Abriouel et al., 2008). Nisin’in süt ürünlerinde olduğu gibi et ürünlerinde de antimikrobiyal olarak kullanımı araştırılmıştır. Nisin’in et ürünlerinde direkt kullanımının, yüksek pH ve fosfolipidler gibi doğal et komponentleri tarafından baskılandığı bildirilmiştir (Cleveland et al., 2001). Davies et al., (1999) çiğ ette bulunan glutathion nedeniyle nisin aktivitesinin azaldığını belirlemiş, ayrıca sucuk gibi fermente et ürünlerinde yağ oranının düşmesi ve

fosfatlı emülsifiye edici ajanların nisin aktivitesinin etkinliğini korumada başarı sağladığını bildirmiştir (Cleveland et al., 2001). Türkiye’de yapılan bir uygulamada, Nisin’in Türk tipi sucuk hamuruna eklenmesi sonucunda, *L.monocytogenes*’in baskılandığı gözlemlenmiştir (Hampikyan, 2007). Bu inhibisyon etkisinin, artan Nisin konsantrasyonlarına paralel olarak yükseldiği belirtilmiştir.

Çiğ ette nisin kullanımı ile ilgili zorluklar olduğu için, diğer bakteriyosinlerin kullanımı incelenmiştir. Leucocin A, Enterocinler, Sakacinler, Carnobactericinler ve Pediocin AcH/ PA-1 ile ilgili ümit vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Pediocin AcH/ PA-1 uygulaması sonucu hedef mikroorganizmaların sayısında hızlı bir azalma gözlemlenmiştir (Nielsen et al., 1990). Pediocin AcH/ PA-1 yine de A.B.D’de onaylanmış bir gıda katkı maddesi değildir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Örnekleme

Sucuk, sosis, salam ve kıyma örnekleri İzmir ili içerisinde farklı ilçelerde bulunan kasap, şarküteri ve marketlerden alınmış, aseptik koşullar altında analize tabi tutulmuştur. Örnekler, açık-paketli, markalı-markasız, olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış sezonu olarak da gruplandırılmıştır. Toplam 129 adet örnekle çalışılmıştır. Bozulma belirtileri gösteren, veya sadece tavuk ve/veya hindi eti içeren örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Olgunlaşmamış sucuk örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2.Materyal

3.2.1. Bakteriyolojik Analiz Materyali

3.2.1.1. PCA(Plate Count Agar)

Bileşim

Peptone from casein 5,0 g/l;

Yeast extract 2,5 g/l;

D(+) Glucose 1,0 g/l;

Agar-agar 14,0 g/l

Merck 1,05463 katalog numaralı bu besi yeri, hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 22,5 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş ve steril Petri kutularına 12,5'er ml dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak, çok açık sarımsı renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Bu besi yeri TAMB sayımı için kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.2. MYP Agar (Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine Agar)

Cereus Selective Agar acc. to Mossel

Bileşim

Peptone from casein 10,0 g/l;

Meat extract 1,0 g/l;

D(-) Mannitol 10,0 g/l;

NaCl 10,0 g/l

Phenol red 0,025 g/l;

Agar-agar 12,0 g/l

Sterile Egg Yolk Emulsion 50 ml.

Merck 1,05267 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Besiyerinin hazırlanması için 450 ml damıtık su içinde 21,5 g dehidre besiyeri ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.. Su banyosunda 45-50 °C'a soğutulup üzerine 50 ml steril yumurta sarısı emülsiyonu ile 1 şişe *B. cereus* selektif katkısı ilave edildikten sonra karıştırılarak standart Petri kutularına dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri yumurta sarısı nedeni ile bulanık ve hafif portakal renklidir. 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Bu besi yeri *B.cereus* analizinde kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.3. MRS Agar

Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE).

Bileşim

Peptone from casein 10,0 g/l;

Meat extract 10,0 g/l;

Yeast extract 4,0 g/l;

D(+) Glucose 20,0 g/l;

K₂HPO₄ 2,0 g/l;

Tween 80 1,0 g/l;

di-Ammonium hydrogen citrate 2,0 g/l;

Sodium acetate 5,0 g/l;

MgSO₄ 0,2 g/l;

MnSO₄ 0,04 g/l;

Agar-agar 14,0 g/l

Merck 1,10660 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 68,2 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş, otoklavda 118 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası 45-50 °C'a soğutulup, steril Petri kutularına dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahve renkli ve 25 °C'da pH'sı 5,7±0,2'dir. Bu besi yeri laktik asit bakterileri için seçicidir (Halkman, 2005).

3.2.1.4. MRS Broth

Lactobacillus Broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE

Bileşim

Peptone from casein 10,0 g/l;

Meat extract 8,0 g/l;

Yeast extract 4,0 g/l;

D(+) Glucose 20,0 g/l;

K₂HPO₄ 2,0 g/l; Tween 80 1,0 g/l;

di-Ammonium hydrogen citrate 2,0 g/l;

Sodium acetate 5,0 g/l;

MgSO₄ 0,2 g/l;

MnSO₄ 0,04 g/l

Merck 1,10661 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 52,2 g/l olacak şekilde damıtık su içinde eritilmiş, amaca uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 118 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahve renkli olup, 25 °C'da pH'sı 5,7±0,2'dir. Bu besi yeri laktik asit bakterileri için seçicidir (Halkman, 2005).

3.2.1.5. Lauryl Sulfate Broth

Bileşim

Tryptose 20,0 g/l;

Lactose 5,0 g/l;

NaCl 5,0 g/l;

Sodium Lauryl Sulfate 0,1 g/l;

K₂HPO₄ 2,75 g/l;

KH₂PO₄ 2,75 g/l

Merck 1,10266 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, tek kuvvet için 35,6 g/litre; çift kuvvet için 71,0 g/litre olacak şekilde damıtık su içinde eritilmiş, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar ml dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH 6,8±0,2'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Koliform sayımında bu besi yeri kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.6. Brillant-green 2%-Bile Broth

Brilliant Green Bile (BGB) Broth - BRILA Broth

Bileşim

Peptone 10,0 g/l;

Lactose 10,0 g/l;

Ox Bile 20,0 g/l;

Brilliant Green 0,0133 g/l

Merck 1,05454 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 40,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde eritilmiş, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10'ar ml dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı $7,2\pm 0,2$ 'dir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renktedir. Koliform sayımında bu besi yeri Lauryl Sulfate Tryptose Broth'dan sonra kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.7. Endo Agar

Bileşim

Peptones 10,0 g/l;

K₂HPO₄ 2,5 g/l;

Lactose 10,0 g/l;

Na₂SO₃ (anhydrous) 3,3 g/l;

Pararosanilin (Fuchsin) 0,3 g/l;

Agar-agar 12,5 g/l

katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 39,0 g/l olacak şekilde olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize

edilmiştir.45-50 °C'a soğutulup Petri kutularına 12,5'er ml dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve soluk pembe renkli olup, 25 °C'da pH'sı $7,4\pm 0,2$ 'dir. *E.coli* başta olmak üzere koliform grubu bakterilerin gelişimi için kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.8. Selenite Cystine Broth

Bileşim

Peptone from casein 5,0 g/l ;

L(-)cystine 0,01 g/l ;

Laktoz 4,0 g/l ;

Phosphate buffer 10,0 g/l ;

sodium hydrogen selenite 4,0 g/l şeklindedir.

Merck 1,07709 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

100 ml distile su içinde 2,3 g dehidre besiyeri 60 °C 'a kadar ısıtılarak çözülmüştür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyeri berrak ve açık sarı renklidir, pH 'sı 25 °C 'da $7,0\pm 0,2$ 'dir. Besiyeri bileşimindeki selenit inkübasyonun ilk 12 saatine kadar koliform bakterilerin gelişimini baskılar, daha sonra inhibisyon etkisi giderek azalır. Bu

özelliği ile, *Salmonella* spp. için selektif bir ön zenginleştirme ortamı olarak kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.9. TBG-Broth, Modified

Tetrathionate-Brillant-green Bile Enrichment Broth

Bileşim

Peptone 8,6 g/l;

Ox-bile 8,0 g/l;

NaCl 6,4 g/l;

CaCO₃ 20,0 g/l;

Potassium tetrathionate 20,0 g/l;

Brilliant green 0,07 g/l

Merck 1,05178 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 63,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde eritilmiş, otoklavlanmadan ısıtılmıştır. Hazırlanmış besiyeri bulanık, beyaz sedimentli yeşil renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. *Salmonella* spp. için ön zenginleştirme ortamı olarak kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.10. BPLS Agar

Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar

Bileşim

Peptone from meat (peptic) 5,0 g/L;

Peptone from casein 5,0 g/L;

Yeast extract 3,0 g/L;

NaCl 5,0 g/L;

Lactose 10,0 g/L;

Sucrose 10,0 g/L;

Phenol red 0,08 g/L;

Brilliant green 0,0125 g/L;

Agar-agar 13,0 g/L

Merck 1.07232 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 51,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrasında 45-50 °C'a soğutulup steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak, kırmızı-kahve renktedir ve 25 °C'da pH'sı 6,9±0,2'dir. *Salmonella* spp. analizi için kullanılmıştır.

3.2.1.11. Bismuth Sulfite Agar

Bileşim

Meat extract 5,0 g/l;

Peptone from meat 10,0 g/l;

D(+) Glucose 5,0 g/l;

Na₂HPO₄ 4,0 g/l; I

Iron(III) sulfate 0,3 g/l;

Brilliant green 0,025 g/l;

Bismuth sulfite indicator 8,0 g/l;

Agar-agar 15,0 g/l

Merck 1,05418 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 47,5 g/l olacak şekilde damıtık su içinde tümüyle çözülmüğe kadar kaynar su banyosunda karıştırılarak eritilmiş ve steril Petri kutularına 25'er ml olacak şekilde kalın bir tabaka halinde dökülmüştür. Bu besiyeri otoklavlanmadan kullanılmıştır. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve yeşil renklidir. pH'sı 25 °C'da 7,6±0,2'dir. *Salmonella* spp. analizinde kullanılmıştır.

3.2.1.12. Triple Sugar Iron Agar

Bileşim

Peptone from Casein 15,0 g/l;

Peptone from meat 5,0 g/l;

Meat extract 3,0 g/l;

Yeast extract 3,0 g/l;

NaCl 5,0 g/l;

Lactose 10,0 g/l;

Sucrose 10,0 g/l;

D(+) glucose 1,0 g/l;

Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/l;

Sodium thiosulfate 0,5 g/l;

Phenol red 0,024 g/l;

Agar-agar 12,0 g/l

Merck 1,08483 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 65,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak tam olarak eritilmiştir Besiyeri henüz sıvı halde iken, tüplere 7'şer ml olarak dağıtılıp, tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renklidir ve 25 °C'da pH'sı $7,4\pm 0,2$ 'dir. *Salmonella* spp. ve *E.coli*'nin Glikoz, Laktoz kullanımı ve H₂S üretmesinin gözlemlenebilmesi için kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.13. Urea Broth

Bileşim

Yeast extract 0,1 g/l;

KH₂PO₄ 9,1 g/l;

Na₂HPO₄ 9,5 g/l;

Urea 20,0 g/l;

Phenol red 0,01 g/l

Merck 1,03915 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 38,5 g/l olacak şekilde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilmiştir. Tüplere 3'er ml dağıtılıp en fazla 60 °C'a kadar ısıtılarak sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak, portakal renkli ve 25 °C'da pH'sı $6,8 \pm 0,2$ 'dir. Üreaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Halkman, 2005).

3.2.1.14. Phenol Red Broth Base Bileşim

Peptone from casein 5,0 g/l;

Peptone from meat 5,0 g/l;

NaCl 5,0 g/l;

Phenol red 0,018 g/l

Agar-Agar 0.5ml/gr

Mannitol 2 gr.

Merck 1,10987 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 1,5 g/80 ml olacak şekilde damıtık su içinde eritilmiş, tüplere 4'er ml dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Mannitol, filtre ile sterilize edilir ve tüplerdeki besiyeri üzerine 1 ml eklenmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve Phenol red indikatörüne bağlı olarak kırmızı renktedir, 25 °C'da pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'dir. Bu besi yeri Mannitol kullanımı ve Hareket özelliğinin belirlenmesi için uygundur (Halkman, 2005).

3.2.1.15. Tryptone (İndol) Besiyeri

Bileşim

Peptone from casein 10,0 g/L;

NaCl 5 g/L

Kovacs Indole Reagent

Merck 1,09293 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır. Kovacs Indole Reagent yukarıda formülü belirtilen besi yerine ekim yapıp, 37 °C'de inkübasyondan sonra ortama damlatılmış, menekşe rengin oluşumu gözlemlenmiştir.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 15,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde çözülerek, tüplere dağıtılıp otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır, 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir. Bu besi yeri özellikle *Enterobacteriaceae* familyasının indol reaksiyonunun belirlenebilmesi için kullanılmıştır.

3.2.1.16. Lysine Iron Agar

Bileşim

Peptone from meat 5,0 g/L;

Yeast extract 3,0 g/L;

D(+) Glucose 1,0 g/L;

L-Lysine monohydrochloride 10,0 g/L;

Sodium thiosulfate 0,04 g/L;

Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/L;

Bromocresol purple 0,02 g/L;

Agar-agar 12,5 g/L;

Merck 1,11640 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 32,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak iyice eritilmiştir.. Besiyeri henüz sıvı halde iken , tüplere dağıtılmış ve tüpler 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak bekletilmiş, besiyeri katılaştıktan sonra kullanılmıştır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve menekşe renkli olup, 25 °C'da pH'sı $6,7 \pm 0,2$ 'dir. Bu besi yeri özellikle *Salmonella* spp. 'nin tespitinde biyokimyasal test olarak, lisin dekarboksilasyonunu belirlemek için kullanılmıştır.

3.2.1.17. Fraser *Listeria* Selective Enrichment Broth Base Bileşimi

Proteose peptone 5,0 g/l ;

Peptone from casein 5,0 g/l ;

Yeast extract 5,0 g/l ;

Meat extract 5,0 g/l ;

NaCl 20,0 g/l ;

Na₂HPO₄ 12,0 g/l ;

KH₂PO₄ 1,35 g/l ;

Esculin 1,0 g/l ;

lithium chloride 3,0 g/l şeklindedir.

Merck 1,10398 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri distile su içinde 57,4 g/l olacak şekilde ve gerekirse ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri sarımsı kahverenginde, hemen hemen berrak ve 25 °C 'da pH 'sı 7,2±0,2 'dir. Fraser Broth besiyeri inhibitörsüz, yarım kuvvette (1/2) inhibitör ilave edilmiş ve tam kuvvette inhibitör ilave edilmiş olmak üzere üç şekilde *Listeria* spp. için ön zenginleştirme amacıyla kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.18. Oxford Listeria Selective Agar Bileşim

Peptone 23,0 g/l;

Starch 1,0 g/l;

NaCl 5,0 g/l;

Agar-agar 13,0 g/l

Esculin 1,0 g/l;

Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/l;

Lithium chloride 15,0 g/l.

Selektif Oxford antibiyotik katkısı 1 ml.

Merck 1,07004 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 29,25 g/500 ml olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilmiş ve içinde manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 oC'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 1 ml steril damıtık su içinde çözülmüş, 1 şişe selektif katkı (Oxford *Listeria* Selective Supplement; Merck 1,07006) ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılıp steril Petri kutularına 12,5'er ml dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve mavimsi kahve renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. *Listeria monocytogenes* analizi için selektif bir besi yeri olarak kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.19. PALCAM Agar

Bileşim

Peptone 23,0 g/L;

Yeast extract 3,0 g/L;

Starch 1,0 g/L;

NaCl 5,0 g/L;

Agar-agar 13,0 g/L

D(-) Mannitol 10,0 g/L;

Ammonium iron(III) citrate 0,5 g/L;

Esculin 0,8 g/L;

Glucose 0,5 g/L;

Lithium chloride 15,0 g/L;

Phenol red 0,08 g/L

Merck 1,11755 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 35,9 g/500 mL olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir.

Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 1 mL steril damıtık su içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı (PALCAM *Listeria* Selective Supplement; Merck 1,12122) ilave edilmiştir. Steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. *L. monocytogenes* analizi için kullanılmıştır.

3.2.1.20. Blood Agar Base

Kanlı Agar

Bileşim

Nutrient substrate (heart extract and peptones; kalp ekstraktı ve peptonlar) 20,0 g/l;

NaCl 5,0 g/l;

Agar-agar 15,0 g/l

Defibrine Koyun Kanı (% 5)

Merck 1,1088 katalog numaralı besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 40,0 g/l konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav çıkışında 45-50 °C'a soğutulmuş, %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilerek, Petri kutularına dökülmüştür. Bazal besiyeri berrak, sarımsı kahverengindedir ve 25 oC'da pH'sı 6,8±0,2'dir.

Esculin ilavesi ile özellikle Laktik asit bakterilerinin eskülin kullanabilme özelliğini ve CAMP testi için belirlemek amacıyla, bunun dışında mikroorganizmalar için genel bir besi yeri olarak ve hemoliz özelliğini gözlemleyebilmek için kullanılmıştır (Halkman, 2005).

3.2.1.21. Rose Bengal Chloramphenicol Agar

Bileşim

Mycological peptone 5,0 g/l;

Glucose 10,0 g/l;

KH₂PO₄ 1,0 g/l;

MgSO₄ 0,5 g/l;

Rose bengal 0,05 g/l;

Chloramphenicol 0,1 g/l;

Agar-agar 15,5 g/l

Merck 1,00467 katalog numaralı besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 32,2 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiştir Otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilerek steril Petri kutularına dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri pembe-kırmızı renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,2±0,2'dir. Hazırlanmış besiyerinin pH'sı 7,0±0,2'dir. Maya-küf sayımı için kullanılmıştır (Halkman,2005).

3.2.1.22. Staphylococcus Selective Agar acc. to BAIRD-PARKER

Bileşim

Peptone from casein 10,0 g/l;

Meat extract 5,0 g/l;

Yeast extract 1,0 g/l;

Sodium pyruvate 10,0 g/l;

Glycine 12,0 g/l;

Lithium chloride 5,0 g/l;

Agar-agar 15,0 g/l.

Egg-yolk-tellurite emulsion 50 ml (Merck-103785).

Merck 1,05406 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

58,0 g dehidre besiyeri 950 ml damıtık su içinde 1-2 dakika kaynatılarak tümüyle çözüldürülmüş ve otoklavda 121 oC'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Bazal besiyeri 45 °C'a soğutularak, yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 ml yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu ilave edilip, standart steril Petri kutularına

dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri opalesent (meneviş, yanardöner) sarımsı-kahve renkte olup 25 °C'da pH'sı 6,8±0,2'dir. *Staphylococcus aureus* sayımı amacıyla kullanılmıştır (Halkman,2005).

3.2.1.23. H₂O₂ Solusyonu (%3).

H₂O₂ (%35) 8,5 ml. (Riedel De Haen, 18312)

Distile su 91,5 ml

Karıştırılarak mikroorganizmaların, özellikle *S.aureus* ve laktik asit bakterilerinin, katalaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. H₂O₂ ile muamele sonucunda gaz kabarcıklarının oluşması pozitif reaksiyonu gösterir.

3.2.1.24. TSC Agar (Tryptose Sulfite Cyclocerine Agar) Base

Bileşim

Tryptose 15,0 g/L;

Peptone from soymeal 5,0 g/L;

Yeast extract 5,0 g/L;

Sodium disulfite 1,0 g/L;

Ammonium iron(III) citrate 1,0 g/L;

Agar-agar 15,0 g/L

Merck 1.11972 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri, 42,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 oC'da 15 dakika sterilize edilmiştir. 45-50 oC'a soğutulduktan sonra filtre ile sterilize edilmiş, %5 konsantrasyondaki D-Cycloserine çözeltisinden 10 mL/L olacak şekilde ilave edilerek steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. *C.perfringens* analizi için kullanılmıştır.

3.2.1.25. Nitrat Testi için Broth

Pepton	2,0 g (Merck 1,07214).
NaCl	0.5 gr (Merck 1,06404).
KNO ₃	1,0 gr (Merck 1,08342).
Distile su	1000 ml.

Yukarıda belirtilen içerik distile su içerisinde çözülerek, tüplere dağıtılmış, 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Nitrat indirgeme özelliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2.1.26. Nutrient Agar

Bileşim

Peptone from meat 5,0 g/L;

Meat extract 3,0 g/L;

Agar-agar 12,0 g/L

Merck 1,05443 katalog numaralı bu besi yeri hazır olarak kullanılmıştır

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 20,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş ve 45-50 °C'a soğutulup steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Genel bir besi yeri olarak, özellikle Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi için kullanılmıştır.

3.2.1.27. Tamponlanmış Peptonlu Su Bileşimi

Peptone 10,0 g/l;

NaCl 5,0 g/l;

Na₂HPO₄,12H₂O 9,0 g/l;

K₂HPO₄ 1,5 g/l şeklindedir.

Merck 1,07228 katalog numaralı bu çözelti hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Dehidre besiyeri 25,5 g/l olacak şekilde su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilerek, 500 ml erlenlere 225'er ml olacak şekilde ya da diğer hacimlerde uygun cam malzemeye dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'da 15

dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Otoklav sonrası 25 °C'da pH 7,0±0,2'dir. *Salmonella* spp. için selektif olmayan ön zenginleştirme için kullanılmıştır.

3.2.1.28. Maximum Recovery Diluent

Bileşim

Peptone 1,0 g/L;

NaCl 8,5 g/L

Merck 1,12535 katalog numaralı bu çözelti hazır olarak kullanılmıştır.

Hazırlanması

Damıtık su içinde 9,5 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Amaca uygun kaplara (tüp, erlen, vb.) dağıtılıp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,0±0,2'dir. Kullanıma hazır hâldeki çözelti berrak ve renksizdir. Gıda örneklerinin homojenizasyonu ve seyreltmelerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.2.1.29. Gram'ın Jansiyen Viyole Solusyonu:

Bileşim

Jansiyen Viyole 10 gr

Fenol 8 ml

Alkol 100 ml

Distile su 1000 ml

Hazırlanması

Yukarıda formülü belirtilen BioChemica 94448 katalog numaralı ana mahlul solusyonundan 100 ml. alınarak, 25 ml. fenol ve 875 ml. distile su ile karıştırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.30. Gram'ın Lugol Solüsyonu**Bileşim**

İyot	4 gr.
Potassium iodure	8 gr.
Distile su	1200 ml.

Hazırlanması

Yukarıda formülü belirtilen BioChemica 90107 katalog numaralı lugolün ana mahlül solüsyonundan 100 ml. alınarak, 900 ml. distile su ile karıştırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.31. Gram'ın Fuchsin Solusyonu:**Bileşimi**

Fuchsin	20 gr.
Etanol	100 ml.
Fenol	8 ml
Distile su	1000 ml

Yukarıda formülü belirtilen BioChemica 87794 katalog numaralı fuchsin ana mahlülden 100 ml. alınarak 900 ml. distile su ile karıştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.32. Karbonhidrat Testleri için Çözelti

Hazırlanan şeker solüsyonlarıyla, bu besiyerinde bakterinin hangi karbonhidratları kullandığı gözlenmiştir. 5 ml besiyerine bakteri inokule edildikten sonra, 4-5 damla istenilen şeker solüsyonundan damlatılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve pozitif reaksiyon gözlenmiştir.

Peptone	20.0 g (Merck 1,07214).
NaCl	5,0 g (Merck 1,06404).
Distile su	1000 ml
Brome cresol purple (% 0.6)	2,5 ml (Sigma B5880)

pH 7,6' ya ayarlanır.

Kullanılacak karbonhidratın distile su içerisindeki solusyonları aşağıdaki tabloda belirtilen çözünürlük yüzde oranlarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Biyokimyasal testlerde kullanılacak karbonhidatların distile suda çözünme oranları (Yukarıdan aşağıya; soldan sağa doğru: Merck 1,08342, Merck 1,04736, Merck 1,07651, Merck 1,01492, Merck 1,08689, Merck 1,07549, Merck.01252, Merck, 1,07657, Merck 1,07758)

Çözünürlük Oranı(%)	Karbonhidratlar
%30	Glycose, Rhamnose, Sucrose, Arabinose, Xylose, Raffinose
%25	Lactose
%20	Mannitol
%10	Sorbitol

3.2.1.33. Oksidaz Testi

Kullanıma hazır test stripleri (Merck 1,13300.) olarak alınmıştır.
Enterobacteriaceae için ayırıcıdır

3.2.1.34. Proteinaz K

4 mg. Proteinaz K (Sigma P82518)

10 ml. TE tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.1.35. 1 N Hidroklorik Asit Çözeltisi (HCl)

81 ml derişik HCl (Merck 1,00317) asitten alınarak 1 litre saf su ile tamamlanmıştır.

3.2.1.36. PCR analiz materyali

3.2.1.36.1. Primerler

Çizelge 3.2. Kullanılan primerler, dizilimleri, ve oluşturdukları ampliconların boyutlarını gösteren çizelge

Primer	Dizilim (5'-3')	Amplicon boyutu	Referans
Nisin	AAGAATCTCTCATGAGT	898 bp.	Rodriguez et al., 2000
Nisin	CCATGTCTGAACTAACA		
Enterocin AS-48	GAGGAGTTCATGTTAAAGA	318 bp.	Rodriguez et al., 2000
Enterocin AS-48	CATATTGTTAAATTACCAAGCAA		
Pediocin-AcH/PA-1	AAAAATATCTAACTAATACTTG	711 bp.	Rodriguez et al., 1997
Pediocin- AcH/PA-1	TAAAAAGATATTTGACCAAAA		

Kullanılan primer dizilim spesifitesi, GenBank ve PrimerBlast veri tabanları yardımıyla kontrol edilmiştir. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis nisA* gen dizilimi için Genbank numarası: AM410671, Enterocin AS- 48 sentezleyen gen dizilimi için Genbank numarası: YI2234, Pediocin AcH/PA-1 sentezleyen *ped A* geni için Genbank numarası M83929 olarak belirlenmiştir.

Metabion International AG firmasından alınan liyofilize primerler, 100 µl TE tamponu ile dilüe edilerek nazikçe karıştırılmış, bu stoklar -20 derecede saklanmıştır. Bu primer stoklarından steril nukleaz içermeyen su ile çalışma dilüsyonları hazırlanmıştır.

3.2.1.36.2. Standart ve Referans Bakteri Suşları

Bakteriyosinlerin inhibisyon etkisinin belirlenmesinde kullanılan *Escherichia coli* (BVKAE-BAK-BOV-07), *Enterococcus faecalis* (BVKAE-BAK-MAST-65), *Micrococcus luteus* (BVKAE-BAK-MAST-44), *Listeria monocytogenes* (BVKAE-BAK-OV-3), *Staphylococcus aureus* (BVKAE-BAK-MAST-11) strainleri ile sadece CAMP testinde kullanılan *Rhodococcus equi* (BVKAE-BAK-RESP-1) daha önce Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen araştırmalarda elde edilmiş ve biyokimyasal testler yapılarak doğrulanmışlardır. Saf kültürler, yatık olarak hazırlanmış Nutrient Agar'a aseptik koşullarda ekilmiş, 24 saat inkübasyondan sonra +4⁰C'de saklanmıştır.

Bakteriyosin üreticisi referans suş olarak, *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* ATCC 11454, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Enterococcus faecalis* ATCC 27270, kullanılmış; bu suşlar MRS Broth içerisinde 24 saat inkübasyondan sonra +4⁰C'de saklanmışlar ve gerektiğinde tazelenerek kullanılmışlardır. Bu suşların antimikrobiyal ve bakteriyosin aktiviteleri Kirby Bauer Disk Difüzyon Tekniği ile test edilmiş ve yeterli genel antimikrobiyal aktivite ve bakteriyosin aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir.(Rodriguez et al., 2000)

3.2.1.37. Kimyasallar

3.2.1.37.1. Master Mix (2x)-

50units/ml Taq DNA polymerase

Reaction buffer Ph :8,5

400µM each: dATP, dGTP, dCTP, dTTP

1,5 Mm MgCl₂

Nuclease Free Water

PCR reaksiyonu için önceden hazırlanmış ticari master mix kiti Qiagen 201443 marka ve katalog numarasıyla, tedarik edilmiş ve hazır olarak, primerler ve DNA template'in eklenmesi ile kullanılmıştır (Rodriguez et al., 2000)

3.2.1.37.2. Agaroz Jel % 1'lik .

Bileşim

Agaroz 2 g (Sigma-A 2114).

TBE 1x 200 ml (Applichem A3945).

Ethidium Bromide 20 µl (Sigma E1385).

Hazırlanması

Agaroz tartılmış, erlene konulmuştur. Üzerine TBE eklenmiş, çalkalanarak mikrodalga fırına yerleştirilmiştir. Örnek kaynamaya başlayınca kadar çalıştırılmış, aralıklarla çıkarılıp çalkalanmıştır. Tamamı eriyene kadar ısıtılmıştır. Ethidium bromide eklenerek, çözeltiyeye karıştırılmıştır. Tray içerisinde dökülerek katılaşması beklenmiştir (Rodriguez et al., 2000)

3.2.1.37.3. TBE Tamponu Stok Solusyonu (10x pH:8,0)**Bileşim**

121,10 gr. Tris Base

61,83 gr Borik Asit

5,84 gr. EDTA (susuz).

Hazırlanması

Yukarıda formülü verilen hazır stok solusyon, 1000 ml. distile su ile sulandırılmıştır. Applichem A3945 katalog numarasıyla hazır olarak alınmıştır.

3.2.1.37.4. TE Tamponu

10 mM Tris HCl 315,12 mg (Sigma-T6066).

1mM EDTA (58,4 mg EDTA- Sigma E6758)

200 ml. distile su içerisinde çözülen Tris HCl içerisine EDTA sonradan eklenmiştir. NaOH ile pH:8,0'e ayarlanmıştır.

3.2.1.37.5. Örnek Yükleme Boyası 10X, 100mL

Bromphenol Mavisi 250 mg (Sigma B0126).

Tris pH 7,6 150 mM (33 mL- Sigma-T6066).

Gliserol 60 Ml (Fluka 49767).

Distile su 7 mL

Yukarıdaki stok solusyon steril distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

3.3.Yöntem

3.3.1. Bakteriyolojik Analizler

3.3.1.1. Katı Besiyerinde Toplam Mezofil Aerobik Bakteri Sayımı

1. 25 g. sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. maximum recovery diluent içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml. alınarak, 9 ml. maximum recovery diluent içeren tüp serisinin ilkine aktarılmıştır.
3. Daha sonra her bir tüpten diğerine 1'er ml. aktararak 10^{-9} 'a kadar seyreltme işlemi yapılmıştır.
4. Seyreltme işleminin gerçekleştiği tüplerden, 10^{-2} 'den- 10^{-9} 'e kadar ,üzerine seyreltme oranı yazılmış olan boş petrilere 1'er ml.örnek aktarılmıştır.
5. Daha sonra bu petrilere 45-50 °C'de tutulan steril Plate Count Agar (Merck 1,05463) en az 2 mm. kalınlık oluşturacak şekilde dökülmüş, 8 hareketi ile homojenize olması sağlanmış ve soğumaya bırakılmıştır.

6. Katılaşan besiyeri, 37 °C de Memmert markalı Tv506 model etüvde 24-48 saat inkübe edilmiş, oluşan koloniler sayılmıştır. (Karaboz, 2002)

3.3.1.2. Koliform Grup Bakterilerin Analizi ve *Escherichia coli* Saptanması

1. 25 g sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. Maximum recovery diluent içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml. alınarak, 9 ml. maximum recovery diluent içeren tüp serisinin ilkinde aktarılmıştır.
3. Daha sonra her bir tüpten diğerine 1'er ml. aktararak 10^{-4} 'e kadar seyreltme işleminde yapılmıştır.
4. Daha sonra 10 ml. tek kuvvette hazırlanmış Lauryl Sulfate Tryptose Broth (Merck 1,10266) ve gaz ölçümü için Durham tüpü içeren tüplere 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} seyrelme oranlarından 1'er ml., her bir seyreltmeden 3 tüp olacak şekilde ekilmiştir.
5. 37C'de 24 saat Memmert markalı Tv506 model etüvde inkübasyondan sonra gaz oluşumu görülen LST pozitif tüplerden 1'er ml. 9 ml. Brilliant Green Bile Broth (Merck 1,05454) ve Durham tüpü içeren tüplere aktarılmış ve 37 °C 'de 48 saat inkübe edilmiştir.

6. Gaz oluşan tüpler pozitif olarak değerlendirilerek, EMS (En Muhtemel Sayı) tablosundan sonuçlar okunmuştur. (Halkman, 2005). Ek Çizelge 4'de örnek EMS çizelgesi verilmiştir.
7. *Escherichia coli* izolasyon ve identifikasyonu için Brilliant Green Bile Broth'da pozitif görülen tüplerden bir öze dolusu kültür Endo Agar'a çizilerek ekim yapılmıştır.
8. 37 °C'de 24 saat Memmert markalı Tv506 model etüvde inkübasyon sonucu metalik yeşil renkli röfle veren, Gram (-), Oksidaz (-), koloniler Triple Sugar Iron Agar , Üre Besi Yeri , Mannitollü Phenol Red Besi yeri ve Indol Besi yerine ekilmiş, 37 °C'de 24-48 saat sonra değerlendirilmiştir.

3.3.1.3. Maya-Küf Sayımı

1. 25 g. sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. Maximum recovery diluent içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
1. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml alınarak, 9 ml maximum recovery diluent içeren tüp serisinin ilkine aktarılmıştır.
2. Daha sonra her bir tüpten diğerine 1'er ml. aktarılarak 10^{-6} 'ya kadar seyreltme işlemi yapılmıştır.
3. Seyreltme işleminin gerçekleştiği tüplerden, önceden petrilere dökülerek hazırlanmış Egg Yolk Tellurite ilaveli Baird Parker Agar'a (Merck 1,05406) ekim yapılmıştır.

4. Heraeus marka B6066 kodlu etüvde 30 °C’de 4-5 gün inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılmıştır (Karaboz, 2002).

3.3.1.4. *Staphylococcus aureus* sayımı

1. 25 g sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. maximum recovery diluent içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml. alınarak, 9 ml. maximum recovery diluent içeren tüp serisinin ilkine aktarılmıştır.
3. Daha sonra her bir tüpten diğerine 1’er ml. aktararak 10^{-6} ’a kadar seyreltme işlemi yapılmıştır.
4. Her bir seyreltmeden, önceden petrilere dökülerek hazırlanmış Baird Parker Agar’a (Merck 1,05406) ekim yapılmıştır.
5. 37 °C’de Memmert markalı Tv506 model etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra etrafı saydam zonlu, 1-1,5 mm çaplı siyah, parlak koloniler *S.aureus* olarak sayılmıştır.(Karaboz, 2002)
6. Ayrıca, Gram (+), Katalaz (+), üzüm salkımı şeklinde koloniler *S.aureus* olarak değerlendirilmiştir.

3.3.1.5. *Bacillus cereus* Sayımı

1. 25 gr. sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. maximum recovery diluent içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml. alınarak, 9 ml. maximum recovery diluent içeren tüp serisinin ilkine aktarılmıştır.
3. Daha sonra her bir tüpten diğerine 1'er ml. aktararak 10^{-9} 'a kadar seyreltme işlemi yapılmıştır.
4. Her bir seyreltmeden, önceden petrilere dökülerek hazırlanmış Mannitol Egg Yolk Polymyxine Agar'a (Merck 1,05267) yayma ekim yapılmıştır.
5. 37 °C'de Memmert markalı Tv506 model etüvde 24-48 saat inkübe edildikten sonra etrafı saydam zonlu, pembe menekşe merkezli, yaygın koloniler *Bacillus cereus* olarak sayılmıştır.(Karaboz, 2002)
6. Daha ileri identifikasyon için Mannitol, Glikoz, Nitrat İndirgenmesi testleri yapılmıştır.(Halkman, 2005)

3.3.1.6. *Clostridium perfringens* sayımı

1. 25 gr. sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. Maximum Recovery Diluent içerisinde IUL Instruments markalı,

Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.

2. Homojenize edilmiş ilk örnekten 1 ml. alınarak, 9 ml. Maximum Recovery Diluent içeren tüp serisinin ilkinde aktarılmıştır.
3. Daha sonra her bir tüpten diğerine 1'er ml. aktararak 10^{-6} 'ya kadar seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.
4. Her bir seyreltmeden, üzerine seyreltme oranı yazılmış, 1'er ml. steril petrilere aktarılmıştır.
5. Daha sonra, bu petrilere 45-50 °C'de tutulan, yumurta sarısı içermeyen Tryptose Sulfite Cycloserine Agar dökülmüş, 8 hareketi ile besi yerinin, örnekle karışması sağlanmış ve soğuyarak katılaşmaya bırakılmıştır.
6. Bu petrilere Anaerobik Jar içerisinde 37 °C 'de anaerobiosis sağlayıcı sistem yardımı ile Heraeus- CO₂- Auto-Zero markalı %7 oranında CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
7. 20 saat sonunda oluşan koyu renkli, siyah koloniler sayılmıştır (Karaboz, 2002).
8. Konfirmasyon için Nitrat kullanımı, hareket ve laktoz pozitiflik dikkate alınmıştır.

3.3.1.7. *Salmonella* spp. Analizi

1. 25 gr. sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. tamponlanmış peptonlu su içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. Bu homojenat Memmert markalı Tv506 model etüvde, selektif olmayan ön zenginleştirme için 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyonun sonunda, selektif zenginleştirme için 10 ml. Modifiye TBG Broth (Merck 1,05178) içerisine ve 10 ml. Selenite Cystine Broth'a (Merck 1,07709) ön zenginleştirme ortamından 1'er ml. eklenmiştir. Selenite Cystine Broth 37 °C'de 24 saat, Modifiye TBG Broth (Merck 1,05178) ise yine 37 °C'de 24 saat Memmert markalı Tv506 model etüvde inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar ve Bismuth Sulfide Agar 'a her iki zenginleştirmeden çizilerek ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra oluşan koloniler değerlendirilmiştir.
5. *Salmonella* spp. identifikasyonu: *Salmonella* spp. Bismuth Sulfide Agar'da yeşil renkli bazen siyah merkezli olarak görülmektedirler. Daha ileri testler için Triple Sugar Iron

Agarda laktoz negatif, glikoz ve H₂S pozitif olması, Mannitollü Phenol Red Besiyeri, Üre testinde negatif sonuç vermesi, Indol negatif, Oksidaz negatif, Lisin Dekarboksilaz pozitif olması dikkate alınmıştır.

3.3.1.8. *Listeria monocytogenes* Analizi

1. 25 g sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. ½ kuvvette hazırlanmış Fraser Broth (Merck 1,1,0398) içerisinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatörde homojenize edilmiştir.
2. 30 °C'de Heraeus marka B6066 model etüvde, 24 saat inkübasyondan sonra bu ön zenginleştirme ortamından Oxford (Merck 1,07004)ve PALCAM agar (Merck 1,1755) içeren petrilere ekim yapılmış, aynı zamanda, selektif katkıları tam olarak eklenmiş 10 ml. Fraser Broth'a tekrar 0.1 ml. ekim yapılmıştır. Oxford ve PALCAM Besi yerleri 30 °C'de 24 saat, Fraser Broth ise 37 °C'de 24-48 saat Memmert markalı Tv506 model etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Fraser Broth'dan 24. ve 48. saatlerde Oxford ve PALCAM Besi yerlerine tekrar ekim yapılmış, bunlar 30 °C'de tekrar inkübasyona kaldırılmıştır.
4. Oluşan koloniler değerlendirmeye alınmıştır.

5. *Listeria* spp. PALCAM Agar (Merck 1,11755) içersinde 1,5-2 mm çapında zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ama her zaman siyah zon ile ürer. Oxford Agar (Merck 1,7004) içersinde 2-3 mm çapında siyahımsı yeşil kahverengi, siyah zonlu çökük merkezli koloniler oluşturur. Karbonhidrat testlerinde, *Listeria monocytogenes* Rhamnose'u kullanabilmekte ama Xylose'u kullanamamaktadır.(Halkman, 2005)

3.3.1.9. Laktik Asit Bakterisi Sayımı

1. 25 gr. sucuk, sosis, salam veya kıyma örneği 225 ml. maximum recovery diluent içersinde IUL Instruments markalı, Masticator Basic model homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. Homojenize edilmiş örnekten 1 ml. alınarak, 9 ml. maximum recovery diluent içeren tüp serisinin ilkine aktarılmıştır.
3. Daha sonra her bir tüpten diğesine 1'er ml. aktararak 10^{-9} 'a kadar seyreltme işlemi yapılmıştır.
4. Her bir seyreltmeden, üzerine seyreltme oranı yazılmış petrilere 1'er ml. aktarılmıştır.
5. Bu petrilere 45-50 °C sıcaklıkta tutulan MRS Agar (Merck 1,1,660) 2 mm. kalınlık oluşturacak şekilde dökülmüş, 8 hareketi ile besi yeri ve örneklerin karışması sağlanmıştır.

6. Bu petriler 30 °C'de Heraeus- CO₂- Auto-Zero markalı etüvde % 7 CO₂'li ortamda 48-72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
7. Daha sonra oluşan koloniler sayılmıştır.(Karaboz, 2002)

3.3.2. Bakteriyosinlerin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

3.3.2.1. Laktik asit bakterileri ve bakteriyosinlerinin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi:

Laktik asit bakterilerinin genel inhibisyon yeteneğinin belirlenmesi için aktif laktik asit bakterisi strainleri, 10 ml. MRS Broth'a inokule edilip Memmert markalı Tv506 model etüvde 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde besi yeri 5000 rpm'de Heraeus markalı Biofuge model soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüjlenip, berrak kısım (supernatant) 0.45 µm'lik membran filtreden süzülmüştür. Bakteriyosin ve benzeri maddelerin inhibisyon etkisinin belirlenmesi: Bakteriyosin üretiminin belirlenmesi için laktik asit bakterisi suşları, MRS Broth besi yerine inokule edilerek mikroaerofilik ortamda, % 7 oranında CO₂'li inkübatörde 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 5800 rpm'de Heraeus markalı Biofuge model soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edilmiş,0.45 µm'lik membran filtreden süzülmüştür.

Organik asitlerin etkisini bertaraf edebilmek için, NaOH ve HCl kullanılarak pH 5,5-6,0' a ayarlanmıştır (Rodriguez, 1998; Rodriguez, 2000).

3.3.3. Kirby- Bauer Disk Difüzyon Metodu:

Bakteriyosin aktivitesini gösterebilmek için öncelikle, indikatör mikroorganizma olarak kullanılacak olan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* ve *Micrococcus luteus*, Kanlı Agar'da 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra oluşan saf koloniler McFarland Standardına göre 0.5-0.6 McFarland düzeyinde (1.5×10^8 kob/gr) steril fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilmiştir. Oluşan süspanسیون Nutrient Agar'lı petrilere dökülerek, Drigalski spatülü ile dağıtılmış, daha sonra üzerine santrifüj ve membran filtreden geçirilmiş süpernatant ve %7 CO₂ 'li etüvde inkübe edilmiş ve pH nötralizasyonu yapılmış örneklerin emdirildiği kağıt diskler (6 mm) yerleştirilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Sonuçta oluşan zon çapları her iki grup için de ayrı ayrı ölçülmüş ve çok iyi inhibisyon aktivitesi (++++), iyi inhibisyon aktivitesi (+++) orta derecede inhibisyon aktivitesi (++) ve yetersiz inhibisyon aktivitesi(+) olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.10).

Süpernatantlar, ayrıca Proteinaz K ile muamele edilmiş, 60 °C'de 60 dk., 100 °C'de 20 dk. ve 121 °C'de 15 dk. sıcaklık muamelesi yapılmış, ayrıca pH 2, 6 ve 9'da stabiliteleri ölçülmüştür. 100 µg/ ml Proteinaz K enzimi 150 µl süpernatant ile karıştırılmış, 37 °C sıcaklıkta 1

saat boyunca inkübe edilmiş, bu sürenin sonunda her bir örnek, tekrar Kirby-Bauer Disk Difüzyon testi ile değerlendirilmiştir.

3.3.3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu:

Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu için Klasik izolasyon, identifikasyon testlerinden yararlanılmış, mikroskopileri Olympus BX50F4 markalı ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiş, ayrıca API 20 (Biomerieux) ve VITEK II İdentifikasyon sistemleri (Biomerieux) ile doğrulama yapılmıştır.

3.3.4. PCR ile Bakteriyosin üreticisi türlerin tayini

3.3.4.1. DNA İzolasyonu:

Çalışmalar sonucu elde edilen ve bakteriyosin aktivitesi gösterdiği saptanan *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* ve *P. acidilactici*, *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* kültürleri ile ATCC katalog numaralı referans suşların 24 saat önce MRS broth içerisinde 30 derecede inkübe edilmiş olan alt kültürlerinde 1,5 ml. Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu örnekler 5 dk. boyunca, 8000 rpm (4300 xg) devrinde Heraeus markalı Biofuge model soğutmalı santrifüjde santrifüjlenmiş ve üstte kalan kısım atılmıştır. Altta kalan kısma, 200 µl TE buffer eklenerek, vortekslenmiş, 10 dakika boyunca kaynatıldıktan hemen sonra, 1 dakika süresince buz içerisinde soğutulmuştur. Daha sonra tekrar 10.000 rpm (6700 xg) devrinde santrifüjlenmiş, sonuç olarak

DNA template'ini içeren 5 µl süpernatant toplanmıştır. (Suwanjinda, 2007)

3.3.4.2. PCR Reaksiyonu

1. Eppendorf tüplerine, 50µl reaksiyon karışımı olacak şekilde; her bir reverse ve forward primer stok solusyonundan 0.4 mM, 100 ng DNA template, 25 µl PCR master-mix buffer konularak, nükleaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.
2. Aşağıdaki reaksiyon parametreleri ile Techne markalı Genius model Thermal Cycler'da işlem gerçekleştirilmiştir.

Nisin: Denaturasyon: 92 °C 2 dk.

Bağlanma: 41 °C 2 dk.

Uzama: 72 °C 2 dk.

Toplam: 26 çevrim

Enterocin AS-48: Denaturasyon: 95 °C 30 sn.

Bağlanma: 42 °C 30 sn.

Uzama: 72 °C 30 sn.

Toplam: 30 çevrim

Pediocin AcH/PA-1: Denaturasyon:	92 °C	2 dk.
Bağlanma:	44 °C	2 dk.
Uzama:	72 °C	2 dk.
Toplam:	25 çevrim	

3. Optimizasyon sırasında, reaksiyon Master –mix içerisindeki $MgCl_2$ 'ün başarılı ve yeterli olduğu gözlemlenmiştir.
4. Sonuçlar, agaroz jel elektroforezi ile gözlemlenmiştir. Hazırlanmış olan % 1'lik agaroz jel, Primo yatay elektroforez tankına yerleştirilerek TBE Buffer, jeli kaplayacak şekilde üzerine dökülmüştür.
5. Bir parafilm parçasının üzerine 2 μ l örnek yükleme boyası noktacıklar oluşturacak şekilde pipetlenmiş ve 5 μ l PCR ürünü her noktacığa bir ürün denk gelecek şekilde eklenmiş ve karıştırılmıştır. 5 μ l DNA ladder agaroz jelin ilk kuyucuğuna, diğer ürün-boya karışımları ise diğer kuyucuklara sırayla yüklenmiştir.
6. Kapak kapatılarak, EC 105 model güç kaynağı bağlanmış, boya jelin sonuna ulaştığında bağlantı kesilmiştir ve DNA bantları U.V. altında, ETS Vilbert Lourmat transilluminator'de gözlemlenmiştir (Rodriguez, 2000).

3.3.5. İstatistiksel Analizler

Araştırma sonucunda elde edilen veri ve bilgiler, SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Araştırmada Çapraz Tablolar, Bağımsız "t" testi ve Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) analizlerinden yararlanılmıştır. Tek Yönlü Varyans Analizinde, anlamlı farklılık bulunan gruplar arasında Post-Hoc testleri uygulanarak, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, tablolaştırılarak bulgular bölümünde yorumlanmıştır. Araştırmada tüm bulgular %95 güven düzeyinde, $p = 0.05$ anlamlılık düzeyinde ve çift yönlü olarak sınanmıştır

4. BULGULAR

Toplam olarak, 129 sucuk, sosis, salam ve kıyma örneği alınmış, bu örnekler prestijli markalara ait olmaları ya da daha az bilinen firmalar tarafından üretilmiş olmaları, sonbahar-kış ,ilkbahar-yaz sezonunda toplanmış olmaları ve açık ya da paketli olarak satışa sunulmaları yönünden sınıflandırılmışlardır.

Bu çalışmada toplam 39 sucuk örneği toplanmış, bunların 11'i paketli ve prestijli markalı, 14'ü markasız ve açık, 9'u markasız ve paketli, 5'i ise hem markasız hem de açık üründür.

Alınan toplam 20 kıyma örneğinin, 11'i açık yine 9'u paketlidir. Bu çalışmada alınan 35 salam örneğinden 14'ü paketli ve prestijli markalı, 5'i prestijli markaların açık ürünleri, 8'i az bilinen firmaların açık ürünleri, 8'i ise yine az bilinen firmaların paketli ürünleri olmaktadır. Sosis örnekleri ise, 15'i prestijli markalı, paketli ürün, 8'i prestijli markaların açık ürünleri, 5'i az bilinen firmaların paketli, 7'si ise yine az bilinen firmaların açık ürünleri olmaktadır.

4.1.Bakteriyolojik Analiz Bulguları

Örneklerden elde edilen sonuçlar aşağıda tablolar halinde verilmiştir. Sucuk, sosis, salam örnekleri için örnekleme yapılan prestijli markalar, PN, MR, AT, İB, CM, POL olarak kodlanmıştır. Az bilinen, ekonomik özellikli firmaların en yaygın bulunabilenleri RT ve SR olarak kodlanmıştır. Açık ürünler alındıkları semte göre isimlendirilmiştir.

Sayımların sonucunda *B.cereus*, *C.perfringens*, *S.aureus*, *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp.'nin identifikasyonunda klasik biyokimyasal analizler ile birlikte API ve VITEK identifikasyon sistemlerinden de yararlanılmıştır. Kolonilerin sayımları sonucunda muhtemel sayı ile kesin sayı formüle edilerek hesaplanmıştır (Karaboz, 2002). Kesin rakamlar, muhtemel sayının konfirme ve identifiye edilen koloni sayısı ile çarpılması ve bu rakamın konfirmasyon testlerine tabi tutulan koloni sayısına bölünmesi ile elde edilmiş, bu değer seyreltme faktörü ile çarpılmıştır.

Salmonella spp. identifikasyonu için, Triple Sugar Iron Agar'da dip kısmını sarı (glikoz ve sakkaroz kullanımı), ve siyah olması (H_2S üretimi), yüzeyin kırmızı kalması (laktozun kullanılmaması), besi yerinde gaz oluşması dikkate alınmıştır. *Salmonella* spp. genellikle Mannitol'ü kullanabilmektedirler. Üre testinde *Salmonella* spp. üre besi yerinin orijinal portakal kırmızısı renginin aynı kalmasını sağlayarak, negatif reaksiyon verir. Üre testinde 4 adet tüp kullanılarak, ilkinde inokulasyon yapılmamış ve şahit olarak kullanılmış, ikincisine test kültürü inokule edilmiş ve tüpler kıyaslanmıştır. *Salmonella* spp. genellikle Indol negatif olmaktadır. Lisin Dekarboksilaz testi için, Lysine Iron Agar ve kontrol tüpüne bir öze dolusu saf kültürden ekim yapılmıştır. Parafilm ile hava teması kesilmiştir. *Salmonella* spp. lisini kullanabilmektedir, bu nedenle, kontrol tüpü sarı renge dönerken, test tüpünde menekşe-moru renk oluşur (Halkman, 2005). Et ve et ürünü örneklerinde, 7 örnekten *Salmonella* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Listeria monocytogenes identifikasyonu için CAMP testi yapılmıştır. CAMP Testi için, Kanlı Agar (Merck 1,10886) besi yerinde 2 uca hemolitik bir *S. aureus* suşu ve *Rhodococcus equi* sürülmüştür. Analiz edilen şüpheli bakteri bunlara dik olarak, ama *S.aureus* ve *R. equi*'ye değmeyecek şekilde çizgi halinde ekilmiştir. 37 °C'de 24 saat Memmert markalı Tv506 model etüvde inkübasyonun sonucunda *S.aureus* tarafında hemolizin artması ama *R. equi* tarafında değişiklik olmaması *L. monocytogenes* için pozitif olarak değerlendirilmiştir. Et ve et ürünü örneklerinde toplam 3 adet *Listeria* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiş, bunlardan ikisi *L. monocytogenes*, biri *L. innocua* olarak identifiye edilmiştir.

Çizelge 4.1. Sıcuk örneklerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen analiz sonuçları

Firma	Açık- Paketli- Markalı	Sezon	TAMB sayımı (kob/g)	Koliform sayımı (E/MS/g)	Maya-Küf Sayımı (kob/g)	<i>S. aureus</i> Sayımı (kob/g)	<i>C.perfringens</i> (kob/g)	<i>B.cereus</i> Sayımı (kob/g)	LAB Sayımı (kob/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.
PN3	Mli-P	IY	7,3x10 ⁵	36	3,1x10 ¹	4,3x10 ¹	L.A	3,1x10 ³	3,3x10 ⁵	-	-
PN4	Mli-P	SK	4,1x10 ⁵	36	2,9x10 ¹	2,1x10 ³	L.A	6,4x10 ¹	4,8x10 ⁶	-	-
PN5	Mli-P	SK	9,8x10 ⁶	L.A	3,0x10 ²	L.A	L.A	5,2x10 ²	6,6x10 ⁶	-	-
MIR1	Mli-P	IY	5,6x10 ⁶	74	3,7x10 ¹	5,2x10 ²	L.A	2,7x10 ³	4,9x10 ⁵	-	-
MIR2 (sonkullanma)	Mli-P	SK	2,3x10 ⁶	110	5,1x10 ¹	8,4x10 ²	L.A	3,7x10 ³	3,1x10 ⁵	-	-
MIR3	Mli-P	SK	8,8x10 ⁷	30	3,6x10 ¹	4,1x10 ²	L.A	4,2x10 ²	4,5x10 ⁶	-	-
MIR4	Mli-P	SK	7,2x10 ⁷	74	3,1x10 ¹	6,2x10 ²	L.A	5,2x10 ²	5,1x10 ⁶	-	-
AT1	Mli-P	SK	9,1x10 ⁵	36	L.A	L.A	L.A	L.A	1,8x10 ⁶	-	-
AT2	Mli-P	SK	4,4x10 ⁶	36	4,1x10 ²	L.A	L.A	L.A	4,1x10 ⁶	-	-
AT3	Mli-P	IY	4,7x10 ⁶	L.A	5,1x10 ²	7,2x10 ²	L.A	2,1x10 ²	5,1x10 ⁵	-	-
AT4	Mli-P	IY	6,6x10 ⁶	150	2,2x10 ²	2,8x10 ³	L.A	1,7x10 ²	6,1x10 ⁶	-	-
Alay1	Msız-A	SK	4,1x10 ⁶	150	4,2x10 ²	8,1x10 ²	L.A	7,2x10 ²	1,4x10 ⁶	-	-
Kemalpaşa	Msız-A	SK	1,1x10 ⁷	150	2,4x10 ⁴	9,7x10 ²	L.A	4,8x10 ³	5,7x10 ³	-	+
Alay2	Msız-A	SK	3,3x10 ⁶	36	4,4x10 ³	3,7x10 ¹	L.A	1,4x10 ²	4,2x10 ⁴	-	-
Alay3	Msız-A	SK	3,4x10 ⁷	74	8,2x10 ³	9,1x10 ²	L.A	2,0x10 ²	5,4x10 ⁵	-	-
Bornova1	Msız-A	SK	5,8x10 ⁶	74	5,9x10 ³	6,2x10 ³	L.A	2,5x10 ²	8,8x10 ⁵	-	-
Karşıyakal	Msız-A	SK	4,3x10 ⁷	74	3,6x10 ³	1,1x10 ²	L.A	2,6x10 ²	8,7x10 ⁵	-	-
Karşıyaka2	Msız-A	SK	2,1x10 ⁸	92	2,6x10 ⁴	4,9x10 ³	L.A	9,1x10 ³	1,0x10 ⁶	-	-
Bornova2	Msız-A	IY	2,0x10 ⁸	140	2,3x10 ³	4,2x10 ³	1,3x10 ²	7,8x10 ³	4,2x10 ⁷	-	-

Çizelge 4.1. (devam)

Firma	Açık-Paketli-Markalı	Sezon	TAMB sayımı (kob/g)	Koliform sayımı (E/MS/g)	Maya-Küf Sayımı (kob/g)	S. aureus Sayımı (kob/g)	C.perfringens (kob/g)	B.cereus Sayımı (kob/g)	LAB Sayımı (kob/g)	Salmonella spp.	Listeria spp.
Çeşme	Msız-A	SK	6,1x10 ⁷	110	6,4x10 ³	5,1x10 ²	L.A	2,5x10 ²	7,7x10 ⁸	-	-
foça	Msız-A	IY	4,4x10 ⁷	210	1,5x10 ⁴	5,5x10 ²	L.A	7,3x10 ²	6,2x10 ⁶	-	-
Alsancak	Msız-A	SK	8,1x10 ⁷	210	3,3x10 ⁴	6,7x10 ¹	L.A	5,1x10 ²	5,2x10 ³	+	-
Karşıyaka3	Msız-A	IY	2,1x10 ⁷	92	7,2x10 ³	6,1x10 ³	L.A	L.A	8,2x10 ⁸	-	-
Bornova3	Msız-A	SK	9,7x10 ⁶	36	1,4x10 ⁴	7,2x10 ³	L.A	L.A	6,2x10 ⁶	-	-
Göztepe1	Msız-A	SK	4,8x10 ⁶	30	9,9x10 ²	2,6x10 ²	L.A	1,3x10 ²	7,9x10 ⁶	-	-
RT	Msız-P	IY	5,2 x10 ⁴	L.A	3,0x10 ²	2,3x10 ³	L.A	L.A	3,1x10 ⁴	-	-
RT	Msız-P	IY	3,2x10 ³	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	5,4x10 ³	-	-
SR	Msız-P	SK	2,9x10 ⁴	L.A	3,2x10 ¹	L.A	L.A	L.A	3,6x10 ³	-	-
RT	Msız-P	SK	6,3x10 ⁴	L.A	6,2x10 ²	2,2x10 ¹	L.A	1,2x10 ²	6,2x10 ⁴	-	-
SR	Msız-P	SK	3,6x10 ⁷	L.A	3,3x10 ³	5,1x10 ³	L.A	3,6x10 ²	6,3x10 ⁵	-	-
DiĞER	Msız-P	IY	4,4x10 ⁷	36	2,1x10 ⁴	4,6x10 ³	L.A	3,1x10 ²	2,2x10 ⁵	-	-
DiĞER	Msız-P	IY	7,6x10 ⁶	36	2,7x10 ²	7,1x10 ²	1,7x10 ²	4,9x10 ²	4,9x10 ⁵	-	-
RT	Msız-P	SK	6,6x10 ⁵	L.A	2,9x10 ¹	3,3x10 ¹	L.A	2,2x10 ⁴	7,1x10 ⁴	-	-
DiĞER	Msız-P	SK	1,1x10 ⁶	L.A	1,2x10 ²	2,3x10 ¹	L.A	5,3x10 ³	8,8x10 ⁴	-	-
CM1	Mlı-A	IY	9,2x10 ⁶	L.A	1,3x10 ²	1,7x10 ²	L.A	L.A	4,2x10 ⁴	-	-
CM2	Mlı-A	IY	8,5x10 ⁶	L.A	3,2x10 ¹	4,2x10 ¹	L.A	L.A	5,3x10 ⁴	-	-
CM3	Mlı-A	IY	6,3x10 ⁶	L.A	2,8x10 ²	1,5x10 ²	L.A	L.A	6,2x10 ⁵	-	-
İB1	Mlı-A	IY	1,7x10 ⁴	L.A	5,5x10 ²	9,8x10 ¹	L.A	L.A	5,1x10 ⁶	-	-
İB2	Mlı-A	IY	2,0x10 ⁴	L.A	5,1x10 ²	7,7x10 ¹	L.A	L.A	5,9x10 ⁶	-	-

Çizelge 4.2. Kıyma (Açık- Paketli veya vakum paketli hazır kıyma) örneklerinin analiz sonuçları

Yer	Açık /Paketli	Sezon	TAMB (kob/g)	Koliform (EMS/g)	Maya-Küf (kob/g)	<i>S.aureus</i> (kob/g)	<i>C.perfringens</i> (kob/g)	<i>B.cereus</i> (kob/g)	LAB (kob/g)	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.
Alay1	A	IY	$2,3 \times 10^8$	230	$1,8 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2$	L.A	0	$2,1 \times 10^2$	+	-
Alay2	A	IY	$3,8 \times 10^7$	210	$4,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^2$	L.A	0	$2,3 \times 10^2$	-	-
Alay3	A	SK	$5,8 \times 10^5$	36	$8,2 \times 10^2$	$9,1 \times 10^1$	L.A	0	$4,3 \times 10^3$	-	-
Karşıyaka1	A	SK	$6,3 \times 10^6$	36	$5,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	L.A	0	410	-	-
Karşıyaka2	A	SK	$9,1 \times 10^6$	36	$9,3 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	L.A	$2,1 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$	-	-
Karşıyaka3	A	IY	$9,7 \times 10^8$	160	$7,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$	L.A	$1,7 \times 10^2$	$6,3 \times 10^3$	-	-
Karşıyaka4	P	IY	$7,2 \times 10^8$	210	$5,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$	L.A	$2,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^3$	-	-
Tansaş	Pv	SK	$6,2 \times 10^4$	L.A	$3,2 \times 10^2$	L.A	L.A	L.A	$5,2 \times 10^1$	-	-
Tansaş	Pv	SK	$7,3 \times 10^4$	L.A	$2,7 \times 10^2$	L.A	L.A	L.A	$4,5 \times 10^1$	-	-
Karşıyaka5	P	SK	$8,9 \times 10^9$	74	$1,7 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	L.A	$7,0 \times 10^2$	$6,2 \times 10^2$	+	-
Bornova1	P	IY	$9,3 \times 10^8$	74	$6,2 \times 10^3$	$6,2 \times 10^4$	L.A	$3,3 \times 10^3$	$6,7 \times 10^2$	-	+
Bornova2	Pv	SK	$8,5 \times 10^3$	L.A	$4,8 \times 10^2$	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
Bornova3	Pv	SK	$9,2 \times 10^3$	L.A	$4,3 \times 10^2$	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
Kemalpaşa	A	IY	$5,0 \times 10^9$	230	$6,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^2$	L.A	$6,2 \times 10^4$	$6,1 \times 10^2$	+	-
Alsancak1	A	SK	$8,2 \times 10^7$	150	$5,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$5,1 \times 10^1$	-	-
Alsancak2	A	SK	$4,0 \times 10^6$	92	$4,9 \times 10^3$	$4,1 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$8,2 \times 10^1$	-	-
Bostanlı1	A	IY	$2,2 \times 10^6$	30	$2,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	L.A	$2,0 \times 10^2$	$5,2 \times 10^1$	-	-
Bostanlı2	P	SK	$3,3 \times 10^6$	30	$3,3 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	L.A	$5,1 \times 10^3$	$5,8 \times 10^1$	-	-
Göztepe1	Pv	SK	$5,9 \times 10^4$	L.A	$1,6 \times 10^2$	$3,4 \times 10^1$	L.A	L.A	L.A	-	-
Göztepe2	A	IY	$4,1 \times 10^5$	36	$2,9 \times 10^2$	$8,5 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$7,2 \times 10^1$	-	-

Çizelge 4.3 Salam (Sade-Etli- dilili- fıstık katkılı) örneklerinin analiz sonuçları

Firma	Açık/Markalı/ paketleni	Sezon	TAMB (kob/g)	Koliform (EEMS/g)	Maya-Küf (kob/g)	S.aureus (kob/g)	C.perfringens (kob/g)	B.cereus (kob/g)	LAB (kob/g)	Salmonella spp.	Listeria spp.
PN1	M1i-P	IY	1,9x10 ²	L.A	3,2x10 ¹	L.A	L.A	L.A	2,1x10 ²	-	-
PN2(F)	M1i-P	IY	1,2x10 ²	L.A	3,6x10 ¹	L.A	L.A	L.A	2,3x10 ²	-	-
PN3	M1i-P	SK	9,3x10 ²	L.A	6,7x10 ¹	L.A	L.A	3,1x10 ¹	5,2x10 ¹	-	-
PN4(E)	M1i-P	SK	8,2x10 ⁴	L.A	1,0x10 ²	1,6x10 ²	L.A	1,0x10 ²	4,7x10 ³	-	-
MR1	M1i-P	SK	4,3x10 ³	L.A	6,3x10 ¹	1,5x10 ²	L.A	3,7x10 ¹	1,2x10 ²	-	-
MR2(F)	M1i-P	IY	2,2x10 ²	L.A	4,1x10 ²	L.A	L.A	L.A	3,1x10 ¹	-	-
MR3	M1i-P	IY	2,6x10 ³	L.A	1,0x10 ²	1,6x10 ²	L.A	1,1x10 ²	4,2x10 ¹	-	-
AT1	M1i-P	SK	7,2x10 ²	L.A	8,7x10 ¹	2,3x10 ²	L.A	L.A	L.A	-	-
AT2	M1i-P	SK	6,6x10 ²	L.A	7,9x10 ¹	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
AT3	M1i-P	IY	1,1x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
PN5	M1i-P	IY	1,0x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
PN6 (F)	M1i-P	SK	1,7x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
MR4	M1i-P	SK	4,4x10 ¹	L.A	L.A	7,2x10 ¹	L.A	L.A	L.A	-	-
POL1	M1i-P	SK	5,1x10 ¹	L.A	L.A	5,6x10 ¹	L.A	L.A	L.A	-	-
PNa	M1i-A	IY	8,2x10 ⁴	30	3,1x10 ²	5,3x10 ²	L.A	1,3x10 ²	3,6x10 ³	-	-
PNb	M1i-A	IY	6,2x10 ⁵	30	2,6x10 ²	5,8x10 ²	L.A	1,4x10 ²	3,7x10 ³	var	-
POLa	M1i-A	SK	8,3x10 ⁴	L.A	2,2x10 ²	1,3x10 ²	L.A	6,8x10 ¹	3,2x10 ²	-	-
MRAÇ	M1i-A	IY	7,1x10 ⁴	L.A	8,9x10 ¹	8,7x10 ²	L.A	4,5x10 ¹	L.A	-	-
POLb (D)	M1i-A	SK	7,5x10 ⁴	L.A	1,7x10 ²	1,1x10 ²	L.A	6,2x10 ¹	1,9x10 ²	-	-
SRa	Msız-A	SK	1,0x10 ²	L.A	3,1x10 ¹	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
SRb	Msız-A	SK	1,6x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
SRC	Msız-A	SK	3,2x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	6,2x10 ¹	L.A	-	-

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	Açık/Markalı/ paketli	Sezon	TAMB (kob/g)	Koliform (EMS/g)	Maya-Küf (kob/g)	<i>S.aureus</i> (kob/g)	<i>C.perfringens</i> (kob/g)	<i>B.cereus</i> (kob/g)	LAB (kob/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.
TES	Msız-A	IY	7,7x10 ⁵	74	2,6x10 ²	7,2x10 ²	1,2x10 ²	1,1x10 ³	L.A	-	+
TANa	Msız-A	SK	8,5x10 ⁴	36	5,7x10 ²	8,4x10 ²	L.A	8,1x10 ¹	2,3x10 ³	-	-
TANb	Msız-A	SK	3,4x10 ⁵	36	3,1x10 ²	6,4x10 ²	1,6x10 ²	1,1x10 ²	2,6x10 ³	var	-
TESa	Msız-A	IY	9,2x10 ⁴	30	1,2x10 ²	3,0x10 ²	L.A	9,8x10 ¹	1,4x10 ²	-	-
TESb	Msız -A	IY	8,3x10 ⁴	30	6,6x10 ²	L.A	L.A	6,7x10 ¹	1,8x10 ²	eksi	-
SRI	Msız-P	IY	4,2x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
SR2	Msız-P	IY	1,6x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
RT1	Msız-P	SK	5,5x10 ²	L.A	1,0x10 ²	1,9x10 ²	L.A	L.A	L.A	-	-
RT2	Msız-P	SK	1,3x10 ²	L.A	3,2x10 ¹	1,6x10 ²	L.A	L.A	L.A	-	-
RT3	Msız-P	SK	2,0x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
DIĞER	Msız-P	IY	1,0x10 ⁵	36	4,6x10 ²	3,2x10 ²	L.A	2,1x10 ²	2,6x10 ³	eksi	-
DIĞER2	Msız-P	IY	2,8x10 ⁵	36	2,4x10 ²	3,6x10 ²	L.A	1,4x10 ²	1,7x10 ³	-	-
DIĞER3	Msız-P	SK	7,1x10 ⁵	36	1,9x10 ²	1,9x10 ²	L.A	1,0x10 ²	1,4x10 ²	eksi	-

Msız : Markasız

Mlı : Markalı

A : Açık

P : Paketli

IY : İlkbahar-Yaz sezonu

SK : Sonbahar- Kış Sezonu

L.A : Tayin Limitinin altında

F : Fıstıklı

E : Etlı

Çizelge 4.4. Sosis örneklerinin analiz sonuçları

Firma	Açık/ Markalı/Paketli	Sezon	TAMB (kob/g)	Koliform (EMS/g)	Maya- Küf (kob/g)	<i>S.aureus</i> (kob/g)	<i>C.perfringens</i> (kob/g)	<i>B. cereus</i> (kob/g)	LAB (kob/g)	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.
Pn1	Mlı-P	IY	1,1x10 ²	L.A	L.A	6,7x10 ¹	L.A	L.A	1,0x10 ²	-	-
Pn2	Mlı-P	IY	1,5x10 ²	L.A	L.A	6,4x10 ¹	L.A	L.A	1,3x10 ²	-	-
Pn3	Mlı-P	IY	2,0x10 ²	L.A	L.A	1,1x10 ²	L.A	L.A	1,8x10 ²	-	-
Pn4	Mlı-P	SK	1,4x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	5,6x10 ¹	-	-
Mr1	Mlı-P	SK	8,2x10 ²	L.A	L.A	5,1x10 ¹	L.A	5,6x10 ¹	L.A	-	-
Mr2	Mlı-P	SK	9,8x10 ²	L.A	L.A	5,8x10 ¹	L.A	6,1x10 ¹	L.A	-	-
Mr3	Mlı-P	IY	2,3x10 ²	L.A	1,8x10 ²	1,1x10 ²	L.A	3,2x10 ¹	3,8x10 ¹	-	-
Mr4	Mlı-P	IY	2,5x10 ²	L.A	1,6x10 ²	L.A	L.A	3,0x10 ¹	4,2x10 ¹	-	-
Mr5	Mlı-P	SK	7,1x10 ²	L.A	2,0x10 ²	L.A	L.A	L.A	6,6x10 ¹	-	-
At1	Mlı-P	IY	3,1x10 ²	L.A	L.A	5,4x10 ¹	L.A	2,1x10 ²	8,2x10 ¹	-	-
At2	Mlı-P	IY	3,8x10 ²	L.A	1,2x10 ²	7,3x10 ¹	L.A	2,0x10 ²	5,8x10 ¹	-	-
At3	Mlı-P	SK	1,8x10 ²	L.A	L.A	1,0x10 ²	L.A	L.A	4,6x10 ¹	-	-
At4	Mlı-P	SK	1,5x10 ²	L.A	L.A	1,2x10 ²	L.A	L.A	4,3x10 ¹	-	-
DİĞER	Mlı-P	IY	4,3x10 ⁴	36	1,1x10 ³	L.A	L.A	4,5x10 ²	2,1x10 ²	-	-
DİĞER2	Mlı-P	IY	2,2x10 ⁵	36	3,2x10 ²	1,1x10 ²	L.A	4,4x10 ²	1,0x10 ³	-	-
PnA1	Mlı-A	IY	3,2x10 ⁶	74	2,1x10 ²	5,1x10 ³	L.A	2,1x10 ²	1,3x10 ³	-	-
PnA2	Mlı-A	IY	5,3x10 ⁶	36	9,8x10 ¹	1,0x10 ²	L.A	1,1x10 ²	2,7x10 ³	-	-
PnA3	Mlı-A	IY	4,2x10 ⁵	74	3,1x10 ²	1,4x10 ²	L.A	1,3x10 ²	2,9x10 ¹	+	-

Çizelge 4.4. (devam)

Firma	Açık/ Markalı/Paketli	Sezon	TAMB (kob/g)	Koliform (EMS/g)	Maya- Küf (kob/g)	<i>S.aureus</i> (kob/g)	<i>C.perfringens</i> (kob/g)	<i>B. cereus</i> (kob/g)	LAB (kob/g)	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.
PnA4	Mli-A	SK	3,1x10 ⁴	L.A	L.A	5,1x10 ¹	L.A	5,1x10 ¹	4,2x10 ²	-	-
PnA5	Mli-A	SK	3,7x10 ⁴	L.A	L.A	L.A	L.A	5,0x10 ¹	6,1x10 ¹	-	-
MrA1	Mli-A	IY	2,2x10 ⁴	36	4,2x10 ²	2,0x10 ²	L.A	1,0x10 ²	1,2x10 ²	-	-
MrA2	Mli-A	IY	7,1x10 ⁴	36	2,1x10 ²	2,2x10 ²	L.A	1,5x10 ²	1,7x10 ²	-	-
POL1	Mli-A	SK	2,1x10 ⁴	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	1,3x10 ²	-	-
RT1	Msız-P	IY	4,1x10 ³	36	L.A	L.A	L.A	1,1x10 ²	L.A	-	-
RT2	Msız-P	SK	6,5x10 ²	L.A	3,2x10 ¹	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
SR1	Msız-P	IY	5,9x10 ⁴	L.A	L.A	1,1x10 ²	1,6x10 ²	1,0x10 ²	L.A	-	-
SR2	Msız-P	SK	8,2x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
DIGER1	Msız-P	SK	3,7x10 ²	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	1,3x10 ²	-	-
RTA1	Msız-A	IY	6,7x10 ⁶	36	3,2x10 ³	8,2x10 ¹	L.A	2,3x10 ³	2,3x10 ²	-	-
RTA2	Msız-A	IY	6,4x10 ⁶	36	2,9x10 ³	6,2x10 ¹	L.A	1,6x10 ³	2,1x10 ²	-	-
RTA3	Msız-A	SK	7,8x10 ²	L.A	3,1x10 ¹	4,6x10 ¹	L.A	L.A	4,3x10 ¹	-	-
SRA1	Msız-A	IY	6,2x10 ³	74	1,6x10 ²	3,2x10 ¹	L.A	3,6x10 ¹	1,6x10 ²	-	-
SRA2	Msız-A	IY	6,6x10 ⁴	210	8,9x10 ¹	3,8x10 ¹	L.A	3,9x10 ¹	1,9x10 ²	-	-
DIGERA-1	Msız-A	SK	7,2x10 ³	74	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	-	-
DIGERA2	Msız-A	IY	7,9x10 ⁵	210	L.A	3,4x10 ³	L.A	1,6x10 ²	L.A	+	-

Çizelge 4.5. Elde edilen sonuçların, örneklerin paketlenmiş- açık olma özelliğine göre ortalaması

	PAKETLİ						AÇIK					
	salam	sucuk	kıyma	sosis	salam	sucuk	kıyma	sosis	salam	sucuk	kıyma	sosis
TAMB	(kob/g) 5,3x10 ³	1,7x10 ⁷	8,9x10 ⁷	1,6x10 ⁴	1,7x10 ⁵	4,6x10 ⁷	3,9x10 ⁷	1,2x10 ⁶				
Maya-Küf	(kob/g) 9,0x10 ¹	1,3x10 ³	4,4x10 ³	1,0x10 ²	2,3x10 ²	1,3x10 ⁴	2,5x10 ³	5,0x10 ²				
<i>S.aureus</i>	(kob/g) 9,3x10 ¹	9,2x10 ²	1,2x10 ³	5,1x10 ¹	4,5x10 ²	1,9x10 ³	2,2x10 ²	6,2x10 ²				
<i>C.perfringens</i>	(kob/g) L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A				
<i>B.cereus</i>	(kob/g) 3,3x10 ¹	1,9x10 ³	1,3x10 ³	8,4x10 ¹	1,5x10 ²	1,2x10 ³	6,6x10 ²	3,2x10 ²				
LAB	(kob/g) 4,4 x10 ²	3,5x10 ⁷	5,4x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ³	1,0x10 ⁸	1,1x10 ³	3,8x10 ²				
<i>Salmonella</i> spp.	var/yok	yok	var-1	yok	var-2	var-1	var-1	var-2				
<i>Listeria</i> spp.	var/yok	yok	var-1	yok	var-1	var-1	yok	yok				
Koliform	EMS/g L.A	30	66	L.A	20	71	113	56				

Çizelge 4.6. Elde Edilen sonuçların, örneklerin markalı-markasız olma özelliğine göre ortalaması

		MARKALI			MARKASIZ		
		salam	sucuk	sosis	salam	sucuk	sosis
TAMB	(kob/g)	5,3x10 ⁴	1,7x10 ⁷	1,9x10 ⁵	1,5 x10 ⁵	6,4x10 ⁷	1,1x10 ⁶
Maya-Küf	(kob/g)	1,0x10 ²	1,9x10 ²	1,4x10 ²	1,8x10 ³	1,1x10 ⁴	5,2x10 ²
<i>S.aureus</i>	(kob/g)	2,2x10 ²	5,3x10 ²	2,9x10 ²	2,3x10 ²	2,8x10 ³	3,1x10 ²
<i>C.perfringens</i>	(kob/g)	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.
<i>B.cereus</i>	(kob/g)	3,8x10 ¹	7,1x10 ²	9,9x10 ¹	1,2x10 ²	17x10 ³	3,6x10 ²
LAB	(kob/g)	4,7x10 ³	4,4x10 ⁷	3,0x10 ²	6,0x10 ²	1,5x10 ⁸	8,0x10 ¹
<i>Salmonella</i> spp.	var/yok	var-1	yok	var-1	var-1	var-1	var-1
<i>Listeria</i> spp.	var/yok	yok	yok	yok	var-1	var-1	yok
Koliform	EMS/g	L.A.	36	L.A.	L.A.	10 ³	55

Çizelge 4.7. Elde edilen sonuçların sezona göre ortalaması

		İLKBAHAR-YAZ				SONBAHAR-KIŞ			
		salam	sucuk	kıyma	sosis	salam	sucuk	kıyma	sosis
TAMB	(kob/g)	1,3x10 ⁵	2,6x10 ⁷	1,0x10 ⁸	8,3x10 ⁵	7,2x10 ⁴	2,9x10 ⁷	1,3x10 ⁷	6,4X10 ⁴
Maya-Küf	(kob/g)	1,8x10 ²	3,0x10 ³	9,0x10 ³	4,5x10 ²	1,1x10 ²	5,7x10 ³	1,9x10 ³	1,4X10 ¹
<i>S.aureus</i>	(kob/g)	2,4x10 ²	1,3x10 ³	1,3x10 ³	4,7x10 ²	1,6x10 ²	1,3x10 ³	6,1x10 ²	2,7X10 ¹
<i>C.perfringens</i>	(kob/g)	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.
<i>B.cereus</i>	(kob/g)	1,2x10 ²	9,6x10 ²	2,1x10 ³	3,0x10 ²	3,4X10 ¹	2,1x10 ³	5,6x10 ²	1,5X10 ¹
LAB	(kob/g)	7,7x10 ²	5,8x10 ⁷	1,9x10 ²	2,2x10 ²	5,4X10 ²	3,5x10 ⁷	8,3x10 ²	7,1X10 ¹
<i>Salmonella</i>	var/yok	var-1	yok	var-1	var-2	var-1	var-1	var-1	yok
<i>Listeria</i>	var/yok	var-1	yok	var-1	yok	yok	var-1	yok	yok
Koliform	EMS/g	L.A.	49	226	41	L.A.	30	60	L.A.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin İdentifikasyonu, Antibakteriyel İnhibisyon Yeteneğinin ve Bakteriyosin Aktivitesini Belirlenmesi

İzole edilen Laktik asit bakterileri içerisinde sadece 29 tanesi saf olarak izole edilerek identifiye edilebilmiş ve antibakteriyel aktiviteleri ve bakteriyosin üretimleri yönünden inhibisyon testine tabi tutulabilmişlerdir. Sonuçlar, çizelge 4.9' da gösterilmiştir. İdentifikasyonda, koloni morfolojisi, mikroskopi ve biyokimyasal testlerden yararlanılmış, ayrıca VITEK II (Biomerieux) İdentifikasyon sistemi ile doğrulama yapılmıştır. Aşağıda tabloda belirtilenlerden başka, 7 adet *Carnobacterium* spp., 9 adet *Leuconostoc* spp., 7 adet *Lactobacillus* spp., 13 adet *Streptococcus* spp. ve 1 *Kocuria* sp. izole edilmiştir. Bu izolatların hiçbirinde bakteriyosin aktivitesi saptanmamıştır. Çizelge 4.8' de laktik asit bakterisi genuslarının biyokimyasal özellikleri ile çalışmada yürütülen testler gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Laktik Asit Bakterilerinin bazı genuserının biyokimyasal özellikleri

	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.
Katalaz	-	-	- (bazen+)	-	-
Şekil	Oval kok	Kok	Kok (dörtlü, ikili gruplar)	Çomak-kokobasil	Çomak
10⁰ C'de gelişme	+/-	+	-	+/-	+
37⁰ C'de gelişme	Zayıf+/-	+	+	+/-	+/-
% 3,5 NaCl'de gelişme	+	+	+	+	+/-
% 6,5 NaCl'de gelişme	-	+	+/-	+	-
Arjinin Hidrolizi	+	+/-	+	-	-
Esculine Hidrolizi	-	+	+	+/-	n.d.
Mannitol	+	+/-	-	+	+
Sucrose	+	+	-	+	+/-
Arabinose	+	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	+
Nitrat	-	+/-	-	+	-
Sorbitol	+	+/-	-	+	n.d.

+ : izolatların en az % 80'inde +

- : izolatların en az %80'inde -

n.d.: belirleyici değil/ test edilemedi.

+/-: izolatlar arası varyasyonlar fazla.

Çizelge 4.9. Saf olarak izole ve identifiye edilebilen laktik asit bakterilerini ve antibakteriyel aktiviteleri

İzolat Özellikleri		Antimikrobiyal aktivite				
Tür	Gıda Örneği	E. faecalis	E. coli	S. aureus	L. monocytogenes	M. luteus
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	Sucuk (PN4)	+	+	++	+	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	Sucuk (PN5)	+	-	++	+	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> 3	Sucuk (PN3)	+	+	++	+	++
<i>Lactobacillus sake</i> 1	Sucuk (AT2)	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus sake</i> 2	Sucuk (AT3)	+	+	-	+	++
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Sucuk (K. yaka1)	+	+	+	+	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> 1	Sucuk (K. yaka1)	++	-	+++	++	+++
<i>Pediococcus acidilactici</i> 2	Sosis (PnA1)	+++	+	++	++	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> 3	Sucuk (Born2)	+++	++	++	++	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> 4	Sosis (PnA2)	++	++	++	++	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	Sucuk (CM1)	+++	+	++	++	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	Sucuk (CM2)	++	++	++	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i> 1	Kıyma (tans)	+++	+	++	++	+
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	Kıyma(tans)	++	-	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis a</i>	Sucuk (K. yaka3)	+	-	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> 1	Kıyma(alaybey 3)	-	-	-	-	-
<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1	Sucuk (RT1)	+	-	+	+	+
<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2	Sucuk (RT3)	++	+	++	+	+++
<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Kıyma(bost2)	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus garviae</i>	Kıyma (Göztepe2)	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 2	Sucuk (Born2)	+	-	-	-	+
<i>Aerococcus viridans</i>	Sosis (DIGER1)	+	-	-	-	+
<i>L. sake</i>	Salam (PNA)	-	-	-	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> 2	Sucuk (Born2)	+	-	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> 3	Sucuk (Foça)	+	+	++	-	++
<i>Enterococcus faecium</i> 4	Sucuk (IB2)	+	-	+	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> p-1	Sosis (pol1)	+	+	+	+	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> p-2	Sosis (A12)	+	-	-	-	+
<i>L.mesenteroides</i>	Kıyma (Göztepe1)	-	-	+	++	+
<i>L. delbrueckii</i>	Sosis (Mr5)	-	-	-	-	+

(++++): Çok iyi inhibisyon etkisi-antimikrobiyal aktivite

(+++): İyi inhibisyon etkisi-antimikrobiyal aktivite

(++): Orta derecede inhibisyon etkisi-antimikrobiyal aktivite

(+): Zayıf inhibisyon etkisi-antimikrobiyal aktivite

(-): İnhibisyon etkisi-antimikrobiyal aktivite görülmedi

Çizelge 4.10. İnhibisyon Yeteneğinin Değerlendirilmesinde kullanılan Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yönteminde Zon Çapları (Rodriguez et al., 2000)

Zon Çapı (mm)	İnhibisyon Özelliği
görülmedi	-
<10	(+)
10-14	(++)
15-19	(+++)
20-24	(++++)

(+): Zayıf İnhibisyon Yeteneği
 (++): Orta inhibisyon yeteneği
 (+++): İyi inhibisyon yeteneği
 (++++): Çok iyi inhibisyon yeteneği

Çizelge 4.11. Standart suşlar ve çalışma sonucu elde edilen izolatlarda bakteriyosin aktivitesinin proteaz, ısı ve pH'a göre değişimi.

	Proteaz	Isı ile Muamele			pH değişimleri		
	Proteinaz K	60 C	100 C	121 C	2	6	9
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Standart)	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecium</i> 3	+	-	-	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (Standart)	+	-	-	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> 1	+	-	-	+	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> (Standart)	+	-	+/-	+	+/-	-	-

+: İnhibisyon yeteneğinin kaybı
 -/+: İnhibisyon yeteneğinin azalması
 -: İnhibisyon yeteneğinin korunması

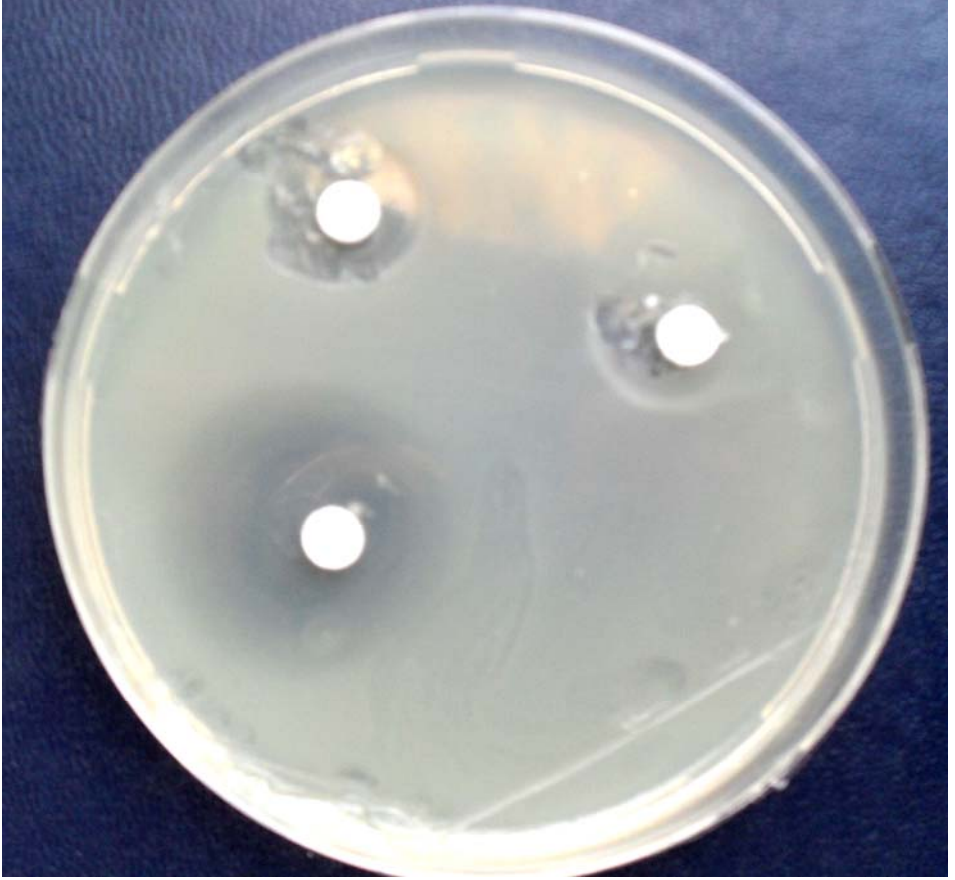
Yapılan bakteriyosin aktivitesini belirleme çalışmaları sonucunda sadece *Lactococcus lactis* 2, *Enterococcus faecalis* 1 ve *Enterococcus faecium* 3'de aktivite gözlemlenmiştir. *Enterococcus faecalis* 1, *M. luteus*'a zayıf, standart *E. faecalis* suşuna ise orta düzeyde bakteriyosin inhibisyonu göstermiştir Şekil 4.1'de *Enterococcus faecalis* 1 ile *L. lactis* subsp. *lactis* 1'in *Micrococcus luteus*'a karşı zayıf antibakteriyel

inhibisyon aktivitesini görmek mümkündür. Ayrıca, *Enterococcus faecalis*'in zayıf bakteriyosin aktivitesi de görülebilmektedir. *Lactococcus lactis* 2, *M. luteus*'a zayıf, *Enterococcus faecium* 3 ise *E. faecalis*'e orta derecede bakteriyosin aktivitesi göstermiştir. 4 *Pediococcus acidilactici* suşu, başarılı antibakteriyel inhibisyon özelliklerine karşın (Şekil 4.2) hiçbir indikatör bakteriye karşı bakteriyosin aktivitesi göstermemiştir. Bu suşlar ile bakteriyosin aktivitesi gösteren suşlar PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur. Şekil 4.4'de bir suşun güçlü antibakteriyel aktivite göstermesinin (*P.pentosaceus* 1), bakteriyosin aktivitesi göstermesi anlamına gelmediğini görebilmek mümkündür. Bu suş, ayrıca PCR reaksiyonu ile analiz edilmiş ve Pediocin AcH/PA-1 için negatif bulunmuştur.

Bakteriyosin aktivitesinin pH, ısı ve proteaz muamelesi sonucu nasıl değiştiğini Çizelge 4.11'de görebiliriz. Hepsinin proteaz aktivitesine duyarlı olması, ısıya büyük ölçüde direnç göstermeleri, düşük ve yüksek pH düzeylerinde aktivitelerini kolayca kaybetmemeleri bu inhibitör maddelerin bakteriyosin olabileceğini düşündürmektedir.



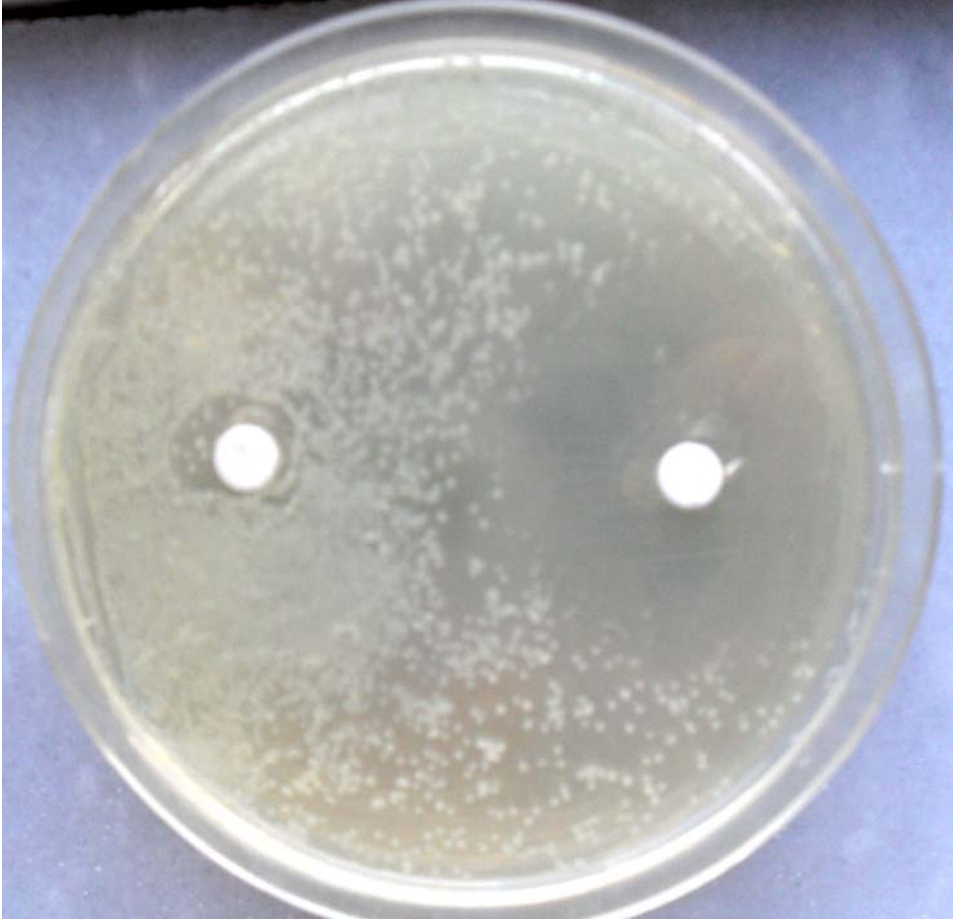
Şekil 4.1. *L.lactis* sub sp. *lactis* ile *E. faecalis* için Disk Difüzyon Testi. Saat yönünde;
1. *L.lactis* subsp. *lactis* 1 antibakteriyel aktivite (zayıf) 2. *L. lactis* sub sp.
lactis 1 bakteriyosin aktivitesi (negatif) 3. *E. faecalis* 1 antibakteriyel
inhibisyon aktivitesi (+) 4. *E. faecalis* 1 bakteriyosin inhibisyonu (+).
İndikatör Mikroorganizma: *Micrococcus luteus*



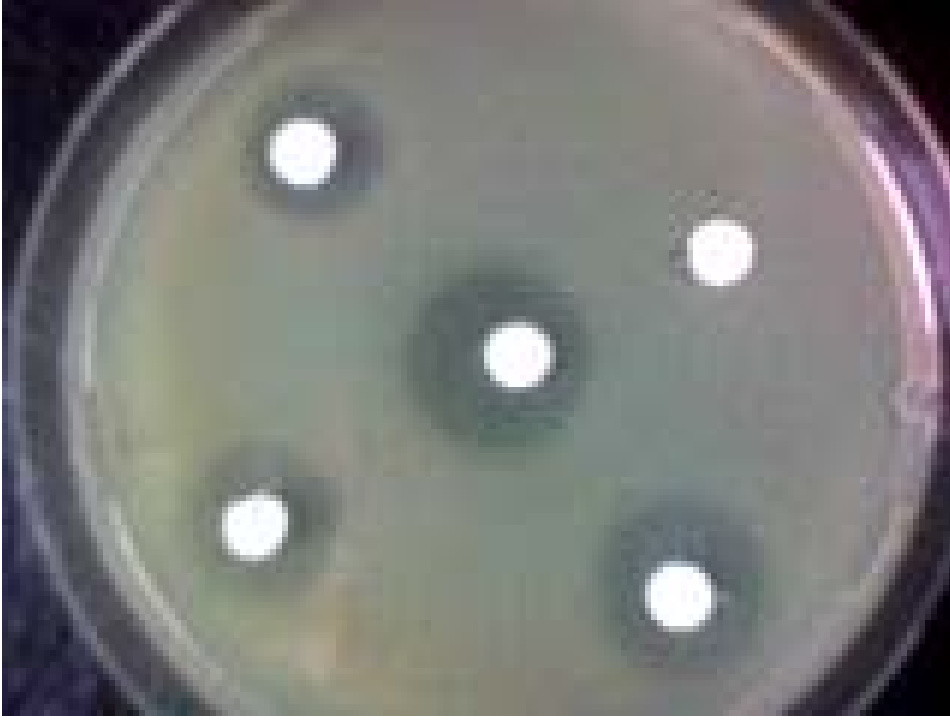
Şekil 4.2. Antibakteriyel İnhibisyon. Saat yönünde Üst sol: *P. acidilactici* 1 antibakteriyel inhibisyon (++) . Sağ: *Pediococcus acidilactici* 3 antibakteriyel inhibisyon(++). Alt Sol: *P. acidilactici* 2 antibakteriyel inhibisyon (+++). İndikatör Mikroorganizma: *E. faecalis*



Şekil 4.3. Bakteriyosin aktivitesi. Saat yönünde: 1. *Enterococcus faecalis* 2 bakteriyosin aktivitesi, 2. *Enterococcus faecalis* 3 bakteriyosin aktivitesi, 3. *Enterococcus faecalis a* bakteriyosin aktivitesi, 4. *Enterococcus faecium* 1 bakteriyosin aktivitesi. Hepsi negatif bulunmuştur. İndikatör Mikroorganizma: *L. monocytogenes*

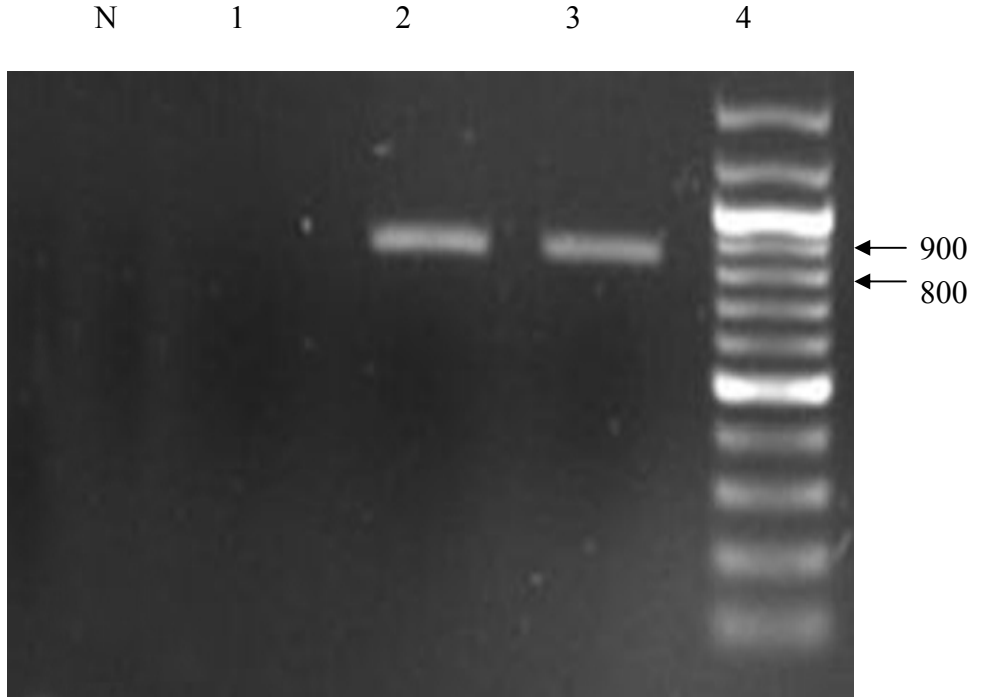


Şekil 4.4. *Enterococcus faecalis*'e karşı bakteriyosin aktivitesi ile genel antibakteriyel aktivitenin kıyaslanması. Solda, *P. pentosaceus* 1 bakteriyosin analizi (negatif), Sağda, *P.pentosaceus* 1 antibakteriyel aktivite (+++)

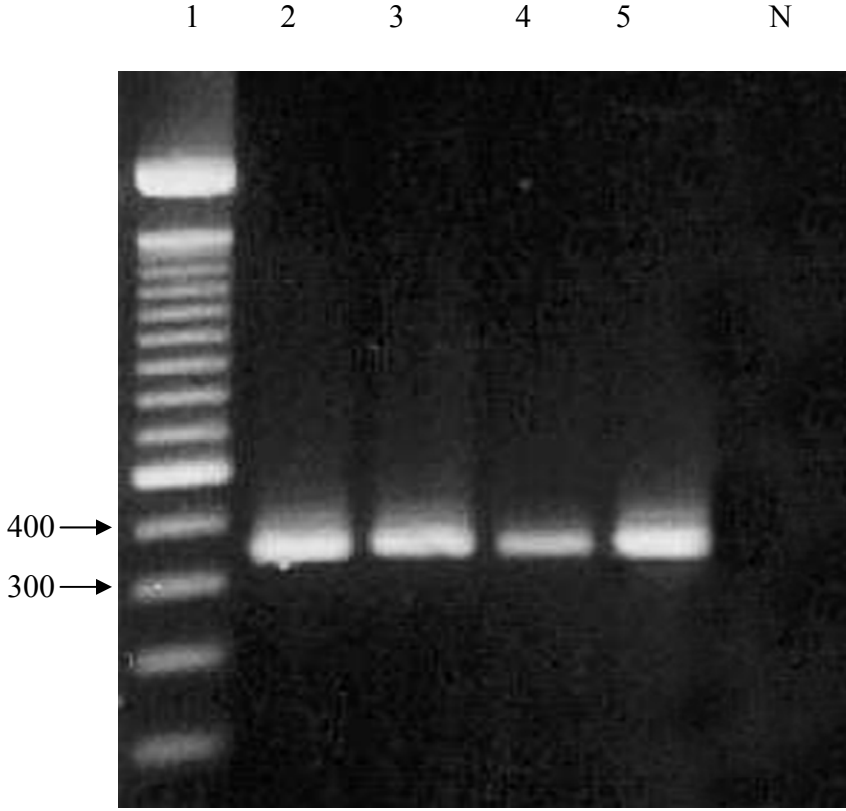


Şekil 4.5. Bakteriyosin aktivitesi. Saat yönünde Üst sol: *Enterococcus faecium* 3 bakteriyosin inhibisyon aktivitesi (++) , Üst Sağ: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2 bakteriyosin aktivitesi (negatif) Alt sol: *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* referans strainin bakteriyosin aktivitesi (++) , Alt Sağ: *Enterococcus faecalis* 1 bakteriyosin aktivitesi(++), Orta: *Enterococcus faecalis* referans suşun bakteriyosin aktivitesi.(+++) İndikatör Mikroorganizma: *E.faecalis*

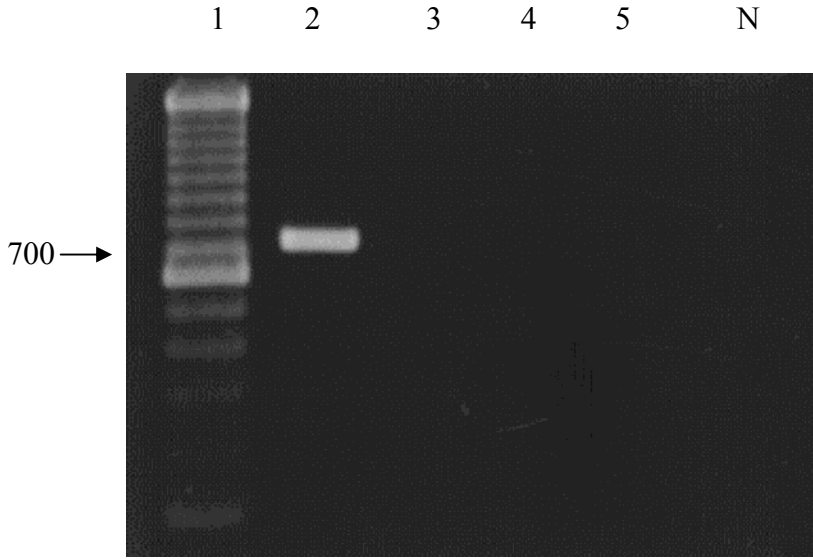
4.3.PCR Amplifikasyonu Bulguları



Şekil 4.6. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PCR amplifikasyon sonuçları. Soldan sağa: İlk sıra, negatif kontrol, ikinci sıra *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1, indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermemiştir (sucuk-RT1), üçüncü sıra *L. lactis* subsp. *lactis* 2 (sucuk-RT 3), indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermiştir. Dördüncü sıra *L. lactis* subsp. *lactis* referans strain, indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermiştir. son sıra, 100 bp. DNA ladder. 898 bp. amplikon elde edilmiştir.



Şekil 4.7. *E.faecalis* PCR amplifikasyon sonuçları. Soldan sağa: İlk sıra, 100 bp. DNA ladder, ikinci sıra, *E.faecalis* referans strain, üçüncü sıra *E. faecalis* 1 (Kıyma) indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermiştir, dördüncü sıra *E. faecium* 3 (sucuk-foça) indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermiştir, beşinci sıra *E. faecalis* a (Kıyma) indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermediği halde PCR ile pozitif sonuç elde edilmiştir. Son sıra negatif kontrol. 318 bp. amplicon elde edilmiştir.



Şekil 4.8. *Pediococcus acidilactici* PCR amplifikasyon sonuçları. Soldan sağa: İlk sıra 100 bp. DNA ladder, ikinci sıra, *Pediococcus acidilactici* bakteriyosin üreten standart suş, üçüncü sıra *Pediococcus acidilactici* 2 (sosis, PnA1) indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermemiştir., dördüncü sıra *P. acidilactici* 3 (sucuk Born.2) indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermemiştir, beşinci sıra *P. pentosaceus* 1 (sucuk CM1), indikatör mikroorganizmalara karşı disk difüzyon testinde bakteriyosin aktivitesi göstermemiştir. Son sıra, negatif kontrol. 711 bp. amplikon boyutu elde edilmiştir.

4.4. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları

Çizelge 4.12. Salam için, markalı ve markasız arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Markalı	19	53799,16	141474,89	-1,42	0,170
	Markasız	16	153877,50	250961,64		
Koliform	Markalı	19	3,16	9,46	-2,73	0,013
	Markasız	16	19,63	22,50		
Maya-Küf	Markalı	19	106,68	116,95	-1,31	0,204
	Markasız	16	185,81	216,56		
<i>S.aureus</i>	Markalı	19	222,00	355,50	-0,10	0,923
	Markasız	16	232,50	281,48		
Clostridium spp.	Markalı	19	0,00	0,00	-1,45	0,168
	Markasız	16	0,18	0,48		
B.cereus	Markalı	19	38,42	50,21	-1,25	0,231
	Markasız	16	123,13	268,10		
LAB	Markalı	19	694,47	1487,57	0,21	0,833
	Markasız	16	603,75	1030,84		

Çizelge 4.13. Sucuk için, markalı ve markasız arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Markalı	16	17661062,50	29077232,37	-1,28	0,209
	Markasız	23	35722704,35	57998235,25		
Koliform	Markalı	16	36,38	45,07	-1,72	0,093
	Markasız	23	67,39	67,38		
Maya-Küf	Markalı	16	197,31	201,77	-3,78	0,001
	Markasız	23	7819,63	9657,09		
<i>S.aureus</i>	Markalı	16	537,69	806,06	-2,65	0,013
	Markasız	23	2005,69	2480,02		
Clostridium spp.	Markalı	16	0,00	0,00	-1,00	0,328
	Markasız	23	0,06	0,27		
B.cereus	Markalı	16	712,75	1245,15	-1,47	0,153
	Markasız	23	2324,78	5029,61		
LAB	Markalı	16	6328437,50	14776193,09	-1,38	0,180
	Markasız	23	72407995,65	228302626,83		

Çizelge 4.14. Sosis için, markalı ve markasız arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Markalı	23	199161,30	668890,22	-1,32	0,213
	Markasız	12	1175078,33	2521115,13		
Koliform	Markalı	23	14,26	24,08	-1,85	0,089
	Markasız	12	56,33	76,85		
Maya-Küf	Markalı	23	144,70	244,35	-1,12	0,287
	Markasız	12	529,08	1180,31		
<i>S.aureus</i>	Markalı	23	292,52	1049,81	-0,05	0,961
	Markasız	12	310,33	973,72		
Clostridium spp.	Markalı	23	0,00	0,00	-1,00	0,339
	Markasız	12	0,13	0,46		
B.cereus	Markalı	23	99,13	130,33	-1,19	0,258
	Markasız	12	362,08	758,42		
LAB	Markalı	23	303,52	611,65	1,71	0,100
	Markasız	12	80,25	95,43		

Çizelge 4.15. Salam için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Açık	13	176967,69	247060,01	1,61	0,125
	Paketli	22	53802,00	159697,54		
Koliform	Açık	13	20,46	22,78	2,26	0,037
	Paketli	22	4,91	12,65		
Maya-Küf	Açık	13	230,77	203,34	2,23	0,039
	Paketli	22	90,91	128,73		
<i>S.aureus</i>	Açık	13	453,08	421,43	3,02	0,010
	Paketli	22	93,09	114,24		
Clostridium spp.	Açık	13	0,22	0,53	1,46	0,170
	Paketli	22	0,00	0,00		
B.cereus	Açık	13	151,69	288,23	1,47	0,167
	Paketli	22	33,09	59,38		
LAB	Açık	13	1002,31	1467,15	1,17	0,255
	Paketli	22	446,59	1144,11		

Çizelge 4.16. Sucuk için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Açık	19	39828263,16	62414621,82	1,44	0,163
	Paketli	20	17373110,00	27843930,96		
Koliform	Açık	19	77,79	69,43	2,44	0,021
	Paketli	20	32,70	41,58		
Maya-Küf	Açık	19	8033,81	9915,81	2,60	0,015
	Paketli	20	1518,31	4685,28		
<i>S.aureus</i>	Açık	19	1756,53	2512,90	1,02	0,316
	Paketli	20	1067,99	1574,61		
Clostridium spp.	Açık	19	0,07	0,30	1,00	0,331
	Paketli	20	0,00	0,00		
B.cereus	Açık	19	1310,00	2745,35	-0,54	0,592
	Paketli	20	1999,20	4941,86		
LAB	Açık	19	88184100,00	249397196,47	1,46	0,162
	Paketli	20	4557050,00	13455548,92		

Çizelge 4.17. Kıyma için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Açık	11	30607454,55	68294195,41	-1,02	0,327
	Paketli	10	89680500,00	170544844,96		
Koliform	Açık	11	170,36	228,56	1,34	0,205
	Paketli	10	73,00	74,05		
Maya-Küf	Açık	11	4734,00	7838,99	0,08	0,934
	Paketli	10	4473,00	6336,84		
<i>S.aureus</i>	Açık	11	616,91	1488,99	-0,66	0,519
	Paketli	10	1221,10	2517,76		
Clostridium spp.	Açık	11	0,36	0,63	1,91	0,086
	Paketli	10	0,00	0,00		
B.cereus	Açık	11	906,64	1795,48	-0,53	0,603
	Paketli	10	1447,50	2730,24		
LAB	Açık	11	299,73	227,69	-0,70	0,503
	Paketli	10	588,20	1293,37		

Çizelge 4.18. Sosis için, açık ve paketli arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	Açık	15	1223073,33	2310673,16	2,35	0,025
	Paketli	20	16777,50	50343,34		
Koliform	Açık	15	59,73	67,12	3,09	0,008
	Paketli	20	5,40	13,19		
Maya-Küf	Açık	15	506,47	1042,19	1,67	0,104
	Paketli	20	104,00	252,20		
<i>S.aureus</i>	Açık	15	628,33	1506,69	1,72	0,095
	Paketli	20	51,35	47,49		
Clostridium spp.	Açık	15	0,00	0,00	-0,86	0,394
	Paketli	20	0,08	0,36		
B.cereus	Açık	15	329,07	674,26	1,59	0,122
	Paketli	20	84,45	139,25		
LAB	Açık	15	384,20	715,52	1,63	0,113
	Paketli	20	109,05	218,51		

Çizelge 4.19. Salam için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	İlkbahar/Yaz	16	131370,00	233337,50	0,85	0,401
	Sonbahar/Kış	19	72752,84	174077,30		
Koliform	İlkbahar/Yaz	16	16,63	21,98	1,81	0,080
	Sonbahar/Kış	19	5,68	13,49		
Maya-Küf	İlkbahar/Yaz	16	186,06	197,47	1,38	0,176
	Sonbahar/Kış	19	106,47	142,22		
<i>S.aureus</i>	İlkbahar/Yaz	16	240,00	296,49	0,22	0,826
	Sonbahar/Kış	19	215,68	344,85		
Clostridium spp.	İlkbahar/Yaz	16	0,08	0,30	-0,08	0,937
	Sonbahar/Kış	19	0,08	0,37		
B.cereus	İlkbahar/Yaz	16	127,94	268,15	1,50	0,142
	Sonbahar/Kış	19	34,37	41,70		
LAB	İlkbahar/Yaz	16	777,06	1336,43	0,52	0,607
	Sonbahar/Kış	19	548,53	1260,48		

Çizelge 4.20. Sucuk için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	İlkbahar/Yaz	16	131370,00	233337,50	0,85	0,401
	Sonbahar/Kış	19	72752,84	174077,30		
Koliform	İlkbahar/Yaz	16	16,63	21,98	1,81	0,080
	Sonbahar/Kış	19	5,68	13,49		
Maya-Küf	İlkbahar/Yaz	16	186,06	197,47	1,38	0,176
	Sonbahar/Kış	19	106,47	142,22		
<i>S.aureus</i>	İlkbahar/Yaz	16	240,00	296,49	0,22	0,826
	Sonbahar/Kış	19	215,68	344,85		
Clostridium spp.	İlkbahar/Yaz	16	0,08	0,30	-0,08	0,937
	Sonbahar/Kış	19	0,08	0,37		
B.cereus	İlkbahar/Yaz	16	127,94	268,15	1,50	0,142
	Sonbahar/Kış	19	34,37	41,70		
LAB	İlkbahar/Yaz	16	777,06	1336,43	0,52	0,607
	Sonbahar/Kış	19	548,53	1260,48		

Çizelge 4.21. Kıyma için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	İlkbahar/Yaz	7	85187142,86	154514698,84	0,92	0,371
	Sonbahar/Kış	13	31321307,69	107796781,87		
Koliform	İlkbahar/Yaz	7	153,43	145,77	1,96	0,066
	Sonbahar/Kış	13	60,77	68,58		
Maya-Küf	İlkbahar/Yaz	7	10270,00	9800,63	3,00	0,008
	Sonbahar/Kış	13	1902,62	2250,52		
<i>S.aureus</i>	İlkbahar/Yaz	7	846,43	1920,97	0,27	0,792
	Sonbahar/Kış	13	613,23	1831,80		
Clostridium spp.	İlkbahar/Yaz	7	0,19	0,49	-0,09	0,928
	Sonbahar/Kış	13	0,21	0,52		
B.cereus	İlkbahar/Yaz	7	2406,43	3181,39	1,81	0,087
	Sonbahar/Kış	13	568,69	1408,53		
LAB	İlkbahar/Yaz	7	923,43	1469,11	1,80	0,089
	Sonbahar/Kış	13	192,69	219,12		

Çizelge 4.22.Sosis için, ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış arasındaki farkın incelenmesi

		N	Ortalama	Standart Sapma	t	Anlamlılık
TAMB	İlkbahar/Yaz	21	885320,48	2009717,23	2,00	0,059
	Sonbahar/Kış	14	6422,86	12003,17		
Koliform	İlkbahar/Yaz	21	44,29	60,75	2,73	0,011
	Sonbahar/Kış	14	5,29	19,78		
Maya-Küf	İlkbahar/Yaz	21	451,29	898,94	2,22	0,038
	Sonbahar/Kış	14	14,29	53,45		
<i>S.aureus</i>	İlkbahar/Yaz	21	479,62	1283,27	1,61	0,122
	Sonbahar/Kış	14	27,14	41,74		
Clostridium spp.	İlkbahar/Yaz	21	0,08	0,35	1,00	0,329
	Sonbahar/Kış	14	0,00	0,00		
B.cereus	İlkbahar/Yaz	21	305,10	571,55	2,32	0,031
	Sonbahar/Kış	14	15,57	25,67		
LAB	İlkbahar/Yaz	21	330,90	632,46	1,84	0,079
	Sonbahar/Kış	14	71,07	109,72		

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Et, kimyasal yapısı ve içerik bakımından hayvansal ürünler içerisinde karmaşık bir gıda maddesidir. Gerek üretiminin kolay, lezzetli, biyolojik değerliliğinin yüksek olması, gerekse de içerdiği B kompleks vitaminleri, Fe, P, Ca gibi çeşitli mineral maddeleri, eksojen amino asitler gibi besin öğelerinin yeterli ve dengeli oranda olması nedeniyle insan beslenmesinde temel bir gıda olma özelliğini taşımaktadır (Başkaya et al.,2004).

Et işlenmemiş olarak tüketildiği gibi, çeşitli lezzet ve aroma özellikleri kazandırmak ve dayanıklılığını arttırmak amacıyla çeşitli teknolojik işlemlere tabi tutularak farklı et ürünleri de üretilmektedir.

Bu çalışmada incelenen sucuk, sosis ve salam örnekleri paketli-açık, markalı-markasız oluşlarına ve sezona göre sınıflandırılmışlardır. Kıyma örnekleri ise paketli-hazır ürünler ve açık kıyma olarak sınıflandırılmıştır.

Bu çalışmada, sucuk, sosis, salam ve kıyma örnekleri Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı (TAMB), Koliform Sayımı, *Staphylococcus aureus* Sayımı, *Clostridium perfringens* Sayımı, Maya-Küf Sayımı, *Bacillus cereus* sayımı, Laktik Asit Bakterisi Sayımı ile *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* belirlenmesi için analizlere tabi tutulmuştur. Yürütülen çalışmalar neticesinde elde edilen ortalama sonuçlar, et ürününün tipine göre aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Çizelge 5.1. Et ürünlerine göre elde edilen ortalama değerler

		Sosis	Salam	Sucuk	Kıyma
<i>Analiz/ Metot</i>	<i>Değer</i>				
TAMB	kob/g	5,3x10 ⁵	9,9x10 ⁴	2,8x10 ⁷	5,8x10 ⁷
Koliform	EMS/g	30	L.A	71	126
<i>S.aureus</i>	kob/g	3,9x10 ²	2,2x10 ²	1,3x10 ³	9,0x10 ²
<i>C.perfringens</i>	kob/g	L.A	L.A	L.A	L.A
Maya-Küf	kob/g	4,4x10 ¹	1,4x10 ²	4,7x10 ⁴	4,6x10 ³
<i>B. cereus</i>	kob/g	9,8x10 ¹	7,7x10 ¹	1,7x10 ³	1,2x10 ³
LAB	kob/g	1,3x10 ²	6,5x10 ²	1,0x10 ⁸	5,0x10 ²
<i>Salmonella</i> spp.	Var/yok	Var-2	Var-2	Var-1	Var-2
<i>Listeria</i> spp.*	Var/yok	Yok	Var-1	Var-1	Var-1

**Listeria monocytogenes* dışındaki diğer *Listeria* spp. de bu tabloda belirtilmektedir.

5.1.Sucuk Örneklerinin Analiz Sonuçları

İncelenen sucuk örneklerini TAMB sayısı, Çon et al, (2002) ve Erdoğan et al.'ın bulgularıyla paraleldir. Paketli sucuk örneklerinin, bu açıdan açık örneklerden; markalı ürünlerin, markasız ürünlerden farklı olmadığı görülmüştür.

Buna rağmen farklı bir gruplama yaptığımızda, TAMB sayımı sonucunda, hem açık hem de markasız olan örneklerde ortalama sayının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu grupta bulunan değerler (Ortalama 5,5 x10⁶ kob/g) genelde Çon et al (2002) nin olgunlaşmış bir sucukta bulunabileceğini belirttikleri sayı olan 10⁶-10⁷ 'den yüksektir. Paketli-Markalı, Paketli- Markasız, Açık-Markalı

ürünlerde ise bu sınırlara yakın ve diğer araştırmacıların (Başkaya et al.,2004; Çon et al., 2002; Özkalp et al.,2006) bulgularıyla uyumlu değerler elde edilmiştir.

Maya küf sayımı, tüm örnekler için ortalama $4,7 \times 10^4$ kob/g olarak belirlenmiştir. Bu bulgu Çon et al., bulguları ile benzerlik göstermektedir fakat, Özkalp et al. değerlerinden ($1,0 \times 10^1$ - $1,1 \times 10^1$ kob/g) belirgin bir şekilde yüksektir. Markasız ürünlerde bu oran, markalı ürünlerin Maya-Küf sayısının ortalamasından yaklaşık iki kat daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlıdır. Bu grup mikroorganizmalar daha düşük su aktivitesi ve pH değerinde çoğalabilmeleri nedeniyle, sucuk gibi fermente ve yarı kuru gıdaların yüzeyinde gelişerek istenilmeyen değişimlere yol açabilmektedirler. Prestijli markalara ait ürünlerde bu oranın daha düşük olması bu firmaların üretimde hijyenik kurallara daha fazla dikkat etmesi ile açıklanabilir (Çizelge 4.13).

Staphylococcus aureus sayımları sonucunda tüm örnekler için ortalama değer $1,3 \times 10^3$ kob/g olarak bulunmuştur. Bu bulgu Çon et al'ın (2002) değerlerinden daha düşük olmakla birlikte Özkalp et al (2006) yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri değere ($2,6 \times 10^3$ - $2,7 \times 10^2$ kob/g) yakın bulunmuştur. Sucukta *S.aureus* sayımı yönünden markalı ve markasız ürünler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Çizelge 4.13)

43 örneğin sadece ikisinde muhtemel *Clostridium perfringens* izole edilebilmiştir. Bunlardan birinde $1,2 \times 10^1$ kob/g, diğerinde

ise $1,4 \times 10^1$ kob/g değerleri elde edilmiştir. on et al. da inceledikleri sucuk rneklarinin % 93,33'nde *C. perfringens* tespit edememişlerdir.

Bacillus cereus sayım sonuçları, tüm sucuk örneklere için ortalama $1,7 \times 10^3$ kob/g oranında bulunmuştur. *Bacillus cereus* sayımı, mikrobiyal yükün belirlenmesine yardımcı olmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. *Bacillus cereus* için minimal enfeksiyon dozu 10^6 olduğundan, elde ettiğimiz değerler bu düzeyin altında kalmaktadır. Bu nedenle aldığımız rnekların hiç birinde, *Bacillus cereus* açısından bir gıda zehirlenmesi riski bulunmamaktadır. *Bacillus cereus* sayım sonuçları açısından markalı-markasız, paketli-açık sucuklar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (izelge 4.13; 4.16).

Salmonella spp. için yapılan analiz sonucunda sadece açık ve markasız sucuklardan birinde *Salmonella* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Salmonella* spp. gıda patojenleri içerisinde insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturan önemli bir patojendir ve sucukta Türk Gıda Kodeksine göre 25 gr'da hiç bulunmaması gerekmektedir. Bu konuda kodekste herhangi bir değişim söz konusu değildir. Bu durum, söz konusu sucuğun üreticisi olan firmanın gıda hijyeni konusundaki yetersizliğini göstermektedir. *Salmonella* spp.'nin sucuk hamuruna bulaşma gerçekleşmiş olsa dahi, *Enterobacteriaceae* familyasının diğer yeleri gibi fermentasyon süreci boyunca inaktive olması beklenir. Yine de *Salmonella* spp. kontaminasyonunun olgunlaşmış son üründe belirlenmesinin çeşitli nedenleri olabilmektedir. Sürecin başlangıcında, su aktivitesinin, pH değerinin ve olgunlaşma sıcaklığının yüksek olması, fermente edilebilir karbonhidrat miktarının düşük olması, taze sucuk/

sis karışımında laktik asit bakterilerinin yetersiz olması, ve kürlenme işlemi sırasında yetersiz düzeyde nitrit kullanılması bu nedenler arasında sayılabilir. Ayrıca insan kaynaklı kontaminasyon olasılığı da mevcuttur. Ürünün laktik asit bakterisi sayımı sonucunda elde edilen değer fermente bir ürünü için yüksek bir değer değildir. Ayrıca bu üründe Koliform ve *S. aureus* sayım sonuçlarının da yüksek olması dikkat çekicidir. Aydın ilinde yapılan çalışmada (Kök et al.,2007) 100 örnekten 5'inde *Salmonella* spp. izole edilmiştir. Bu oran bu çalışmada yaklaşık % 2,5 bulunmuştur.

Koliform sayım ortalaması sucuk için 71 EMS/g bulunmuştur. Açık ve markasız satılan “kasap sucuğu” örneklerinin üçünde (Foça, Alsancak ve Bornova 2), *E.coli* izole ve identifiye edilmiştir. Bu ürünlerden biri *Salmonella* spp. izolasyonunun yapıldığı üründür. 2001 yılı Gıda Kodeksi mikrobiyolojik kriterlerine göre, et ürünleri içerisinde ısıtılmış ürünlerde hiç *E.coli* bulunmamalı, ısıtılmamış ürünlerde ise 5 örneğin birinde en fazla 1×10^2 kob/g düzeyinde görülmelidir. Ayrıca hiçbir şekilde *E.coli* O157:H7 bulunmamalıdır.

Yeni kriterler fermente et ürünlerini (sucuk), ısıtılmış görmemiş et ürünlerinden ayırmaktadır. Buna göre, sucukta 25 gr. örnekte *E.coli* O157:H7 bulunmamalıdır, bunun dışında bir kriter belirlenmemiştir (Anonymous,2009).

Et ve et ürünleri *Listeria monocytogenes* ile üretimin değişik aşamalarında kontamine olmaktadır. Yapılan bir çok araştırmada *Listeria* spp. ile kontaminasyonda sucuğun hammaddesi olan kıymanın önemli rol

oynadığı belirtilmiştir. Kontaminasyon mezbahada hayvanların dışkıları, derileri ve ayakları, ayrıca işletmede çalışan personelin elleri, elbiseleri ve kullandıkları aletler aracılığıyla gerçekleşebilmektedir. *Listeria monocytogenes*'in et ürünlerinde canlı kalabilmesi ve çoğalması için muhafaza sıcaklığı uygunsuz ve kullanılan koruyucu katkı maddeleri ile mikroflora aktivitesinin yetersiz olması gerekmektedir. Sırıkan et al, (2006) sucuk içerisinde, fermentasyon ile kurutma süreci boyunca *L.monocytogenes* sayısında artış olmadığını bildirmiştir. Yine de pastörize edilmeyen sucuklarda, sucuk hamurunda 10^3 kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* bulunması durumunda, bu mikroorganizmaların canlılığını koruyabilecekleri bildirilmiştir (Sırıkan et al., 2006). Bu çalışmada *Listeria monocytogenes* için pozitif bulunan ürün açık ve markasız bir “kasap sucuğu” dur. Koliform ve *Staphylococcus aureus* için elde edilen değerlerin de kalite standartlarına uygun olmaması, satış ve saklama koşullarının örnekleme sırasında gözlemlenen belirgin yetersizliği bu bulgu ile uyum içerisinde. Çon et al., inceledikleri sucuk örneklerinin %23,3'ünde, Kaya ve Gökalp %18'inde, Sancak et al., ambalajlanmamış sucuk örneklerinin % 45'inde *Listeria* spp. izole etmişlerdir. Sırıkan et al, ise %9 oranında *Listeria* spp. izolasyonu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada 43 ürün içerisinde sadece bir üründe *L.monocytogenes* bulunması (%2,3), diğer araştırmacıların bulgularına göre fark arz etmektedir.

Laktik asit bakterisi sayısı, fermente bir ürün grubu için normal kabul edilen 10^6 - 10^7 kob/g sınırının üzerinde bulunmuştur (Yaman et al.,1998).

5.2.Salam ve Sosis Örneklerinin Analiz Sonuçları

Türkiye’de emülsifiye tip et ürünleri olan sosis ve salam örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda bu ürünlerde yüksek sayıda mikroorganizma bulunabileceği gösterilmiştir

Açık salamlarda TAMB sayısını $1,3 \times 10^4$ kob/g bulan Elmalı ve ark..’nın bu sonucu, $9,9 \times 10^4$ kob/g genel sonucundan ve açık salam örneklerinde elde edilen $1,7 \times 10^5$ kob/g sonucundan biraz daha düşüktür.

34 salam örneğinin 15’inde (%44,1) Maya-Küf sayımı eski Türk Gıda Kodeksi kriterlerinde belirtilen 1×10^2 kob/g sınırının üzerinde bulunmuştur. Bunlardan 2’si paketli markalı ürünler grubu içerisinde (%14,2), 4’ü açık ve markalı ürünler içerisinde (%80), 6’sı markasız ve açık ürünler içerisinde (%75), 3’ü paketli ama markasız ürün grubu içerisinde (%37,5) yer almaktadır. Maya ve küfler geniş bir pH aralığında (pH 2-9), depolama sıcaklığında (10-35 C), ve su aktivitesinde (0.85 ve üzeri) gelişebilmektedirler. Yüksek tuz ve şeker konsantrasyonları tarafından kolaylıkla inhibe edilemedikleri için gıdalarda bozulmalara neden olabilirler. Özellikle hava ile teması fazla olan, yıkama yapılmadan paketlenen, işlem gören gıdalarda, maya –küf sayısı önemli bir kalite kriteridir. Açık ve Paketli salam örnekleri için bu fark; istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Ek Çizelge 4.15). Yeni kriterlerde üst sınır 1×10^3 kob/g olarak belirlenmiştir, örnekler içerisinde bu düzeyde bir ürün bulunmamıştır.

Sadece Açık satılan ürünlerde *Salmonella* spp. ve *Listeria* sp (*Listeria innocua*) izolasyonu yapılması, dikkat çekicidir. Bu sonuçlar,

Apaydın et al.'ın (2003), Türkiye'de yaygın şekilde satış yapan 4 firmaya ait salam örneklerinde elde ettikleri sonuçlardan farklıdır; onlar, *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp. izole etmemişlerdir. Apaydın et al., (2003) ürünlerin satışa açık veya paketli olarak satışa sunulmaları hakkında herhangi bir veri sunmamışlardır. Yine Elmalı et al (2005) Kars'ta farklı marketlerde satılan 30 adet paketlenmiş salam örneğinde Toplam aerobik mezofil bakteri sayısı, koliform sayısı, maya- küf sayısı ve *Staphylococcus aureus* sayısını $2,0 \times 10^2$ 'den düşük bulunmuştur. Sadece *C. perfringens* sayısının 7 örnekte (%23,3) 10^2 - 10^3 kob/g arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise, salam örneklerinde 34 üründen sadece ikisinde muhtemel *C.perfringens* sayısı 10^2 kob/g'in üzerinde çıkmıştır (%5,8) Bu örneklerin her ikisi de markasız- açık ürün grubundadır.

Açık salam örneklerinde, TAMB, Koliform, *S.aureus* ve Maya-Küf sayımları paketli ürünlere göre daha yüksek bulunmuş, paketli salam örneklerinde *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp. izole edilmezken, açık örneklerden ikisinde *Salmonella* spp. izole edilmiş, bir örnekte *Listeria innocua* izole ve tanımlanmıştır. Bu örnek aynı zamanda TAMB ($7,7 \times 10^5$ kob/g) ve *Bacillus cereus* ($1,1 \times 10^3$ kob/g) için elde edilen değerlerin de en yüksek olduğu üründür. Bu üründe ayrıca $1,2 \times 10^2$ kob/g değerinde muhtemel *Clostridium perfringens* sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu üründe insanlar için patojen olan *Listeria monocytogenes* izole edilmemiş, diğer değerler ilgili minimal enfeksiyon dozlarının altında bulunmuştur. Markasız ile markalı ürünleri karşılaştırdığımızda, Koliform sayımı haricinde diğer kriterler yönünden anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

2 *Salmonella* sp. izolasyonunun biri markalı, diğeri markasız ürünler içerisinde yer alırken, *Listeria innocua* markasız bir üründen izole edilmiştir.

34 Salam örneğinin 17'sinde (%50) Laktik asit bakterisi sayım sonuçları tayin limitinin altında bulunmuştur. Fermente et ürünlerinde olduğu gibi, salam ve sosis gibi emülsifiye tip et ürünlerinde de laktik asit bakterilerinin floraya hakim olduğu görüşü yaygındır fakat bu çalışmada bulgular farklıdır. Apaydın et al. nın (2003) Erzurum piyasasından temin ettikleri salamlar ile yaptıkları çalışmada örneklerin %80'inde laktik asit bakterilerinin, tayin limitinin altında bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise, diğör örneklerde elde edilen sonuçlar en az $3,1 \times 10^1$ kob/g ile en fazla $4,7 \times 10^3$ kob/g arasında değişmektedir. Bu en yüksek değör, et katkılı bir üründen elde edilmiştir; laktik asit bakterisi sayımının yüksek çıkması bu katkı ile ilişkili olabilir. Laktik asit bakterisi sayım sonuçlarının düşük olmasının ve bu ürünlerin mikrobiyal açıdan zengin olmamasının nedenleri arasında emülsifiye tip ürünlerin, fermente ürünler olmamaları ve sosis-salam karışımlarına starter kültür katılmaması olabilir.

Sosis örneklerinde, paketli ürünlerin açık ürünlere göre özellikle TAMB, ve Koliform bakteri başta olmak üzere, mikrobiyal analizlerinde kayda değör farklılık görülmüştür. Paketli ve markalı örneklerde TAMB sayısı iki örnek hariç $1,1 \times 10^2$ kob/g ile $9,8 \times 10^2$ kob/g arasında bulunmuştur, sadece iki örnekte bu sayı $4,3 \times 10^4$ ile $2,2 \times 10^5$ kob/g olarak belirlenmiştir (Diğör, Diğör 2). Bu örneklerin son kullanma tarihinin dolmasından çok kısa bir süre önce süpermarketlerde, ilkbahar-yaz

sezonunda, indirimli olarak satıldıkları not edilmiştir. Bu iki örnekte Maya-Küf sayısı sırayla $1,1 \times 10^3$ kob/g ile $3,2 \times 10^2$ kob/g, *S.aureus* birinde tayin limitinin altında bulunurken, diğesinde $1,1 \times 10^2$ kob/g bulunmuştur. Yine de bu grup sosislerin hiçbirinde minimal infeksiyon dozu aşılmamış, *Listeria* spp. ve *Salmonella* spp. gibi gıda patojenleri tespit edilmemiştir.

Hem markalı, hem de açık olarak satışa sunulan 8 üründen, 4 tanesinde (%50) Maya- Küf oranı 10^2 kob/g'ın üzerinde bulunmuştur. Ayrıca, bu gruptaki örneklerden birinde *Salmonella* spp. izole edilmiştir. Bu örnekte Maya-Küf sayısı $3,1 \times 10^2$ kob/g, TAMB sayısı $4,2 \times 10^5$ bulunmuştur.

Markasız açık ürünlerde, örneklerden birinde önemli bir patojen olan *Salmonella* sp. izole edilmiştir. Bu örnekte TAMB sayısı $7,9 \times 10^5$ kob/g, koliform bakteri sayım sonucu 210 EMS/g bulunmuş, *S.aureus* sayısı $3,4 \times 10^3$ kob/g olarak belirlenirken, laktik asit bakterisi sayısı tayin limitinin altında bulunmuştur. Bu üründe, ayrıca *Escherichia coli* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Et ürünlerinde *E. coli* varlığı, üretim ve depolama şartlarında sanitasyon ve hijyen kurallarına dikkat edilmediğini göstermektedir. Hem *Salmonella* sp. hem de *E.coli* izolasyonu barsak kökenli bulaşmaların varlığının altını çizmektedir.

Bu çalışmada genel olarak, salam ve sosis örneklerinde, ambalaj varlığının önemli bir fark yarattığı söylenebilir (Çizelge 4.14;4.15). Ambalajlı ürünlerde özellikle Maya- Küf Sayımı, TAMB sayımı, koliform bakteri sayımı, *E.coli* varlığı açısından daha güvenli sonuçlar

elde edilmiştir. Açıkta satılan ürünlerin bu “hijyen indikatörleri” açısından daha yetersiz olmasının nedeni, ambalaj yokluğunda ürünün özellikle depolama ve satış ortamında çevresel ve insan kaynaklı bulaşmalara daha açık olmasında yatıyor olabilir. Markalı ve markasız ürünler açısından bakıldığında- özellikle sosis örnekleri için- markalı ürünlerle markasız olan ürünler arasında ciddi, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir (Çizelge 4.12;4.13;4.14)

5.3.Kıyma Örneklerinin Analiz Sonuçları

Kıyma örnekleri açık satılan ürünler ve paketli-hazır ürünler olarak sınıflandırılmıştır. Kıyma örneklerinden elde edilen sonuçlarda ambalajlanarak satışa sunulan et ürünlerinin (Paketli-hazır kıyma) mikrobiyolojik kalite açısından diğer ürün grubundan olumlu yönde bir farkı olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.17). Etlerden kıyma hazırlanması süresince, etlerin makinede kıyılması, depolanması, ambalajlanması, ve satışa sunulma aşamalarında değişik derecelerde bakteriyel kontaminasyon gerçekleşmektedir. Yapılan başka bir araştırmada kasap dükkanlarında hazırlanan kıymaların evde hazırlanan kıymalara göre aerobik mezofilik canlı, Enterobakteri ve *Staphylococcus aureus* sayılarının sırasıyla 12,5, 20 ve 1,5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (Başkaya et al., 2003). Bazı örneklerde kıymanın mikrobiyal kalitesinin daha yüksek olması saklama koşullarının ve ambalaj tipinin daha sağlıklı olması ile de ilişkili olmaktadır. Kıymanın hazırlanması sırasında kıyma makinelere iyinin temizlenmemesi ve kişisel hijyen yetersizlikleri kadar depolama ve saklama koşullarının da önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Başkaya et al.'nın İstanbul'da yaptıkları çalışmayla büyük ölçüde uyumlu bulunmuştur. Başkaya et al., (2003) İstanbul'da satışa sunulan kıymalarda TAMB sayısını ortalama $2,7 \times 10^6$ kob/ gr, koliform sayısını ortalama $4,1 \times 10^4$ bulmuştur. Özellikle koliform sayısı bu çalışmada daha düşük bulunmuştur. Maya- Küf sayısı, *Staphylococcus aureus* sayısı ve *Bacillus cereus* sayısı ortalama değerleri yönünden paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bu değerler Başkaya et al.'nın çalışmasında sırasıyla, $5,7 \times 10^4$ kob/g, $1,4 \times 10^5$ kob/g ve $9,5 \times 10^3$ kob/g olarak bulunmuştur. Gönülalan et al.'nın Kayseri'de gerçekleştirdiği çalışmada TAMB, $7,4 \times 10^5$ - $5,3 \times 10^9$ arasında, koliform sayısı, $8,6 \times 10^1$ - $4,5 \times 10^8$ arasında ve koagülaz pozitif *Staphylococcus* sayısı $8,0 \times 10^2$ - $8,2 \times 10^3$ arasında bulunmuştur.

Gökmen ve Alişarlı'nın., 2003 yılında yürüttükleri bir çalışmada, sığır kıymalarının %22'sinde *Listeria monocytogenes*, %3'ünde *Salmonella* spp. izole etmişlerdir.

Hem bu çalışmada hem de Başkaya ve Gönülalan'ın çalışmalarında elde edilen sonuçların bazıları, Türk Gıda Kodeksinde belirtilen sınırlamalara uymamaktadır. 20 kıyma örneğinin 8'i (%40) TAMB sayısı yönünden Gıda kodeksinde belirtilen $5,0 \times 10^6$ üst sınırının üzerinde bulunmuştur. Bu kriter yeni tebliğ içerisinde 1×10^6 olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında 14 örnek TAMB açısından koşullara uygun olmamaktadır. Bu örneklerden ikisi, *S.aureus* için belirtilen $5,0 \times 10^3$ kob/g sınırının üzerinde bulunmuş, iki örnekte *Salmonella* spp. izole edilmiştir. *S.aureus* için yeni üst sınır 1×10^4 kob/g olarak belirlenmiştir. Eski kodeks'te çiğ et ve kıyma için Koliform sayımı, Maya-Küf sayımı,

Bacillus cereus sayımı, *Clostridium perfringens* sayımı ve *Listeria monocytogenes* tayini ile ilgili kriterler bulunmamaktadır. Yeni kriterlere *L.monocytogenes* eklenmiştir.

5.4.Örneklerin Mevsimsel Açıdan Değerlendirilmesi

Sucuk ve salam örneklerinde analiz sonuçları arasında mevsimsel bir farklılık görülmemektedir. Kıymada, Maya-Küf sayısı, İlkbahar- yaz sezonunda daha yüksek bulunmuş, diğer kriterler açısından anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Sosis örneklerinde özellikle, Maya-Küf sayısı, *Bacillus cereus* sayısı ve Koliform sayısında özellikle açık satılan ürünlerin farklılık yarattığı gözlemlenmiştir. Markasız açık ürünlerden RTA1 ve RTA2 kodlu ürünlerde Maya-Küf ve *B.cereus* sayıları diğer ürünlere göre yüksek bulunmuştur. Markalı açık ürünlerde, özellikle PNA1 ve PNA2 kodlu ürünlerde, Maya-Küf sayısı sırasıyla, $3,2 \times 10^3$ kob/g ve $2,9 \times 10^3$ kob/g olarak belirlenmiştir. Bu ürünlerde, *Bacillus cereus* sayım sonuçları da Maya-Küf sayıları ile benzerlik göstermektedir. Açık ürünlerde özellikle ilkbahar-yaz sezonunda farklılık görülmesini nedeni, açık ürünlerin sıcaklık, nem gibi çevresel koşullardaki değişimlere daha açık, mikrobiyal kontaminasyona daha elverişli olması olabilir.

Açık satılan sosis örnekleri haricinde, sucuk ve salam örneklerinin indikatör ve patojen mikroorganizmalar açısından analizlerinde sezona bağlı bir değişim görülmemiştir (Çizelge 4.18; 4.19; 4.20; 4.21;4.22).

Araştırmanın sonuçlarında ürünlerin satışa açık-kapalı sunulmasının, mikrobiyal zenginlik açısından, ürünlerin markalı-

markasız olmasından veya sonbahar-kış/ ilkbahar-yaz sezonunda satışa sunulmasından daha önemli olduğu görülmektedir. Et ve et ürünlerinde üretim aşamaları ile birlikte depolama ve satışın gerçekleştiği koşullar da önem taşımaktadır. Prestijli markaların ürünleri daha hijyenik koşullarda üretilse de, dış etkenlere açık şekilde satılan ve depolanan ürünlerin markalı da olsa markasız da mikrobiyal kirliliğe açık hale geldiği görülmektedir.

Satış yapılan mekanlarda kişisel hijyene, sıcaklık ve nem gibi çevresel etmenlere dikkat edilmemesi, salam gibi dilimlenerek satılan ürünlerin işlemde geçirildiği makine ve bıçakların, yüzeylerin temiz tutulmaması, mikrobiyal kontaminasyon riskini arttırmaktadır.

5.5.Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosin Aktivitesi

Sucuk, sosis, salam ve kıyma örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin aktivitesi Kirby- Bauer Disk Difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Bu metot ile saf olarak izole edilebilen Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri özellikle Gram (+) bakteriler olan *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ve *Enterococcus faecalis* açısından yeterli görülse de, bakteriyosin aktiviteleri düşük bulunmuştur. *E.coli* üzerinde genel antimikrobiyal ve bakteriyosin etkilerinin daha zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin, genel antimikrobiyal inhibisyon aktivitesinden daha düşük olması, özellikle laktik asit ve asetik asit gibi metabolitler sonucu ortam pH'nın düşmesi, H₂O₂ gibi metabolitlerin sentezlenmesinin antimikrobiyal aktivitenin etkinliğinde bakteriyosin aktivitesinden daha

önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Çon ve Gökalp, (2000) ve De Martinis ve Franco (1998), Parada et al (2007)'nin çalışmalarında belirtildiği gibi, laktik asit bakterilerinin inhibisyon yeteneği birden fazla faktörle ilişkilidir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da bunu doğrulamaktadır. Yaman et al.'ın 1998 yılında yürüttükleri çalışmada, ticari Türk sucuk örneklerinden izole ettikleri 100 Laktik asit bakterisinden sadece 6 strainin bakteriyosin ve benzeri metabolitleri üretme özelliğine sahip olduğunu bulmuşlardır (%6). Bu strainlerden üçü *Lactobacillus plantarum* diğer üçü ise *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. Bir başka çalışmada ise, sucuk ve sosislerden izole edilen 39 *Lactobacillus plantarum* suşunun 18'inin bakteriyosin ve benzeri madde ürettiği ama bunların içerisinde kullanılan test suşlarına karşı sadece birinin bakteriyosininin, güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu strainlerin hemen hepsinin genel antimikrobiyal inhibisyon etkisinin bulunduğu gözlemlenmiştir (Toksoy et al.,1999). Bu açıdan elde edilen ve genus düzeyinde tanımlanan 37 izolat ile, tür düzeyinde tanımlanan 29 bakterinin 3'ünde (yaklaşık %4,05) bakteriyosin aktivitesinin tespit edilmesi özellikle Yaman et al., (1998) tarafından yürütülen çalışmayla uyumludur.

PCR için seçilen bakteriyosin üreticisi *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşları özellikle fermente ve fermente olmayan et ürünlerinde mikrofloranın önemli bir parçası olmaları, bakteriyosinlerinin *Listeria* spp. başta olmak üzere çeşitli bakterilere inhibisyon etkisinin güçlü olması nedenleri ile seçilmiştir. Daha önceleri sadece süt ürünlerine özgü olduğu düşünülen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in süt ürünlerinde olduğu kadar sucuk

gibi et ürünlerinde de florada baskın olduğu belgelenmiştir (Rodriguez et al., 1997) Yine de bu çalışmadaki bulgulara göre, et ve et ürünleri için *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp. çok daha önemli türler olmaktadır.

Enterococcus spp. çevrede sıklıkla rastlanan bakteriler arasındadır. Et ürünlerinde mikrofloranın önemli bir parçası oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada araştırılan Enterocin AS-48'in hem *Enterococcus faecalis* hem de *Enterococcus faecium* strainlerinin bazıları tarafından üretildiği bildirilmiştir (Abriouel et al., 2004). Bu çalışmada hem bir *E. faecalis* izolatu (*E. faecalis* 1-kıyma) hem de *E. faecium* izolatında (*E. faecium* 3-sucuk) bakteriyosin genlerinin varlığı gösterilmiştir. Bir bakteriyosinin birden fazla strain tarafından üretilmesi veya bir strainin birden fazla antimikrobiyal peptit üretmesi, doğada sık rastlanan olgulardır (Herranz et al., 2001).

Bakteriyosin olduğu düşünülen antimikrobiyal bileşiklerin inhibisyon aktivitesinin proteolitik enzim muamelesine duyarlı olması ama pH'ın düşürülmesi sonucu ortadan kalkmaması, 100 °C'ye kadar ısıya dayanıklı olmaları, bu antimikrobiyallerin bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyel peptidler olduğunu doğrulamaktadır. Bu özellikler açısından; standart referans suşlar ile bu çalışmada elde edilen izolatlar paralel bulunmuştur. Özellikle nisin ve enterocin AS-48 ısı ve pH değişimlerine oldukça dirençli bulunmuştur; bu durum, Klaenhammer'ın verilerine uymaktadır. Et ürünlerinden elde edilen bakteriyosinlerin özellikle asidik pH'a dirençli olmaları normaldir; çünkü özellikle fermentasyon teknolojisinde et ürününün pH'ı düşmektedir. Bu

çalışmada, bakteriyosinlerin özellikle üretici türlerin yakın ilişkili oldukları bakterilere karşı inhibisyon etkisi gösterdikleri görülmüştür. Bu durum, bakteriyosinler hakkındaki bilgimiz ile uyumludur.

PCR çalışmasının sonucunda bu örnekler doğrulanabilmiştir. PCR, Rodriguez et al (1997) tarafından bakteriyosin çeşitliliğinin belirlenmesi için hızlı ve uygun bir metot olarak tanımlanmasına rağmen, bakteriyosin ve benzeri peptidler ile et ürünlerinde laktik asit bakterilerinin tür ve strain çeşitliliğinin fazla olması, bu metodun bakteriyosin çeşitliliğini belirlemede pratik ve ucuz bir şekilde uygulanabilmesini kısıtlamaktadır.

Ayrıca PCR uygulaması sırasında bakteriyosin etkinliği gözlemlenemeyen bir strainin de (*E. faecalis* a-kıyma) bakteriyosin genlerine sahip olduğu görülmüştür. Bakteriyosin genlerinin varlığı, bu peptitlerin mutlaka etkin bir şekilde ifadesinin gerçekleştiği veya bakteriyosin kaynaklı güçlü bir antimikrobiyal etkinin garantilendiği anlamına gelmemektedir. Bakteriyosinlerin inhibisyon etkisi ve bakteriyosin sentezi birden fazla faktöre bağlı olarak gerçekleşmektedir.

Bakteriyosinler karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir, ve üretici hücrenin biyosentetik ve genetik yapısı üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, bakteriyosin üretme yeteneği, bakterinin hayatta kalabilmesi için vazgeçilmez olmalıdır. Laboratuvar koşullarında, bakteriler seçici ortamda, monokültür olarak tutulmaktadır. Bu durum, rekabetçi floranın olmaması ve stres koşullarının az olması anlamına gelmektedir. Bu nedenle, rekabete yardımcı moleküller sentezlenmeyebilmektedir (Cotter, 2005) Ayrıca, bakteriyosin yapısal

genlerini veya direnç genlerini taşıyan plasmidler dış etkenlerle (sıcaklık, U.V.,) kaybedilebilmektedir; bakteriyosin üretimi kararlı bir özellik değildir.

Kısacası, bakteriyosin sentezi için bakteriyosin ekspresyonunun sağladığı hayatta kalma avantajı, bunun metabolik ve genetik bedeline değmelidir.

Bu çalışmalar sırasında bu olasılıkların göz önünde tutulması gerekmektedir.

Ayrıca, klasik PCR uygulamaları yerine multipleks PCR, hatta DNA microarray metotları araştırmalarda daha hızlı ve bu ürünlerin tür, strain ve metabolit zenginliğine daha uygun sonuçları, -her ne kadar ekonomik olmasalar da- verme eğiliminde yöntemlerdir (Suwanjinda et al., 2007).

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martinez-Canamero, M. and Galvez, A., 2005,** Enterocin AS-48RJ: A Variant of Enterocin AS-48 Chromosomally Encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food., *Systematic and Applied Microbiology*, 64: 4623-46226
- Albano, H., Pinho C., Lente, D., Barbosa, J., Silva, J., Corneiro, L., Magalhaes R., and Hogg, T., 2008,** Evaluation of a Bacteriocin Producing Strain of *Pediococcus acidilactici* as a Biopreservative for Alheira Fermented Meat Sausage., *Food Control*, 20, 8:764-770
- Alves, V.F., Martinez, R.C.R., Lavrador, M.A.S. and De Martinis E.C.P., 2006,** AntiListerial Activitiy of Lactic Acid Bacteria Inoculated on Cooked Ham., *Meat Science*, 74: 623-627
- Anonymous, 2000,** Türk Standartları Enstitüsü, Sucuk Standardı (TS 1070), Ankara, Türkiye
- Anonymous, 2000,** Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği, Resmi Gazete:10.02,2000-23960
- Anonymous, 2001,** Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, Resmi Gazete:17,03,2001-24345

KAYNAKLAR (devam).

- Anonymous**, 2006, Türk Gıda Kodeksi Çiğ Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliği, Resmi Gazete: 07,07,2006/ 26221
- Anonymous**, 2009, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, Resmi Gazete: 06,02,2009/27133
- Apaydın, G., Ceylan, Z.G. ve Kaya, M.**, 2003, Değişik Firmalara Ait Salamların Bazı Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikleri Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences., 27:(2003), 1299-1303
- Aran, N.**, 1988, İstanbul Piyasasında Tüketilen Bazı Hazır Gıdaların Tüketici Sağlığı Yönünden Değerlendirilmesi, Gıda San., 1988, 2:36-42
- Aymerich, M.T, Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I. and Hugas, M.**, 2000, Bacteriocin- producing Lactobacilli in Spanish-style Fermented Sausages., Food Microbiology, (17),33-45
- Başkaya, R., Karaca, T., Sevinç, I., Çakmak, Ö., Yıldız, A. ve Yörük, M.**, 2004, İstanbul'da Satışa Sunulan Kıymaların Histolojik, Mikrobiyolojik ve Serolojik Kalitesi., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15, (1-2):41-46
- Boyacıoğlu, D.**, 2007, Türkiye'de Gıda Güvenliği Araştırmaları, Gıda Güvenliği Dergisi, 1, 3: 22-28

KAYNAKLAR (devam).

- Buyong, N., Kok, J., and Luchansky, J.B.,** 1998, Use of a Genetically Enhanced, Pediocin Producing Starter Culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to contro *L.monocytogenes* in Cheddar Cheese., Journal of Applied and Environmental Microbiology, 64, 4842-4845
- Champomier Verges, M.C., Maguin, E., Mistou, M.Y., Anglade P. and Chich, J.F.,** 2002, Lactic Acid Bacteria and Proteomics: Current Knowledge and Perspectives, Journal of Chromatography (771), 329-342
- Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes I.F, Hernandez, P.E. and Holo, H.,** 1995, Isolation and Characterisation of Pediocin L-50, A New Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a Broad Inhibitory Spectrum., Applied and Environmental Microbiology, (61):7, 2643-2648
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes I.F., Chikindas, M.L.,** 2001, Bacteriocins: Safe Natural Antimicrobials for Food Preservation, International Journal of Food Microbiology, 71, 1-20
- Coderre, P.E., and Somkuti, G.A.,** 1999, Cloning and Expression of the Pediocin Operon in *Streptococcus thermophilus* and Other Lactic Fermentation Bacteria, Current Microbiology, 39, 295-301

KAYNAKLAR (devam).

- Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P.**, 2005, Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food., *Nature Reviews of Microbiology*, 3:777-788
- Çolak, H., Hampikyan, H., Ulusoy, B., and Bingöl, E.B.**, 2007, Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish Style Fermented Sausage (sucuk), *Food Control*, 18, 30-32
- Çon, A.H., Doğu, M., and Gökalg, H.Y.**, 2002, Periodical Determination of Some Microbiological Characteristics of Sucuk Samples Produced at Some Big Meat Plants in the City of Afyon., *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.*, 26, 11-16
- Çon, A.H. and Gökalg, H.Y.**, 2000, Production of Bacteriocin-like Metabolites by Lactic Acid Cultures Isolated from Sucuk Samples., *Meat Science*, 55, (1), 89-96
- Çon, A.H. and Gökalg, H.Y.**, 1999, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri., *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 180-190
- De Martinis, E.C.P. and Franco, D.G.M.**, 1998, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a Pork Product by a *Lactobaccillus sake* Strain., *International Journal of Food Microbiology*, 42, 119-126

KAYNAKLAR (devam).

- De Vuyst, L. and Leroy, F.,** 2007, Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Food Applications., Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13,(2007): 194-199
- Ehrmann, M.A., Remiger, A., Eijsink, V.G.H. and Vogel, R.F.,** 2000, A Gene Cluster Encoding Plantaricin 1,25 and Other Bacteriocin- like Peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW 1,25., Biochimica et Biophysica Acta, 1490, (2000):355-361
- Eijsink V.G., Skeie M., Middelhoven P.H., Brurberg M.B., and Nes I.F.,** (1998) Comparative Studies of Class Iia Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria., Journal of Applied and Environmental Microbiology, 64, (1998): 3275-3281
- Elegado, F.B., Guerra, M.A.R.V., Macayan, R.A., Mendoza, H.A., and Lirazan, M.B.,** 2004, Spectrum of Bacteriocin Activity of *Lactobacillus plantarum* BS and Fingerprinting by RAPD-PCR, International Journal of Food Microbiology, 95, 11-18
- Elmalı, M., Ulukanlı, Z. ve Yaman, H.,** 2005, Kars'da Satışa Sunulan Emülsifiye Tipi Et Ürünlerinin Mikrobiyolojik Kalitesi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2 (1):15-21

KAYNAKLAR (devam).

- Elmalı, M. ve Yaman, H.**, 2005, Microbiological Quality of Raw Meat Balls: Produced and Sold in the Eastern of Turkey, Pakistan Journal of Nutrition 4:197-201
- Erdoğrul, Ö., Çetin Ö., ve Ergün, Ö.**, 2006, Fermente Sucuklardan İzole Edilen *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,
- Erdoğrul, Ö. ve Ergün, Ö.**, 2005, Kahramanmaraş Piyasasında Tüketilen Sucukların Bazı Fiziksel, Kimyasal, Duyusal ve Mikrobiyolojik Özellikleri, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2005, 31(1):55-65
- Erol, İ., Çelik, H., Şireli T., ve Özdemir H.**, 1999, Bakteriyosin Oluşturan Starter Kültürlerin Fermente Türk Sucuklarında *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkisi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 23 (1999): 793-802
- Fregeau Gallagher, N.L., Sailer, M., Niemczura, W.P., Nakashima T.T., Stiles, M.E., and Vederas, J.C.**, 1997, Three Dimensional Structure of Leucocin A in Trifluoroethanol and Dodecylphosphocoline Micelles: Spatial Location of Residues Critical for Biological Activity in Type IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria, Biochemistry, 1997, (36): 15062-15072

KAYNAKLAR (devam).

- Gravesen, A., Warthoe, P., Knochel, S., and Thirstrup, K.,** 2000, Restriction Fragment Differential Display of Pediocin Resistant *L.monocytogenes* 412 Mutants Shows Consistent Overexpression of a Putative Beta- glucoside Specific PTS System., *Microbiology*, 46, (6):1381-1389
- Gökmen, M., ve Alisharlı, M.,** 2003 Van İlinde Tüketime Sunulan Kıymaların Bazı Patojen Bakteriler Yönünden İncelenmesi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14, (1): 27-34
- Gönülalan, Z.,ve Köse, A.,** 2003, Kayseri İlinde Satışa Sunulan Sığır Kıymalarının Mikrobiyolojik Kalitesi., *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi.*, 17, 1: 49-53
- Halkman, A. K.,** 2005, Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara s:135-155, s: 175- 203, s: 205-209, s: 262-268, s: 276-301
- Hampikyan, H., and Uğur, M.,** 2007, The Effect of Nisin on *Listeria monocytogenes* in Turkish Fermented Sausages (Sucuks)., *Meat Science*, 76, (2007): 327-332
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Cintas, L.M,** 2001, *Enterococcus faecium* P21: A Strain Occuring Naturally in Dry- fermented Sausages Producing the Class II Bacteriocins Enterocin A and B., *Food Microbiology* 18:115-131

KAYNAKLAR (devam).

- Holzappel, H.W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth J., and Schillinger, U.,** 2001, Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food Nutrition. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 365-373
- Karaboz, İ.,** 2002, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri Teori ve Uygulamaları. EBİLTEM s: 2-12
- Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., and Kuipers, O.P.,** 2003 , Identification and Characterization of Two Novel Clostridial Bacteriocins; Circularin A, and Closticin 57. Applied and Environmental Microbiology, 69, 1589-1597
- Klaenhammer ,T.R.,** 1993, Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, FEMS Microbiol. Rev.,12: 39-85
- Kıvanç, M., Sert, S., and Hasenekoğlu, I.,** 1992, Production of Aflatoxins, in sausage, salami, sucuk and kavurma. Die Nahrung, 36, 3: 293-298
- Kök, F., Özbey, G., Muz, A.,** 2007, Aydın İlinde Satışa Sunulan Fermente Sucukların Mikrobiyolojik Kalitelerini İncelenmesi, 21, 249-252
- Madigan, M.T., Martinko, J.M** (2006) Brock Biology of Microorganisms, Eleventh Edition, Pearson, Prentice Hall new Jersey s: 923-941

KAYNAKLAR (devam).

- Nes, I.F., and Johnsborg, O.,** 2004, Exploration of Antimicrobial Potential in LAB by Genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, (15): 100-104
- Nielsen, J.W., Dickonson, J.S., and Crouse, J.D.,** 1990, Use of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat., *Journal of Applied and Environmental Microbiology.*, 56, 2142-2145
- Nilsson L., Chen, Y., Chikindas, M.L., Huss, H.H., Gram, L., and Montville, T.J.,** 2000, Carbondioxide and Nisin Act Synergistically on *Listeria monocytogenes.*, *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 66, 769-774
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., and Panyim, S.,** 2003, Isolation of Nisin Producing *Lactococcus lactis* WNC 20 Strain from Nham, a Traditional Thai Fermented Sausage, *International Journal of Food Microbiology* , 81, 137-145
- Ostergaard, A., Embarek, P.K.B., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H., and Gram, L.,** 1998, Characterization of Anti *Listerial* Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Fermented Fish Products., *Food Microbiology*, 15, 223-233

KAYNAKLAR (devam).

- Özkalp, B., Aladağ, M.O., and Çelik, B.,** 2006, The Investigation of Some Microbiologic Characteristics of Branded and Non-Branded Sausages Consumed in Konya, Turkey., Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20, 40: 117-120
- Öztañ, A.,** 2008, Et Bilimi ve Teknolojisi, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Yayınları Kitaplar Serisi:1, s: 362-369, 377-381
- Parada, J.L., Caron C.R., Medeiros P. B.A., and Soccol C.R.,** 2007, Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and Use as Biopreservatives., Brazilian Archives of Biology and Technology, 50, 3:521-542
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R.,** 2007, The Genomics of Lactic Acid Bacteria., Trends in Microbiology 15 (12):1016-1020
- Reviriego, C., Fernanadez, L., Kuipers, P., Kok, J., Rodriguez, J.M.,** 2007, Enhanced Production of Pediocin PA-1 in Wild Nisin and Non-nisin Producing *L.lactis* Strains of Dairy Origin. International Dairy Journal, 17, 5:574-577
- Rodriguez, E., Gaya, P., Nunez, M., and Medina, M.,** 1998, Inhibitory Activity of A Nisin-producing Starter Culture on *Listeria innocua* in Raw Ewes Milk Machengo Cheese., International Journal of Food Microbiology 39,(1998): 129-132

KAYNAKLAR (devam).

- Rodriguez, E., Gonzalez,B., Gaya, P., Nunez, M. and Medina, M.,** 2000, Diversity of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Milk., International Dairy Journal 10 (2000): 7-15
- Rodriguez, J.M, Cintas, L.M, Casaus, P., Martinez, M.I., Suarez, A. and Hernandez, P.E.,** 1997, Detection of Pediocin PA-1 Producing Pediococci by Rapid Molecular Biology Techniques., Food Microbiology, 14, 363-371
- Rodriguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Suarez, A. and Hernandez, P.E.,** 1995, PCR Detection of the Lactocin S Structural Gene in Bacteriocin-producing Lactobacilli from Meat., Applied and Environmental Microbiology, 61, (7): 2802-2805
- Sancak, Y.C., Kayardı, S., Sağun, E., İşleyici, Ö., ve Sancak, H.,** 1996, Van'da Tüketime Sunulan Fermente Türk Sucuklarının Fiziksel, Kimyasal, Mikrobiyolojik ve Organoleptik Niteliklerinin İncelenmesi, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 7, 67-73
- Schillinger, U., and Lücke F.K.,** 1989, Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat, 55, 8: 1901-1906

KAYNAKLAR (devam).

- Schoeman, H., Vivier, M.A., Du, T.M, Dicks, L.M., and Pretorius, I.S.,** 1999, The Development of Bactericidal Yeast Strains by Expressing the *Pediococcus acidilactici* Pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae.*, *Yeast*, 15, 647-656
- Smid, E.J., Enckevort, F.J.H., Wegkamp,A., Boekhorst, J., Molenaar, D., Hugenholtz, J., and Siezen, R.J.,** 2005, Metabolic Models for Rational Improvement of Lactic Acid Bacteria as Cell Factories, 2005, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1326-1331
- Sırıken, B., Pamuk, Ş., Özakin, C., Gedikoğlu S., and Eyigör M.,** 2006, A Note on the Incidences of *Salmonella* spp., *Listeria* spp and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish Sausage., 2006, *Meat Science*, 72, (2006):177-181
- Soyutemiz, E., Çetinkaya, F., Anar, Ş.,** 2001, Yerli Sucuklarımızda Olgunlaşmanın ve Pastörizasyon İşlemi Uygulamanın *L. Monocytogenes* Üzerine Etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27, 1:99-113
- Suwanjinda, D., Earnest, C., and Panbangred, W.,** 2007, Screening of Lactic Acid Bacteria for Bacteriocins by Microbiological and PCR Methods., *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35 (5):364-369

KAYNAKLAR (devam).

- Tekinşen, O.C., Dinçer, B., Kaymaz, Ş., ve Yücel, A., Türk** 1982, Türk Sucuğunun Olgunlaşması Sırasında Mikrobiyal Flora ve Organoleptik Niteliklerindeki Değişimler. A.Ü, Veteriner Fakültesi Dergisi, 29, 111-130
- Toksoy, A., Beyathı, Y. ve Aslım, B.,** 1999, Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen *L. plantarum* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi., Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences., 23 (1999) 533-540
- Valenzuela A.S., Ben Omar N., Abriouel, H., Lopez, R. L., Veljovic, K., Canamero M. M., Topisirovic, M.K.L. and Galvez, A.,** 2008, Virulence Factors, Antibiotic Resistance and Bacteriocins in Enterococci from Artisan Foods of Animal Origin., Food Control 20 (2009):381-385
- Wang, Y., Henz M.E., Gallagher, N.L., Chai, S., Gibbs, A.C., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Wishart, D.S., and Vederas, J.C.,** 1999, Solution Structure of Carnobacteriocin B2 and Implications for Structure–Activity Relationships Among Type IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria., Biochemistry, 1999, (38):15438-15447
- Yaman, A., Gökalp, H.Y., ve Çon, A.H.,** 1998, Some Characteristics of Lactic Acid Bacteria Present in Commercial Sucuk Samples., 49 (4): 387-397.

EKLER**Ek Çizelge 1.** Et Ürünleri İçin Mikrobiyolojik Kriterler (Anonymous,2000)

	m	M
Escherichia coli (cfu/g) n=5 c=0	Bulunmamalı	
Staphylococcus aureus (cfu/g) n=5 c=1	5×10^2	5×10^3
Clostridium perfringens (cfu/g) n=5 c=2	10	10^2
Salmonella (cfu/g) n=5 c=0	25gr'da bulunmamalı	
Maya-küf miktarı (cfu/g) n= 5 c=2	10	10^2

n: Deney numunesi sayısı

c: m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma ihtiva eden kabul edilebilir en fazla deney numunesi sayısı

m: (n-c) sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

M: c sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

Ek Çizelge 2. Et Ürünleri İçin Mikrobiyolojik Kriterler (Anonymous, 2001)

	n	c	m	M
Escherichia coli (kob/g)	5	1	5×10^1	1×10^2
Escherichia coli (kob/g)*	5	0	Bulunmamalı	
E. coli O157: H7(kob/g)	5	0	Bulunmamalı	
Staphylococcus aureus (kob/g)	5	1	5×10^2	5×10^3
Clostridium perfringens (kob/g)	5	2	1×10^1	1×10^2
Salmonella (kob)	5	0	25 gr'da bulunmamalı	
Listeria monocytogenes (kob)	5	0	25 gr'da bulunmamalı	
Maya, küf (kob/g)	5	2	1×10^1	1×10^2

* Isı uygulaması görmüş ürünlerde

n: deney numune sayısı

c: m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma ihtiva eden kabul edilebilir en fazla deney numune sayısını

m: (n-c) sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

M: c sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

Ek Çizelge 3. Et ürünleri için Gıda Kodeksinde yeni Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği içerisinde et ürünleri ile ilgili kriterler (Anonymous, 2009)

3,3,1,2. Fermente (sucuk vb.)	Küf	5	2	10 ²	10 ³
	<i>S. aureus</i> ⁽⁴⁾	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

3,3,2. Isıl işlem görmüş et ürünleri (sosis, salam, kavurma, döner, köfte, jöle işkembe vb.)	Maya ve küf	5	2	10 ²	10 ³
	<i>S. aureus</i> ⁽⁴⁾	5	2	10 ²	10 ³
	<i>C. perfringens</i>	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

3,1,1. Kasaplık hayvanların karkası, çiğ kırmızı et ve kıyma, kanatlı karkası ve çiğ kanatlı eti (soğutulmuş, dondurulmuş) ve dondurulmuş hindi kıyma	TAMB ⁽²⁾	5	2	10 ⁵	10 ⁶
	<i>S. aureus</i> ⁽⁴⁾	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

Ek Çizelge 4.. EMS Çizelgesi; EMS/g (mL). Partiden 1 örnek alınması içindir (Halkman, 2005).

Pozitif tüpler			Sayı ve kategori		%95 güvenlik sınırı		%99 güvenlik sınırı	
1 mL	0,1 mL	0,01 mL	EMS	Kategori	Alt	Üst	Alt	Üst
0	0	0	< 0,30	-	0,00	0,94	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,10	3	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	0	1,10	2	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	1	1,50	3	0,50	3,80	0,20	5,20
1	3	0	1,60	3	0,50	3,80	0,20	5,20
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,40	2	0,40	3,50	0,20	4,60
2	1	0	1,50	1	0,40	3,80	0,20	5,20
2	1	1	2,00	2	0,50	3,80	0,20	5,20
2	2	0	2,10	1	0,50	4,00	0,20	5,60
2	2	1	2,80	3	0,90	9,40	0,50	14,20
2	3	0	2,90	3	0,90	9,40	0,50	14,20
3	0	0	2,30	1	0,50	9,40	0,30	14,20
3	0	1	3,80	2	0,90	10,40	0,50	15,70
3	0	2	6,40	3	1,60	18,10	1,00	25,00
3	1	0	4,30	1	0,90	18,10	0,50	25,00
3	1	1	7,50	1	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12,00	3	3,00	36,00	2,00	44,00
3	2	0	9,30	1	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15,00	1	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	2	21,00	2	3,00	40,00	2,00	56,00
3	2	3	29,00	3	9,00	99,00	5,00	152,00
3	3	0	24,00	1	4,00	99,00	3,00	152,00
3	3	1	46,00	1	9,00	198,0	5,00	283,00
3	3	2	110,00	1	20,00	400,0	10,00	570,00
3	3	3	>110,00					

ÖZGEÇMİŞ

Serra TUNALIGİL 20 Mayıs 1978 yılında İzmir, Türkiye’de dünyaya gelmiştir. Orta ve lise öğrenimini İzmir Özel Türk Lisesinde tamamlamış, 2001 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun olmuştur. 2003 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Temel ve Endüstriyel Ana Bilim Dalında Doktora eğitimine başlamıştır. 2006 yılından bu yana, İzmir Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde görev yapmaktadır.