

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR ETİ RAF ÖMRÜ ÜZERİNE KARANFİL UÇUCU
YAĞI VE NİSİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Vet. Hekim Zeliha KOPLAY
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Çiğdem SEZER**

2012 - KARS

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR ETİ RAF ÖMRÜ ÜZERİNE KARANFİL UÇUCU
YAĞI VE NİSİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Vet. Hekim Zeliha KOPLAY
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Çiğdem SEZER**

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No:2010-VF-027**

2012 – KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİYESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Veteriner Hekim Zeliha KOPLAY tarafından hazırlanmış olan “**Sığır Eti Raf Ömrü Üzerine Karanfil Uçucu Yağı ve Nisinin Etkisinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.01.2012

Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Mustafa ATASEVER

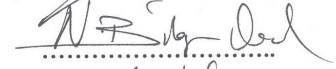
Üye : Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

Üye : Doç. Dr. Leyla VATANSEVER

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nebahat Bilge ORAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Çiğdem SEZER

İmza



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31.01.2012 tarih
Gün ve 10/71.....Sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL
Enstitü Müdürü

Saygıdeğer Hocam

Sayın Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN anısına...

İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	IV
Tablo Dizini.....	VII
Grafik Dizini.....	IX
Şekil Dizini.....	X
Resim Dizini	XI
Önsöz	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Etin Bileşimi ve Beslenmedeki Önemi	3
1.2. Türkiye’de Kırmızı Et Üretimi ve Tüketimi.....	4
1.3. Kırmızı Etin Mikrobiyal Kontaminasyonu.....	7
1.4. Ette Bozulma	9
1.4.1. Mikrobiyal Etkenler	10
1.4.1.1. <i>Salmonella spp.</i>	11
1.4.1.2. <i>Shigella dysenteriae</i>	12
1.4.1.3. <i>Escherichia coli</i>	13
1.4.1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.4.1.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.4.1.6. <i>Bacillus spp.</i>	16
1.4.1.7. Laktik Asit Bakterileri	17
1.4.1.8. <i>Pseudomonas spp.</i>	18
1.4.1.9. <i>Yersinia enterocolitica</i>	18
1.4.2. Oksidatif Etkenler	19
1.5. Et ve Ürünlerinde Kullanılan Muhafaza Yöntemleri	22
1.5.1. Soğutma.....	25
1.5.2. Dondurma	26
1.5.3. Kurutma.....	26
1.5.4. Tütsüleme (Dumanlama)	27
1.5.5. Etin Nitratla İşlenmesi.....	27
1.5.6. Isıl İşlem Uygulama	28
1.5.7. Fermentasyon.....	29
1.5.8. Işınlama (Irradyasyon)	30
1.5.9. Modifiye ve Kontrollü Atmosfer Paketleme (MAP ve KAP)	31

1.5.10. Koruyucu Madde Kullanımı	33
1.5.11. Yeni Teknikler	34
1.5.12. Doğal Antimikrobiyal Maddelerle Koruma.....	35
1.5.12.1. Antimikrobiyal Etkili Bitki ve Baharatlar	36
1.5.12.2. Uçucu Yağlar	42
1.5.12.2.1. Karanfil	46
1.5.12.3. Bakteriyosinler	60
1.5.12.3.1. Nisin.....	66
1.5.13. Antioksidan Etkili Maddelerle Koruma	73
1.5.13.1. Doğal Antioksidanlar.....	75
2. MATERYAL ve METOD	80
2.1. MATERYAL	80
2.1.1. Karanfil.....	80
2.1.2. Nisin	80
2.1.3. Kırmızı Et	80
2.1.4. Referans Suşlar	81
2.1.5. Alet ve Ekipmanlar.....	82
2.2. METOD	82
2.2.1. Karanfil Yağının Hazırlanması	82
2.2.2. Nisinin Hazırlanması.....	83
2.2.3. Karanfil Uçucu Yağının Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	83
2.2.4. Nisinin Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	85
2.2.5. Karanfil Yağı ve Nisinin Soğuk Muhafazada Kırmızı Et Raf Ömrü Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	85
2.2.5.1. Mikrobiyolojik Analizler	87
2.2.5.1.1. Toplam Mezofil Aerob Bakteri (TMAB) Sayımı	89
2.2.5.1.2. Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB) Sayımı	89
2.2.5.1.3. <i>Pseudomonas spp.</i> Sayımı	89
2.2.5.1.4. Laktik Asit Bakterisi (LAB) Sayımı.....	89
2.2.5.1.5. <i>Enterobacteriaceae</i> Sayımı.....	90

2.2.5.1.6. Koliform Grubu Bakteri Sayımı.....	90
2.2.5.1.7. Fekal Koliform Grubu Bakteri Sayımı	90
2.2.5.1.8. Sülfid İndirgeyen Bakteri Sayımı.....	90
2.2.5.1.9. <i>Brochotrix spp.</i> Sayımı	91
2.2.5.1.10. <i>Staphylococcus aureus</i> Sayımı.....	91
2.2.5.2. Kimyasal Analizler	91
2.2.5.2.1. pH Değeri.....	91
2.2.5.2.2. Kokuşma Testi	91
2.2.5.3. Duyusal Analizler.....	92
2.2.5.4. Biyokimyasal Analizler	93
2.2.5.4.1. Malondialdehit (MDA) Analizi.....	93
2.2.6. İstatistiksel Analizler	94
3. BULGULAR.....	95
3.1. Karanfil Yağının Kompozisyonu	95
3.2. Karanfil Yağının Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu	95
3.3. Nisinin Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu	99
3.4. Karanfil Yağı ve Nisinin Soğuk Muhafazada Kırmızı Et Raf Ömrü Üzerindeki Etkilerine Ait Mikrobiyolojik Analiz Bulguları	100
3.5. Kimyasal Analizlere Ait Bulgular.....	130
3.5.1. pH Değeri	130
3.5.2. Kokuşma Testi	134
3.6. Duyusal Analiz Bulguları	135
3.7. Antioksidan Etkinlik	144
3.7.1. MDA Analizi	144
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	148
5. ÖZET.....	169
6. SUMMARY.....	170
7. KAYNAKLAR	172
8. EKLER.....	194
8.1. Ayraçlar ve Çözeltiler	194
9. ÖZGEÇMİŞ	195

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>SİMGELER</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
a_w	Su aktivitesi
CO	Karbonmonoksit
CO₂	Karbondioksit
E	Uluslararası Gıda Katkıları Kodu
Fe	Demir
g	Gram
H	Moleküler Hidrojen
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H₂S	Hidrojen Sülfür
HCl	Hidroklorik Asit
IU	Uluslararası Birim
kg	Kilogram
kGr	Kilo Gray
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
N₂	Azot Gazı
NaCl	Sodyum Klorür
NH₃	Amonyak
O₂	Moleküler Oksijen
°C	Santigrat Derece
ppm	Milyonda Bir Kısım
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

<u>KISALTMALAR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFB₁	Aflatoksin B ₁
AFM	Atomik Güç Mikroskopi
AP	Aktif Paketleme
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Butilated Hydroxyanisole- Butilenmiş Hidroksianisol
BHI	Brain Heart Infusion Broth Besiyeri
BHT	Butilated Hydroxytoluene- Butilenmiş Hidroksitoluen
KAP	Kontrollü Atmosfer Paketleme
kob	Koloni Oluşturan Birim
DNA	Deoksi Ribo Nükleik Asit
DPPH	2, 2- Diphenyl- Picrylhydrazyl
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ESR	Elektron Spin Resonans
FAO	Food and Agriculture Organization- Gıda ve Tarım Organizasyonu
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power- Demir Azaltıcı Antioksidan Güç
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GC	Gas Chromatography- Gaz Kromatografi
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry- Gaz Kromatografi- Kütle Spektrometre
GKGM	Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü
GRAS	Genrally Regarded As Safe- Genel Olarak Kullanımı Güvenli Kabul Edilen
HTST	High Temperature Short Time- Yüksek Sıcaklık Kısa Zaman
LA	Laktik Asit
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LTLT	Low Temperature Long Time- Düşük Sıcaklık Uzun Zaman

MAP	Modifiye Atmosfer Paketleme
MBC	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MDA	Malondialdehit
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTC	Maksimal Tolere Edilen Konsantrasyon
PEF	Pulsed Electric Field- Nabız Elektriksel Alanda Tutma
R·	Yağ Asidi Serbest Radikalleri
RH	Yağ Asidi Esterleri
ROO·	Peroksit Yapısındaki Serbest Radikaller
ROOH	Yağ Asidi Hidroperoksitleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SEM	Elektron Mikroskop Tarama
SH	Sülfidril Grubu
Spp.	Subspecies- Alt Tür
TBA	2- Thiobarbitürik Asit
TBARS	Tiobarbitürik Reaktif Maddeler
TEM	Transmission Electron Microscope- Transmisyon Elektron Mikroskopi
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TMAB	Toplam Mezofil Aerob Bakteri
TSB	Tryptic Soy Broth Besiyeri
TPAB	Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri
UHP	Ultra High Pressure- Ultra Yüksek Basınç
UV	Ultra viyola ışın
VP	Vakum Paketleme
WHO	World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 Yıllar İtibariyle Büyük ve Küçükbaş Hayvan Kesimi, Et Üretimi	5
Tablo 2 Türkiye- Dünya Kırmızı Et Üretiminin Yıllara Göre Değişim Karşılaştırması.....	6
Tablo 3 Gelişmiş Ülkeler ve Türkiye’de Kişi Başına Tüketilen Et Miktarı.....	6
Tablo 4 Türkiye’de Kişi Başına Hayvansal Ürün Tüketimi.....	7
Tablo 5 Bazı Patojen Mikroorganizmalar ve Riskli Gıda Grupları.....	11
Tablo 6 Baharatlar, Şifalı Bitkiler ve Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri	41
Tablo 7 Bazı Uçucu Yağların Baharatlara Göre Lezzet Eşdeğerleri	44
Tablo 8 Karanfil Ekstraktından Tanımlanan Aroma Kimyasalları.....	47
Tablo 9 Gıda Güvenliğini Yükseltmek İçin Engeller (Hurdling) Teknolojisinde Nisin Uygulamaları	69
Tablo 10 Gıda Sanayiinde Kullanılan Antioksidan Katkı Maddeleri ve Kodları.....	77
Tablo 11 Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sentetik Antioksidanlar	77
Tablo 12 Antibakteriyel Etki Denemelerinde Kullanılan Suşlar.....	81
Tablo 13 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar, Besiyerleri ve İnkübasyon Koşulları.....	84
Tablo 14 Çalışmada Kullanılan Deneme Grupları.....	87
Tablo 15 Mikrobiyolojik Analizler ve Bakteri Kültürlerinin İnkübasyon Koşulları	88
Tablo 16 Duyusal Analiz Veri Tablosu.....	92
Tablo 17 Karanfil Yağında Tanımlanan Bileşikler.....	95
Tablo 18 Karanfil Yağının Referans Suşlar Üzerindeki MIC Değerleri.....	99
Tablo 19 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Mezofil Aerob Bakteri (TMAB) Sayıları.....	103
Tablo 20 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB) Sayıları.....	106
Tablo 21 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Fekal Koliform Grubu Bakteri Sayıları.....	109
Tablo 22 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Koliform Grubu Bakteri Sayıları.....	111

Tablo 23 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel <i>Enterobacteriaceae</i> Sayıları	114
Tablo 24 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Laktik Asit Bakterisi (LAB) Sayıları	117
Tablo 25 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki <i>Pseudomonas spp.</i> Sayıları	120
Tablo 26 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki <i>Brochotrix spp.</i> Sayıları.....	123
Tablo 27 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Sülfid İndirgeyen Bakteri Sayıları	126
Tablo 28 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki <i>S. aureus</i> Sayıları	129
Tablo 29 Deneme Gruplarında Kuru Pedlere Emdirilen Solüsyonların pH Değerleri	130
Tablo 30 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki pH Düzeylerine Ait Karşılaştırma Tablosu.....	133
Tablo 31 Kokuşma Test Sonuçlarına Ait Bulgular	134
Tablo 32 Pedle Temas Eden Alt Yüzeyde Et Rengindeki Değişim Bulguları	135
Tablo 33 Pedle Temas Etmeyen Üst Yüzeyde Et Rengindeki Değişim Bulguları ..	136
Tablo 34 Etin Genel Görünümündeki Değişim Bulguları.....	137
Tablo 35 Bozulma Kokusuna Ait Bulgular	140
Tablo 36 Paket İlk Açıldığında Karanfil Yağının Tipik Kokusuna Ait Bulgular....	141
Tablo 37 Karanfil Yağına Ait Tipik Kokunun Kabul Edilebilirlik Düzeyi.....	142
Tablo 38 Kaynatma- Kızartma ve Tat Deneylerine Ait Bulgular	143
Tablo 39 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki MDA Sonuçları	147

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Mezofilik Aerob Bakteri (TMAB) Sayıları.....	102
Grafik 2 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB) Sayıları.....	105
Grafik 3 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Fekal Koliform Grubu Bakteri Sayıları.....	108
Grafik 4 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Koliform Grubu Bakteri Sayıları	110
Grafik 5 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel <i>Enterobacteriaceae</i> Sayıları	113
Grafik 6 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Laktik Asit Bakterisi (LAB) Sayıları	116
Grafik 7 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki <i>Pseudomonas spp.</i> Sayıları.....	119
Grafik 8 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki <i>Brochotrix spp.</i> Sayıları	122
Grafik 9 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Sülfid İndirgeyen Bakteri Sayıları	125
Grafik 10 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki <i>S. aureus</i> Sayıları.....	128
Grafik 11 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki pH Değerleri	132
Grafik 12 MDA Analizi İçin Standart Çözeltiye Ait Kalibrasyon Eğrisi.....	144
Grafik 13 Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki MDA Değerleri.....	146

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 Uçucu Yağların Bazı Bileşiklerinin Kimyasal Yapıları.....	43
Şekil 2 Eugenol'ün Antibakteriyel Aktivitesi ve Etki Şekli.	49

RESİM DİZİNİ

Resim 1 Çalışmada Et Örneklerinin Yerleştirildiği ve Muhafaza Periyodu İçin Hazırlanan Deney Düzenegi.....	86
Resim 2 Çalışmanın 11. Gününe Ait Gruplarının Paket Açılmadan Önceki Görünüşlerinden Örnekler	139

ÖNSÖZ

Yapılan birçok araştırmada dünyadaki gıda kaynaklı hastalıkların ve salgınların büyük bir çoğunluğunun bakteriler tarafından meydana getirildiğinin bildirilmesi, bakteriyel enfeksiyonların öneminden bir şey kaybetmediğini göstermektedir. Bu nedenle, mikroorganizmalarla kolaylıkla kontamine olabilen ve ciddi halk sağlığı problemleri oluşturma potansiyeline sahip patojenlerin üremeleri için çok uygun bir ortam olan etin mikrobiyal kontaminasyonu, üreticiler ve tüketiciler için ciddi bir sorundur.

Birçok gıda ürününün raf ömrü boyunca mikrobiyal bozulmaya karşı korunması gerektiğinden, modern gıda üretim tekniklerinde güvenilir, sağlıklı ve raf ömrü uzun gıdalar üretmek hedeflenmektedir. Bununla beraber, sentetik veya kimyasal koruyucular olmaksızın güvenli ve doğal ürünler için tüketicilerin artan talebi, gıda otoritelerini ve araştırmacılarını, gıdanın iyi nutrisyonel ve organoleptik özelliklerini sürdürürken mikrobiyal kalitesini ve güvenliğini geliştirmek ve hafif koruyucu tekniklerin fizibilitesini değerlendirmek için araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir. Doğal ürünlere olan talep arttıkça, gıdanın üretim aşamalarını kolaylaştıracak, raf ömrünü uzatacak doğal ve etkili koruyucu maddelerin gıda üretiminde kullanılabilirliğine yönelik çalışmaların sayısı da hızla artmaktadır. Son yıllarda baharat ve aromatik bitkiler antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı endüstride ve bilimsel araştırmalarda çok fazla ilgi görmekte, buna paralel olarak da kullanımları yaygınlaşmaktadır. Böylece, ekolojik ve doğal ürünlerin tüketiciler tarafından daha fazla tercih edilmesiyle, aromatik bitkilerin ve bitkisel ekstraktların kullanımı tüm dünyada önemli derecede artmaktadır. İn vitro çalışmalarda şifalı bitki ve baharattan elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkileri ortaya konulsa da gıda ortamındaki etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, bitki uçucu yağı kullanımı ile gıda güvenliği açısından sorun yaratan, ekonomik kayıplara neden olan ve en önemlisi, insan sağlığı açısından büyük risk oluşturan patojen mikroorganizmalara karşı, kimyasal korunma ve tedavi

yollarından başka, daha güvenilir ve tüketiciler tarafından kabul edilebilir sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmamın her aşamasında, en yoğun olduğu zamanlarda bile zaman yaratarak bilgilerimi benimle paylaşan, çalışmamı takip eden, yolumu açan ve Üniversitedeki görevinden ayrıldığı 14.12.2011 tarihine kadar danışmanlığımı yürüten sayın Prof. Dr. Abamüslüm GÜVEN'e, danışmanlığımı üstlenmeden önce de ders aşamasından başlayarak çalışmamın her döneminde yanımda olan, tezimin yürütülmesinde bizzat emeğiyle yardımlarını, desteğini, vaktini ve bilgilerini esirgemeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Çiğdem SEZER'e, hocalarım Doç. Dr. Leyla VATANSEVER, Yrd. Doç. Dr. Nebahat BİLGE ORAL, Yrd. Doç. Dr. Berna DUMAN AYDIN ve Doç. Dr. Murat GÜLMEZ'e,

Çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, Prof. Dr. Mithat ŞAHİN, Prof. Dr. Salih OTLU, Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜVEN, Doç. Dr. Onur ATAKİŞİ'ye, Fen Edebiyat Fakültesinde yürüttüğüm çalışmam sırasında analiz yöntemlerinde yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. İnan KAYA'ya, karanfil yağının kimyasal analizinde yardımcı olan Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atalay SÖKMEN'e,

Laboratuvar çalışmamda yanımda olan Vet. Hek. Sezen YILDIZHAN HARMANKAYA, Öğr. Gör. Dr. Aksem AKSOY'a, Kars'da 4 yıl boyunca kapılarını bana açan ve manevi desteğini hiç esirgemeyen arkadaşım Doç. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU'na ve eşine, çalışmamın istatistiksel analizlerindeki desteğinden dolayı mesai arkadaşım Zir. Yük. Müh. Alamettin BAYAV'a,

Maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Fonu Başkanlığına,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen babam Cemal KOPLAY'a ve annem Saniye KOPLAY'a

TEŞEKKÜR EDERİM.

Bu çalışmamı, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan anneme armağan ediyorum.

1. GİRİŞ

Beslenme ‘büyüme, gelişme ve sağlığın korunması için besinlerin dengeli bir şekilde kullanımı’ olarak ifade edilmektedir. Zihinsel ve bedensel olarak sağlıklı ve başarılı bir toplum oluşturabilmek için yeterli ve dengeli beslenme sağlanabilmelidir (226). İnsanın gerek zihinsel gerekse fiziksel olarak sağlıklı ve dengeli olması için gerekli en önemli unsurlardan birisi, beslenme ihtiyacının nicelik ve nitelik bakımından yeterli derecede tatmin ve temin edilmesidir (49). Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) (103) ise bunu ‘Yeterli, istikrarlı, kaliteli ve uygun fiyattan gıda sağlama’ şeklinde özetlenebilen bir ifadeyle açıklamaktadır. Beslenme, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve yüksek kolesterol gibi birçok hastalığın oluşmasında önemli faktörlerden biridir (33). Bu doğrultuda, gıda güvencesi bütün insanların her zaman aktif ve sağlıklı bir yaşam için gerekli olan besin ihtiyaçlarını ve gıda önceliklerini karşılayabilmek amacıyla yeterli, sağlıklı, güvenilir ve besleyici gıdaya fiziksel ve ekonomik bakımdan erişebilmeleri hakkı olarak açıklanmaktadır (49).

Meyve, sebze, süt ve ürünleri ile et ve ürünleri çabuk bozulabilen gıdalardır. İşletmelerdeki kötü sanitasyon ve hijyen, birçok patojen mikroorganizmanın bu gıdalarda gelişmesine ve bunların tüketilmesi sonucunda da gıda kökenli hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir. Raf ömrü sona ermeden gıdalarda oluşan bu problemler gıda güvenliği açısından tüketiciyi, gıda kaybı açısından da üreticiyi yakından ilgilendirmektedir (23). Hayvan barınaklarında hijyen koşullarının kötü olması, hayvan sağlığına ve refahına yeterince özen gösterilmemesi, soğutma ünitelerinin bulunmaması gibi nedenler, daha kaynağında iken hayvansal gıda ürünlerinin güvenliğini tehdit etmektedir. Bunun yanında nakliye, depolama ve satış noktalarında soğuk zincirin kurulamaması gibi nedenler gıda ürünlerinin gıda işleme tesislerine ve tüketicilere güvenli olarak ulaşmasını engellemektedir (107).

Birçok gıda ürününün raf ömrü boyunca mikrobiyal bozulmaya karşı korunması gerekir. Kimyasal koruyucular olmaksızın güvenli ve doğal ürünler için tüketicilerin artan talebi, gıda otoritelerini ve araştırmacılarını, gıdanın iyi nutrisyonel ve organoleptik özelliklerini sürdürürken, mikrobiyal kalitesini ve

güvenliğini geliştirmek ve hafif koruyucu tekniklerin fizibilitesini değerlendirmek için araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir (85). Nitekim, AB müktesabatına uyum çerçevesinde yapılması beklenen düzenlemeler arasında gıda işletmeleri açısından genel hijyen kuralları, mikrobiyolojik kriterler, soğuk zincirin muhafaza edilmesi, numune alınması ve analiz gibi gerekliliklerin yerine getirilmesi en fazla önem taşıyan düzenlemeler olarak görülmektedir (107).

Hayvansal proteinler uçucu aminoasitleri yeterli ve dengeli bir şekilde içerirler ve bu nedenle mutlaka insan diyetinde bulunmalıdırlar. Günlük protein ihtiyacının yarısının hayvansal proteinlerden karşılanması gereklidir. Kişi başına düşen hayvansal protein tüketimi, ülkelerin gelişmişlik oranını gösteren bir ölçü olarak da değerlendirilmektedir (21). Hayvansal proteinler, içerdikleri amino asitlerden dolayı, insanın büyüme, gelişme ve sağlıklı kalabilmesinin yanı sıra beyin gücünün gelişmesi bakımından da önemlidir. Bitkisel proteinlerde bulunmayan uçucu amino asitler sadece hayvansal proteinlerde yeterli ve dengeli şekilde bulunmaktadır. Dengeli beslenmede bir insanın günde kg vücut ağırlığı için 1 g protein tüketmesi ve bu proteinin en az üçte birinin hayvansal ürünlerden sağlanması gerektiği bildirilmektedir (125).

Aldığımız besinlerin çeşitli fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişikliklere uğraması sonucu kaliteleri ve raf ömürleri etkilenir (206). Etler, psikrotrof aerob mikroorganizmalardan kolayca etkilenmeleri nedeniyle soğuk depoda uzun süre bekletilememektedirler ve bu yüzden depolama süreleri sınırlıdır. Olgunlaşmış et bakteriler için çok uygun bir besiyeri ortamı sağlamaktadır (240). Etin mikrobiyal kontaminasyonu et üreticileri ve tüketiciler için ciddi bir sorundur. Bununla birlikte, ette kalite kaybından sorumlu olan bir diğer faktör ise lipit oksidasyonudur. Bu reaksiyon et ve et ürünlerinin işlenmesi ve depolanması sırasında renk, aroma, tekstür ve besin değeri üzerinde olumsuz etkiler gösterir. Bu yüzden kaliteli ürün gelişimi için bu değişikliklerin kontrol edilmesi gerekir (116). Son yıllarda kendiliğinden oksitlenen maddelerin oksitlenmesini geciktirebilen veya yavaşlatabilen bileşikler olarak görülen antioksidanların gıda muhafazasındaki kullanımları da derinlemesine araştırılmaktadır (126).

1.1. Etin Bileşimi ve Beslenmedeki Önemi

Et, insanların beslenmesinde önemli yeri olan temel bir besin maddesidir (240). Yeterli olgunluğa erişmiş, sağlıklı büyük ve küçükbaş, kanatlı ve su hayvanlarından uygun şekilde elde edilen yenilebilir hayvansal dokulardır (21). Kırmızı et ise, büyükbaş, küçükbaş ve diğer kasaplık hayvanların (domuz, yaban domuzu, at ve tavşan) karkaslarından elde edilen insan tüketimine uygun tüm parçalar olarak ifade edilmektedir (220). Etlerin sınıflandırılmasında sığır, koyun, keçi, domuz, manda, deve, at, kanguru, lama, tavşan ve geyik etleri kırmızı etler grubuna girmektedir (21).

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan etin kimyasal bileşimi su, azotlu maddeler, kas renk maddesi, kas proteinleri, amino asitler, bazlar, yağlar, karbonhidratlar, vitamin, mineral maddeler ve et enzimlerinden oluşmaktadır (150). Usulüne uygun olarak olgunlaştırılan etlerin pH değeri 5,6- 5,8, su aktivitesi (a_w) değeri 0,99 civarındadır (78). İyi kalite ve yüksek oranı ile en önemli protein kaynaklarından biri olan etteki protein oranı, etin yağlı ve yağsız oluşuna göre değişir. Yağlı etlerin doymuş yağ ve kolesterol içeriği daha yüksektir. Etler, başta B 12 vitamini, C ve E grubu vitaminleri ile kalsiyum yanında demir, çinko olmak üzere mineraller açısından da oldukça zengindir. Özellikle ette bulunan demirin, vücutta kullanılabilirliği yüksek olduğundan, demir eksikliği anemisini önlemede önemli bir yeri vardır (105). Vücutta biriken proteinin vücudun kullanabildiği proteine bölümü ile elde edilen biyolojik değer açısından sığır etinin biyolojik değeri oranı 75'dir (240).

Gelişmiş ülkelerde, kişi başına günlük protein tüketiminin 102 g olduğu ve bunun 70 g'ının hayvansal kaynaklı proteinlerden oluştuğu bildirilmektedir. Ülkemizde yaklaşık 84 g olan kişi başına protein tüketiminin ise ancak 17 g'ı hayvansal kaynaklı proteinlerden karşılanmakta, yani tüketilen günlük protein miktarının % 73'ü bitkisel gıdalardan sağlanmaktadır (125). Türkiye'de 2008 yılı verilerine göre kişi başına yıllık 20,8 kg et, 171 lt süt, 157 adet yumurta tüketimi olduğu bildirilmektedir. Türkiye'de yıllar itibarıyla artan üretime rağmen tüketimde arzulan seviyeye ulaşılamadığı anlaşılmaktadır (169).

Hayvansal proteinlerin yeterli düzeyde alınmaması, yeni nesillerin düşük bedensel direnç yanında sınırlı bir entelektüel kapasiteye sahip olmaları sonucunu ortaya çıkaracağından, hayvansal ürün tüketimi büyük bir önem taşımaktadır (49). Hayvansal besinlerdeki protein miktarı; ette % 15- 20, balıkta % 19- 24, yumurtada % 12, sütte % 3- 4, peynirde % 15- 25'dir. Bunun için süt, yumurta, beyaz et ve kırmızı et günlük olarak düzenli tüketilmesi gereken besinlerdir (125).

1.2. Türkiye'de Kırmızı Et Üretimi ve Tüketimi

Hayvancılık, insan beslenmesinde vazgeçilmeyen çeşitli besin maddelerinin üretim kaynağını oluşturma ve insanların dengeli beslenmesine katkıda bulunma yanında, bitkisel üretim ve sanayi artıkları ile başka türlü değerlendirilemeyen alanları değerlendirme ve istihdam yaratma gibi özelliklere sahip önemli bir üretim sektörüdür (10). Son yıllarda büyük ve küçükbaş hayvan varlıklarımız azalmış; hayvancılıkta, tavukçuluk sektörü hariç, üretimde artış sağlanamamıştır. Hayvancılıkta verimliliğin düşük olmasının en önemli nedeni hayvan varlığımızın önemli bir bölümünün düşük verimli yerli ırklardan oluşması ve hayvanlara, uygun bakım ve besleme koşullarının sağlanamamasıdır (169). Hayvancılığın geliştirilmesi, dengeli ve sağlıklı beslenme için çağımıza ve ülkemiz gerçeklerine uygun modern hayvancılık politikalarının belirlenmesi için oldukça önemlidir (125).

Türkiye'de et üretim istatistikleri konusunda önemli sorunlar bulunmaktadır. Üretime ilişkin veriler Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (GKGM) ve kurban bayramlarında kesilen hayvanların derilerini toplayan Türk Hava Kurumu'ndan alınmaktadır. Yine de bu verilerin dışında kayıt ve denetim dışı adaklık, kurbanlık ve köy kesimlerinin de yapıldığı asıl üretimin daha fazla olduğu belirtilmektedir (10, 225). Tablo 1'de Türkiye'de büyük ve küçükbaş hayvan kesimlerine ait et üretimleri ve karkas ağırlıkları verilmiştir.

Tablo 1: Yıllar İtibariyle Büyük ve Küçükbaş Hayvan Kesimi, Et Üretimi (108).

Yıllar	Büyükbaş Et Üretimi			Küçükbaş Et Üretimi		
	Adet	Ton	Karkas Ağırlığı (kg)	Adet	Ton	Karkas Ağırlığı (kg)
1980	1.917.910	119.350	62,23	6.766.120	84.645	12,51
1985	2.217.241	267.661	120,72	9.302.620	142.945	15,37
1990	2.372.247	327.974	138,25	9.885.517	148.345	15,01
1995	1.859.080	298.545	160,59	6.336.290	116.240	18,35
2000	2.125.101	358.683	168,78	7.277.022	132.532	18,21

Türkiye’de et üretiminde sığırın payı % 23 civarındadır. Bu değer gelişmiş ülkeler için hesaplanan orana yakın olmakla birlikte Dünya et üretiminin yaklaşık % 40’ını, kırmızı et üretiminin de % 55’ini sağlayan domuz eti üretimde yer almamaktadır (106). Türkiye’nin kırmızı et üretim deseni özellikle domuzla dayalı üretim olmadığı için, AB ve Dünya et üretim desenine benzememektedir (10).

Türkiye’nin 1970–2004 yılları arasındaki hayvan varlığında bütün türlerde oldukça önemli sayılabilecek bir azalma dikkati çekmektedir. Bu hızlı düşüşteki üretim azalması, hayvan başına verimlerdeki artış ile karşılanamamaktadır (10). Ayrıca, et ürünlerindeki üretim artışı nüfus artış hızının gerisinde kaldığından, kişi başına kırmızı et ve süt tüketimleri düşüş göstermektedir (169).

Türkiye kişi başına hayvansal üretimi düşük ülkeler arasında yer almaktadır. Ülke üretiminin nüfusun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenmesine yetmediği anlamına gelen bu durumun daha dikkat çekici yanı, kişi başına üretimde uzun yıllar bir artış sağlanamaması, hatta kişi başına hayvansal protein üretiminin son yıllarda azalmasıdır (10). Son yıllarda toplam protein alımında daha az olmak üzere kişi başı hem toplam protein hem de hayvansal protein alımında azalma görülmektedir. Bu durumdaki önemli paylardan biri hayvansal gıda üretimindeki yetersizliktir. Dünyadaki ilerlemenin aksine ülkemiz hayvan varlığında önemli bir gerileme söz konusudur (225). Türkiye’de 1990- 2005 yılları arasında bütün türlerin üretim oranlarında görülen azalmalar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Türkiye- Dünya Kırmızı Et Üretiminin Yıllara Göre Değişim Karşılaştırması (Birim: Ton) (109).

Kırmızı Et Üretimi	Türkiye			Dünya		
	1990	2005	Değişim %	1990	2005	Değişim %
Sığır	360,704	321,681	-10,8	53.363	59.781	12,0
Koyun	304,000	272,000	-10,5	7.017	8.273	17,9
Keçi	66,000	45,000	-31,8	2.651	4.601	73,6
Manda	11,445	1,577	-86,2	2.267	3.117	37,5
Toplam	742,149	640,258	-13,7	65.298	75.772	16,0

Birçok araştırma kişilerin ve toplumların refahına paralel olarak hayvansal yiyeceklere talebin arttığını göstermektedir. Bu konuda, et ilk sırayı işgal etmektedir. Türkiye gıda üretimi açısından Dünya’da ‘kendi kendine yeterli çok az sayıda ülkeden birisi’ olduğu ifadesini sıkça görmek mümkün olsa da, bu kendine yeterlilik kantitatif olarak ortaya çıkmaktadır. Kalitatif olarak beslenmemizde yetersizlik ve dengesizlik söz konusudur (15). Veriler Tablo 3’de gösterilmektedir.

Tablo 3: Gelişmiş Ülkeler ve Türkiye’de Kişi Başına Tüketilen Et Miktarı (108).

	ABD	AB	TÜRKİYE
	Kişi Başı Et Tüketimi (kg)	Kişi Başı Et Tüketimi (kg)	Kişi Başı Et Tüketimi (kg)
Kırmızı Et	71,9	59,9	6,89
Tavuk Eti	44,8	16,1	16,04
Toplam	116,7	76,0	22,94

Ülkemizdeki kişi başına kırmızı et tüketimi oldukça düşüktür. Kırmızı etin fiyatının beyaz ete göre yüksek olması ve tüketicinin alım gücünün oldukça düşük olması nedeniyle tüketici eğilimlerinin kanatlı etine doğru yöneldiği görülmektedir (59). Bu sonuç Tablo 4’de gösterilmektedir.

Tablo 4: Türkiye’de Kişi Başına Hayvansal Ürün Tüketimi (169).

Ürün	Kişi Başına Yıllık Tüketim Miktarı			
	1970		2008	
Kırmızı Et	12,9	15,8	5,6	20,8
Kanatlı Eti	2,9		15,2	

1.3. Kırmızı Etin Mikrobiyal Kontaminasyonu

Gıda güvencesini sağlamanın koşullarından birisi de tüketime sunulan gıdaların gerek hijyenik gerekse besin değeri açısından yeterli kalite düzeyine sahip olmasıdır (49). Toplu Beslenme (Mass catering) gibi günümüzde önemi giderek artan bir sektörde, hizmetten yararlananların sayısının artması ve hizmet basamağındaki herhangi bir noktada oluşabilecek gıda zehirlenmeleri, ölümler, ekonomik kayıplar vb. aksaklıkların yol açabileceği olumsuz sonuçlar sektörün önemini artırmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kalite ve güvenlik açısından gerekli yasal önlemler alınmakta ve konuya bir halk sağlığı konusu olarak yaklaşılmaktadır. Türkiye’de ise halk sağlığında önemli bir konu olarak karşımıza çıkan toplu beslenmede, gerek yasal düzeyde gerekse sektör bazında birçok belirsizlikler ve sorunlar yaşanmaktadır (210). Türkiye’nin hayvansal gıda ürünleri ihracatının önündeki en önemli engel üretim azlığı değil hijyen kalitesinin düşüklüğüdür. Halen AB’ye üyelik koşullarının gerektireceği hijyen kriterleri bir tarafa, şimdiye kadar çıkarılmış yönetmeliklerde öngörülen hijyen kriterleri dahi tam olarak uygulanamamaktadır. Bu eksiklik AB ülkeleri ile olan dış ticaret ilişkilerinde daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır (49). Bu açıdan bakıldığında, ülkemizde mezbahaların, canlı hayvan ve et nakil araçlarının temizlik ve dezenfeksiyonunun yeterince yapılmadığı görülmektedir. Bunların uygun materyalle ve düzenli olarak temizlenmesi ve taşıma işlemine standardizasyon ve tescil getirilmesi gerekmektedir (59).

Gıda maddelerinin taşınması gereken mikrobiyolojik değerler, 2009/6 sayılı Türk Gıda Kodeksi (TGK) Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği’nde tanımlanmıştır (222). Gıdaların mikrobiyolojik kriterler açısından TGK’ne uygunluğu, yıllık kontrol

programları kapsamında kontrol edilmektedir (104). Mevzuata uygun olmayan ürünler için 5996 Sayılı Kanunda öngörülen yaptırımlar uygulanmaktadır.

Sağlık açısından herhangi bir sakınca taşımayan kasaplık hayvandan hijyenik koşullara uyularak elde edilen etin mikroorganizma içermemesi gerekir. Et ürünlerinin dayanıklılık süresi, etin başlangıçtaki bakteri sayısı ile yakından ilişkilidir. Başlangıçtaki mikrobiyal yük fazla ise etin dayanma süresi kısalmır (240).

Et kalitesi ve hijyeni üzerinde en önemli rolü post mortem yolla bakteri bulaşması oynar. Taze etin bakterilerle ilk bulaşma kaynağı ayaklar, deri, işkembe ve barsaklardır. Kesim salonunun zemini, çalışan işçilerin elleri, kıyafetleri, çizmeleri, bıçakları devamlı kontaminasyon kaynağı olarak rol alırlar (21, 240). Etin kontaminasyonu hayvanların taşıma, kesim, derinin yüzülmesi, iç organların çıkarılması, parçalama, kemiklerinden ayırma, yıkama, soğutma ve paketleme aşamalarında primer ve sekonder yolla olmaktadır (78).

Hasta hayvanların kesimiyle veya etlerin hasta personel ile temas etmesiyle ette patojen bakteriler görülebilmektedir. Psikrotrof bakteriler, yıkanmayan ve dezenfekte edilmeyen soğuk depo duvarlarında oldukça çok sayıda bulunabilmektedirler. Hasta hayvandan, dinlendirilmemiş, aç ve sıcakta tutulmuş hayvanlardan elde edilen etlerde ve kanı çabuk olarak akıtılmayan gövdeden elde edilen etlerde bakteriyel bozulma hızı yüksektir (240).

Mikroorganizmalar üremeleri sırasında ette protein, karbonhidrat ve yağları parçalarlar (240). Bozulmanın ilk aşamasında başta glikoz olmak üzere karbonhidratları metabolize ederler. Ortamdaki glikozun bitmesi ile ikinci aşamada enerji kaynağı olarak amino asitleri kullanırlar (78). Açığa çıkan parçalanma ürünleri de kötü koku oluşumuna ve etin bozulmasına neden olurlar (240). Mikrobiyal faaliyet sonucu oluşan peroksitler, hidrojen sülfür (H₂S), amonyak (NH₃), aromatik monoaminler (histamin, tiramin, triptamin, fenilettilamin vb.), indol, biyojenik aminler (kadaverin, putresin vb.) gibi bileşikler et ve ürünlerinde lezzet ve renk bozulmalarına, insanlarda ciddi sağlık sorunlarına neden olurlar (21). Lipaz aktivitesine sahip *Pseudomonas*, *Proteus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* ile lipolizin ileri aşamasında keton oluşumu sonucu yoğunlaşmasına bağlı ransidite ve organoleptik bozukluklar görülür (78). Etlerin yüzeysel bakteriyolojik bozulmasında gittikçe belirgin hal alan yapışkan ve rutubetli bir tabaka oluşur. Et rengi solar ve bazen

yeşilimsi de olabilen kahverengi- gri arası renk alır. Anaerob bozulma olan etin derin kısımlarındaki bozulma ise spor yapabilen Clostridium'lar tarafından oluşturulur. Bu tür bozulmada etin kalın kısımlarında gaz habbeciklerinin oluşması, rengin kirli griye dönüşmesi ve kadavra kokusu oluşumu gözlenir (240).

1.4. Ette Bozulma

Mikrobiyal bozulma, çeşitli mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu gıdada güvenilirliğin azalmasıdır. Bunların arasında, bozulmaya neden olan saprofit mikroorganizmalar ile gıda zehirlenmeleri ve infeksiyonlara neden olan patojen mikroorganizmalar gıda güvenliği açısından önem taşırlar. Gıdalarda bulunan protein, karbonhidrat, mineral, vitamin ve su gibi ögeler bakteri, küf ve mayaların gelişmesi için uygun ortam sağlayan unsurlardır. Mikrobiyal bozulma açısından besin maddeleri kadar gıdanın pH'sı, su aktivitesi, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve inhibitör maddeleri de önem taşımaktadır. Çevresel faktörler açısından gıdanın bulunduğu ortamın nemi, sıcaklığı ve ortamdaki gazlar da mikrobiyal bozulmayı etkileyen unsurlardır (167). Mikroorganizmalar et ve et ürünlerinde başlıca yeşillenme, küflenme, müköz oluşumu (sümüksü hal oluşumu) asitlenme, kokuşma gibi bozulma belirtilerine neden olurlar (139).

Sağlıklı bir hayvanın kas dokusu kesimden önce steril kabul edilmektedir (78). Ette patojenik bakterilerin bulunması, hayvanın kesimden önce bir infeksiyonunun veya kesimden sonra bir kontaminasyonun olduğuna işaret eder. Etlarin yüzeyi bakterilerin, küflerin ve mayaların gelişimi için uygun olmakla birlikte bakteriler küf ve mayalara oranla daha hızlı üreyebilirler. Bu nedenle çiğ etlerde görülen bozulmanın çoğuna bakteriler sebep olmaktadır. Küfler genelde etin yüzeyinin kuru ve bakteriyel gelişme için uygun olmadığı durumlarda ve özellikle et paketlenme endüstrisinde sorun yaratmaktadırlar (167).

Parça etin mikrobiyal yükü elle temasın fazla olması ve depolama koşulları nedeniyle değişebilmektedir. Kıymalarda bozulma hücre suyu dışarı çıktığı ve daha fazla oksijene maruz kaldığı için parça etlere göre daha çabuk gerçekleşmektedir.

Hazırlanırken kontaminasyona maruz kalabilmesi nedeniyle hamburger eti gibi ürünler oldukça yüksek bir mikrobiyal yük içerebilmektedirler (167).

1.4.1. Mikrobiyal Etkenler

Dünyada et tüketimi arttığı için et hijyeni ve güvenliği ile ilgili kaygılar ve zorlukları da artmaktadır. Bu kaygılar gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önem taşıyan, çoğunlukla çiğ ette ve kanatlı etinde *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* ve *Campylobacter* ile yemeye hazır işlenmiş ürünlerde *Listeria monocytogenes* gibi patojenler ve etin biyolojik doğası nedeniyle (78, 203). Ette *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus* ve *Clostridium* bakterileri görülebilmektedir. Mantar türünden en çok *Phycomycetes* sınıfının temsilcileri *Mucracea* familyasından *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium* ve *Fungi imperfecti* familyasından *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma* gibi mikroorganizmalar görülebilmektedir. Küf benzeri mantarlardan en çok *Torulopsis*, *Rhodotorula* ve *Oospora*'lara rastlanmaktadır (240). Derinin yüzülmesi sırasında bu mikroorganizmalar çoğunlukla karkasın yüzeyine bulaşmaktadırlar (78). Soğuk koşullarda mezofil mikroorganizmalar gelişemedikleri için aerob ortamdaki soğuk muhafaza sırasında *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Moraxella*, *Psychrobacter spp.* ve *Enterobacteriaceae*, daha düşük oranda laktik asit bakterileri (LAB), *Brochotrix thermosphacta*, *Carnobacterium spp.*, *Leuconostoc spp.* ve *Pediococcus spp.* predominant florayı oluştururlar (78). Ette bulunabilen anaerob bakterilerden en önemlileri ise *Clostridium* soyuna dahil olanlardır. Obligat anaerob olan bu bakteriler, intra vitam ve intra mortem yolla barsaklardan kan ve lenf yoluyla kaslara gelirler ve uygun ısıda çoğalarak metabolizma ürünlerini ortama yayarlar. Bu bakteriler 15 °C'nin altındaki bir ısıda üreyemezler. Anaerob bakteriler yüzeysel bakteri bulaşmasında önem taşımazlar (240). Tablo 5'de besin zehirlenmesine neden olan bazı mikroorganizmalar ve riskli gıdalar verilmiştir.

Tablo 5: Bazı Patojen Mikroorganizmalar ve Riskli Gıda Grupları (34).

Etken	Riskli Gıdalar
<i>Salmonella</i>	Et, kümes hayvanları, yumurta, süt, peynir, kontamine su
<i>Shigella</i>	Kontamine olmuş yumurtalı salata, sandviç gibi günlük ürünler ve su
<i>S. aureus</i>	Kümes hayvanları, jambon, yumurtalı/patatesli salata, kremalı ürün
<i>Campylobacter</i>	Kümes hayvanları, pastörize edilmemiş süt
<i>C. perfringens</i>	Et, kümes hayvanları, et suyu, Meksika yemekleri
<i>V. parahaemolyticus</i>	Deniz ürünleri
<i>V. cholerae</i>	Su, deniz ürünleri
<i>B. cereus</i>	Pirinç (kusma yapan toksin), sebze ve et (diyare yapan toksin)
<i>Yersinia</i>	Süt, domuz eti
EHEC	Et, çiğ süt, taze besinler
ETEC	Özellikle seyahatte tüketilen salata, ithal peynir, taze günlük ürünler
Norwalk virüs	Deniz ürünleri, salatalar
Rotavirüs	Su, salata, meyve ve sebzeler

1.4.1.1. *Salmonella spp.*

Enterobacteriaceae üyesi ve Gram negatif olan bu bakteriler fakültatif anaerobdurlar, en iyi 6,6- 8,2 pH'da üreyebilirler ve mezofil karakterdedirler. Salmonellalar genellikle 5,8- 47 °C arasında üreyebilmektedirler (111). Dezenfektanlara ve ısı uygulamasına karşı genellikle duyarlıdırlar, fakat asidik çevre şartlarına uyum sağlayabilirler, donmuş muhafazada uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler (78). *Salmonella* evcil ya da yabani birçok hayvanda bulunabilmekte ve hayvandan insana kolayca taşınabilmektedir. Ette, kanatlı hayvan etlerinde, dondurmada, sütte, peynirde, yumurtada *Salmonella*ya rastlanabilmektedir (139). Başlıca kaynağı insan ve hayvan olan *Salmonella*lar, yine insanlarda ateş, kusma, abdominal ağrı, ishal vb. gastro intestinal hastalıklara ve septisemiye neden olabilmektedirler. Bu cinsin bazı üyeleri gıda ile alınması sonucu gıda zehirlenmesi yapabilmektedirler (111). Minimal infeksiyon dozu 10^5 - 10^6 kob/gr olmakla birlikte serotipin virulensine, bireysel savunma mekanizmasına ve gıdanın kompozisyonuna

bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Peynir, çikolata, salam gibi gıdalardaki yüksek oranda yağ içeriği etkenin mide asidine karşı korunmasını sağlayarak infektif dozun düşük olmasına neden olurlar (78).

Gıda endüstrisinde soğutma prosesinin yavaş ve uzun olması, yetersiz ısı işlem (özellikle hayvansal orijinli gıdaların iyi pişirilmeden tüketilmesi), proses aşamalarında kontamine olmuş çiğ gıdalarla pişmiş gıdaların teması Salmonellanın gıdalarda çoğalma nedenleridir. Sektör çalışanları da yetersiz kişisel temizlik ve hijyen veya hastalık belirtisi göstermeden taşıyıcı olarak bulaşmada rol oynayabilmektedirler (139). Hayvansal gıdalar arasında başta kontamine kanatlı hayvan etleri, yumurta ve bunlardan yapılan ürünler, kırmızı et ve ürünleri, kontamine süt, pastacılık ürünleri, krema, dondurma, soslar ve kabuklu deniz ürünleri en önemli infeksiyon kaynaklarıdır (78).

1.4.1.2. *Shigella dysenteriae*

Salmonella ve Escherichia gibi *Enterobacteriaceae* familyasına dahildir. Shigellalar hareketsiz, Gram negatif, fakültatif anaerob, sporsuz, çubuk bakterilerdir (111). Tipik mezofil karakterdedirler, 10- 45 °C arasında ve 5- 9 pH aralığında üreyebilirler. İyonize ışığa karşı duyarlıdırlar ve küçük dozlarda gama ışınlarıyla inaktive olabilirler. Primer hedef bölgesi kolon epitelyum hücrelerine penetre olarak burada ısıya duyarlı endotoksin üretirler. Shigella bağırsak kanalı dışında toksin oluşturmadığından hastalığın oluşumu için canlı bakterilerin alınması gereklidir (78). Oksidaz negatif özellik gösterirler. pH 4,5'in altında ve 55 °C de 1 saatlik ısı uygulaması ile ölürlür. Shigella'nın normal olarak yerleştiği yer insanların barsak sistemidir ve insanlar bu bakterilerin tek konakçısı olarak kabul edilmektedir. Çünkü diğer çiftlik hayvanlarında görülmezler. Kontamine gıda maddelerinde ve suda bulunurlar. Kontaminasyon özellikle sıcak ülkelerde gıdaların ve suların insan dışkısı ile kirlenmesi sonucunda ortaya çıkar. İnsandan insana bulaştığı, gıdalarla da taşınabildiği ancak gıdaların bu bakterilerin çoğalmasına olanak tanımadığı, sadece vektör olarak rol aldığı kesin olarak bilinmektedir. O nedenle de gıda kaynaklı infeksiyonlara dahil edilmezler (168). Zayıf kişisel hijyen, aracı gıdalar arasında

deniz ürünleri, meyve, sebze, kanatlı ürünleri, salatalar gıda kaynaklı shigellosisde önemli faktörlerdir (111). Bazı Shigella türlerinin un, pastörize süt, yumurta gibi gıdalarda oda sıcaklığında uzun süre yaşayabildiği gözlemlenmiştir. Bazı donmuş gıdalarda da uzun süre yaşayabildiği rapor edilse de pratikte işlenmiş gıdalarda izole edilmesine çok az rastlanmaktadır (139).

Mueller Hinton (MH) agar ve MH broth'da bir çalışmada, karanfilin % 1 (w/v) konsantrasyonda *S. sonnei*, *S. flexneri* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (26).

1.4.1.3. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae familyasında yer alan bu bakteri Gram negatif, çubuk formunda, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve fakültatif anerob özelliktedir (111). Optimum üremesi 37 °C'de olsa da 7- 45 °C arasında üreyebilirler. Sıcak uygulamasına direnç göstermezler, fakat uzun süre soğuk ve donmuş muhafazada canlılığını koruyabilirler. *E. coli* suşlarının çoğu normal bağırsak florasında apatojen olarak bulunmalarına rağmen immun sistemi baskılanmış konaklarda veya bakterinin gastrointestinal bariyeri aşması halinde bu suşlar da enfeksiyona neden olabilirler. Hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendrom nedeni olarak enterohemorajik *E. coli* O157:H7 serotipini içeren grubun virulensi çok yüksek ve minimal enfeksiyon dozu çok düşüktür (10- 100 kob) ve başta asit olmak üzere birçok iç ve dış faktöre karşı dirençlidir (78). İlk defa 1982 yılında kontamine olmuş hamburger kaynaklı, şiddetli kanlı diyare salgınında bir hastalık sebebi olarak tanımlanan *E. coli* O157:H7 et, süt, toprak, su ve bitkisel ürünlere, dolayısıyla her yere bulaşabilmektedir. Enfeksiyon dozu 10 hücreye kadar düşebilen etken ile pastörize edilmemiş sütlerle, dışkı ile kontamine olmuş sularda yüzmek veya bu suları içmekle enfeksiyon görülebilmektedir (7). *E. coli*'nin başlıca kaynağı dışkıları olmakla birlikte sebze, salata ve yapımında kullanılan yeşil sebzelerin, tarımsal alanların ya da suyun kontaminasyonunda, organik gübre olarak hayvan atıklarının kullanımı veya çapraz kontaminasyonlar bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Organik veya organik olmayan tarımda patojenlerle tarımsal ürünün, toprağın ve yüzey sularının muhtemel

kontaminasyonu (özellikle *E. coli* O157:H7) ile ilgili kaygılar giderek artmaktadır (78, 139, 146). Herhangi bir örnekte *E. coli*'ye ve/veya fekal koliform bakterilere rastlanması oraya doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının ve yine bağırsak kökenli *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenlerin de olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında *E. coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmezken, bazı gıdalarda belirli sayıda koliform bakteri bulunmasına izin verilebilmektedir (168).

Çeşitli baharatların ekstraktları ve yağları disk difüzyon metodunda *E. coli*'ye karşı hardal > karanfil > tarçın > sarımsak > zencefil > nane sırasına göre inhibitör etkilere sahiptirler (201).

1.4.1.4. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes Gram pozitif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob ve psikrotrof karakterde bir bakteridir (111). *L. monocytogenes* psikrotrof özelliği ile 0 °C ile 45 °C aralığındaki muhafaza sıcaklığında, % 10 tuz konsantrasyonunda ve 4,3-9,6 pH aralığında üreyebilmektedir (78). İnsanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan en önemli gıda kaynaklı patojenlerden biridir. Gıda kaynaklarının güvenliğinde önemli bir tehdit olmaya devam etmektedir. Gıdaların ve yemeye hazır gıdaların birçoğundan izole edilen *L. monocytogenes*'in buzdolabı sıcaklığında gelişebilmesi ve zor çevre şartlarında canlılığını sürdürebilme kapasitesi nedeniyle, kontrolü bir halk sağlığı sorunu olmuştur (144, 148). Gıdada, *L. monocytogenes*'e *Salmonella* gibi sıfır tolerans verilmektedir (139).

Toprakta, suda, sebzelerde ve dışkıda bulunabilirler. Çürüyen sebzeler, lağım, silaj, mezbaaha artıkları, taze dondurulmuş kanatlı etleri, taze ve işlenmiş et ürünleri, çiğ süt, özellikle yumuşak peynirler gibi örneklerde *Listeria*'ya rastlanmıştır. *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdalardan kaynaklanan listeriozis vakalarına oldukça sık rastlanmaktadır (7, 239). Pastörize edilmemiş süttten yapılan yumuşak peynirlerin yanı sıra pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olması nedeniyle pastörize sütlerde de problem olabilmektedir (139). İmmun sistemi baskılanmış bireylerde, yeni doğanlarda, küçük çocuklar ve yaşlılarda septisemi, meningitis,

meningoensefalitis, konjunktivit ve pneumoniden hamile kadınlarda düşüklere kadar değişen bir seyir izleyebilmekte ve ölümlere neden olabilmektedir. Gıda ve hayvandan insana, insektlerden insana, insandan insana, bitki ve topraktan insana gibi birçok yolla insana geçebilmektedir. Daha çok laboratuvar çalışanları, hayvan bakıcıları ve veteriner hekimlerde rastlanan göz ve deri yoluyla direkt olarak bulaşma da görülebilmektedir (78).

1.4.1.5. *Staphylococcus aureus*

Mezofil özellikte olsa da 6- 48 °C arasında, 4- 10 aralığındaki pH değerlerinde üreyebilirler, 10- 46 °C arasındaki sıcaklık ve 5,5- 6,6 arasında pH değerlerinde de toksin üretebilirler. Ozmotolerant olan *S. aureus*, düşük a_w değerlerinde üreyebilen en önemli patojenik bakterilerden birisidir. Donmaya karşı dayanıklı olan *S. aureus* ısı uygulaması ile inaktive edilebilmektedir, fakat enterotoksinleri yüksek ısıya (100 °C'de 30 dakika) dirençlidir. Bu açıdan ısı uygulanan ürünler dahi enterotoksin açısından gıda zehirlenmesi riski taşımaktadırlar (78). Baird-Parker agarda *S. aureus*'un sayısı 10^6 /gr'dan fazla olduğunda insan için tehlikeli olan toksin konsantrasyonunu oluşturabilmektedir. Et, bu bakteriden tamamen arınmış olmasa da konsantrasyonunun minimum infeksiyon dozuna erişmemiş olması gerekir (240). Gıda kaynaklı zehirlenmelerin en yaygın olanlarından birisidir. Diğer gıda kaynaklı hastalıklardan farklı olarak *Staphylococcus* zehirlenmelerinde toksin alındıktan sonra belirtilerin başlama süresi oldukça kısadır. *S. aureus* normalde insanların burun ve boğazlarında, dolayısıyla da el ve saçlarında bulunabilmektedir. Bu nedenle elle hazırlanan gıdaların kontamine olması oldukça kolay olabilmektedir (139).

S. aureus daha çok et, tavuk, balık ve bunların ürünleri, süt ve süt ürünleri gibi proteinli gıdalar, kremalı soslar, salatalar, pudingler, kremalı pasta ürünleri gibi gıdalarda bulunabilmektedirler. Çiğ gıdalarda diğer mikroorganizmalarla yarışamadıkları için genelde *Staphylococcus* zehirlenmelerine fazla rastlanmaz, fakat pişme sırasında diğer mikroorganizmalar öldüğünde yarış *Staphylococcus* lehine dönebilmektedir. Depo sıcaklığından en fazla etkilenebilen mikroorganizmalardan

biri olan *S. aureus* 1- 5 °C gibi sıcaklıklarda büyüyemez. *S. aureus* nitrite karşı oldukça dayanıklı olduğu için salam, sosis gibi koruyucu olarak nitrit ilave edilmiş ürünlerde de sorun yaratabilmektedir (139).

Yapılan bir çalışmada, *S. aureus* üzerinde disk difüzyon metodu ile hardal > karanfil > tarçın > zencefil > sarımsak > nane şeklinde sıralanan inhibitör etkinliği kuyu metodunda karanfil > tarçın > hardal > zencefil > sarımsak > nane şeklinde sıralanmaktadır (201).

1.4.1.6. *Bacillus spp.*

Bacillus'lar Gram pozitif, endospor oluşturan, aerob bakterilerdir ve çoğunlukla mezofil olsalar da minimum 4- 5 °C'de, maksimum 48- 50 °C'de, 4,9- 9,3 pH aralığında üreyebilirler (111). *B. subtilis* subtilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılırlar, amiloz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalarlar. Bununla birlikte *B. cereus*'un bazı suşları ise gıda zehirlenmesine neden olmaktadır (7). *Bacillus* soyunda bulunan bakteriler başta toprak olmak üzere değişik çevresel şartlarda yaygın olarak bulunabilen saprofitlerdir. Endosporlarla ısı, soğuk, tuz vb. olumsuz şartlara oldukça dirençlidirler. Toprakta bulunmaları nedeniyle bitkisel gıdaları kontamine etseler de et, süt, yumurta gibi ürünlerde sıklıkla bulunabilmektedirler (78). Süt ve etin yanında, baharatlarda, kuru gıdalarda, tahıllarda özellikle pirinçte, patatesten, pudinglerde, çorbalarda, soslarda ve makarnalı yemeklerde de bulunabilmektedir. Problemler genel olarak, servis öncesi sıcaklığın düşük olması veya soğutma zamanının uzun olmasından kaynaklanmaktadır. Hastalık toksin kaynaklı olduğundan bir insandan diğerine bulaşma görülmez (139).

Disk difüzyon analizi ile değerlendirilen farklı baharat ekstraktlarının *B. cereus*'a karşı inhibitör aktiviteleri karanfil > hardal > tarçın > sarımsak > zencefil > nane olarak sıralanmaktadır (201). Başka bir kaynakta ise gıda kaynaklı patojen olan *B. cereus*'un gelişimi üzerine en etkili yağın, tarçın uçucu yağı olduğu, mercanköşk ve kekik, karanfil, adaçayı ve biberiye'nin ise daha sonra sıralandığı bildirilmiştir

(231). Carrot broth ortamda 100 ml'de 2 µl cinnemaldehyde'in varlığının düşük sıcaklıkla birlikte (≤ 8 °C) *B. cereus* suşunun spor germinasyonunu ve büyümesini inhibe etmek için yeterli olduğu ortaya konmuştur (230).

1.4.1.7. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram pozitif, mikroaerofilik, sporsuz, çubuk, kok veya kokobasil formda, oksidaz ve katalaz negatif, nitrat redüksiyonu negatif, jelatinaz negatiftir. Bazıları 15 °C gibi düşük sıcaklıklarda, bazıları da 45 °C gibi yüksek sıcaklıklarda üreseler de genellikle optimum 30- 40 °C'de ürerler. *Lactobacillus*'lar en iyi hafif asidik ortamlarda pH 4,5- 8,6'da ürerler. Yüksek tuz konsantrasyonunu tolere edebilirler. % 5 CO₂ konsantrasyonu üremelerini stimule eder. Suşlar genelde zayıf lipolitik ve proteolitikdir. Kompleks besin maddelerinin varlığında üreyebilirler. Enerji kaynağı olarak fermente edilebilir şekerleri kullanırlar. Nükleotid, amino asit ve vitaminleri sentezleyemediklerinden dolayı gelişmek için riboflavin, folik asit, pridoksal fosfat, pürin ve primidin bazıları ile amino asitlere ihtiyaç duyarlar (7, 110). Ürettikleri bakteriyosinler geniş bir inhibitör spektrum gösterirler. Geleneksel fermente gıdalardan bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda, bakteriyosinlerin amilaz ve katalaz enzimlerinden etkilenmedikleri fakat proteolitik enzim uygulamasında aktivitelerini tamamen kaybettikleri görülmüştür. Isıya stabil olan bu bakteriyosinler otoklav ısısından sonra ve pH 8'in altında da aktiftirler. 121 °C'de 15 dak., 80 °C'de 1 saatlik ısı uygulamalarında, pH 3- 8 gibi geniş bir pH aralığında aktivitelerini sürdürdükleri belirlenmiştir (110).

Ette üreyebilen bir mikroorganizma grubu olan laktobasillerin varlığında ortamdaki *Salmonella* gibi birtakım patojenlerin yaşaması engellenmektedir (139). Laktik asit bakterilerinin gelişimi antibakteriyel uygulama ile inhibe edildiğinde, bu bakterilerin antimikrobiyal aktivitesi sonucu azalan *Enterobacteriaceae* sayısında bir artışa yol açtığı ortaya çıkmıştır. Böylece, popülasyondaki artışları ve kötü koku özellikleri ile etin erken bozulmasına sebep olabileceği değerlendirilmiştir (152).

1.4.1.8. *Pseudomonas spp.*

Gram negatif, katalaz pozitif, aerobik karakterde olan bu cinsin bazı türleri oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatiftir ve gıdalar için önemli pek çok özelliğe sahiptir. Aerobik olmaları dolayısıyla gıdanın yüzeyinde hızla gelişebilmeleri sonucu okside ürünler ve mukoz maddeler oluşturular. Bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahiptirler (7). Minimum beslenme gereksinimi olan bir bakteridir. Kendi gelişimleri için gerekli faktörleri ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedir. Toprakta çürümüş bitki ve çiçeklerde, musluk suyunda ve hatta distile suda dahi yaşayabilirler. Suyu ve nemli ortamı sevdiği için hastane ortamında kolayca yaşayabilmektedirler (168). Depodaki ürünün güvencesi ve etin raf ömrü, et endüstrisi için önemli bir sorundur. Buzdolabındaki etin bozulması, yapışkanlık, gaz üretimi, renk bozulması, kötü koku ve aroma oluşması kısmen *Pseudomonas* türü bakteriler tarafından olur (68). Psikrotrof ve mezofil olarak üreyebilirler ve özellikle soğukta saklanan et, tavuk, yumurta ve deniz ürünlerinin birinci derecede bozulma etmenidirler. Kasaplık hayvan etlerinin yüzeyleri çoğunlukla 10^2 - 10^4 kob/cm² düzeyde aerob mezofil canlı ile kontamine edilir. Mezofil bakteriler etin muhafaza edildiği soğuk koşullarda çoğalamadıklarından, aerob koşullardaki soğuk muhafazada durum tersine dönerek predominat flora *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *psychrobacter spp.*, *Moraxella* ve psikrotrof *Enterobacteriaceae* tarafından oluşturulur (78).

P. aeruginosa saprofit bir tür olmakla birlikte gastroenterik hastalıklara neden olabilmektedir (7). *Pseudomonas*'lar, özellikle *P. aeruginosa* bitki orijinli biyoaktif bileşenlerin ve uçucu yağların etkisine karşı en az hassasiyet gösteren bakteri grubudur (45, 50, 152).

1.4.1.9. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica Gram negatif, oksidaz negatif, sporsuz, fakültatif anaerobik bir bakteridir. *Yersinia*'lar psikrotrof bakteriler olup optimum üreme sıcaklıkları 22- 29 °C arasında olsa da -2 ile 45 °C arasında da üreyebilmektedirler. 37 °C'de hareketsiz olmalarına rağmen 30 °C altında hareketlidirler (111). Aside çok

duyarlıdırlar. Fermente gıdaların mikrofloraları *Y. enterocolitica* üzerinde bakterisit ve bakteriostatik etki göstermektedirler. Enterotoksijenik *E. coli* suşlarının oluşturduğu toksinlere benzer yapıda ısıya dirençli toksinler oluşturabilirler. *Y. enterocolitica* sıklıkla gastrointestinal sistemde infeksiyon yapan ve yangıya neden olan invaziv karakterde patojen bir bakteridir (78). Gelişebildikleri pH sınırları 4- 10 (optimum 7,6) gibi geniş bir sınırdadır. İyonize ve UV radyasyon uygulamalarına, sodyum nitrat ve nitrite çok duyarlıdır. % 5 konsantrasyondaki tuza direnç gösterebilirler (7). Hayvansal gıdalar etkenin insana geçişinde başlıca rolü üstlenirler. Domuz, sığır ve koyun eti, süt ve süt ürünleri, deniz ürünleri bu gıdalar arasındadırlar. Etken ayrıca köpek, kedi, kuşlar, geyik, rodent, mink, kurbağa, balık deniz kabukluları gibi hayvanlar ile gıdalardan ve sulardan izole edilmiştir (78).

1.4.2. Oksidatif Etkenler

Gıdalardaki doğal enzimlerin pek çoğu gıda bileşenlerinin parçalanmasına neden olarak besin değerini düşürebilmekte ya da istenmeyen değişimlere sebep olabilmektedir. Yağların acılaşması (ransidite) ve meyve, sebzelerdeki enzimatik esmerleşme bunlara örnektir. Birçok gıdada ürünü oluşturan bileşenler ile havanın oksijeni arasında kendiliğinden ortaya çıkan ve “otooksidasyon” denen tepkimeler oluşur. Bazı oksidasyon tepkimeleri gıdalarda istenirken pek çoğu vitamin kayıplarına, renk değişimlerine, yağların bozulmasına, besin değerinin azalmasına, arzu edilmeyen tat- koku oluşumuna neden olmalarından dolayı istenmemektedirler (117). Lipit oksidasyonu, ette mikrobiyal bozulma kadar kalite kaybından sorumlu olan bir diğer faktördür. Et ve et ürünlerinin işlenmesi ve depolanması sırasında oluşarak renk, aroma, tekstür ve besin değerini olumsuz etkilerler (116). Genelde yağ ve yağ içeren gıdalar için oksidasyon söz konusu olsa da karbonhidratlar, proteinler ve pigmentler gibi diğer bileşenlerde de oksidatif değişimler meydana gelebilmektedir (92).

Lipitlerde oluşan oksidatif tepkimeler oluşum şekli ve koşullarına bağlı olarak kimyasal ve enzimatik olabildiği gibi otokatalitik, termik oksidasyon, oksipolimerizasyon (kuruma) ya da bunların karışımı şeklinde de olabilmektedir. Ancak

hangi şekilde olursa olsun ortamdaki oksijen ve yapıda bulunan doymamışlık, her zaman tepkimelerin başlamasına neden olan temel iki faktördür. Bunun dışında ortam sıcaklığı, ışık ve çok değerlikli metallerin ortamda bulunması da önem taşır. Lipitlerin otooksidasyonu birbiri içine girmiş karmaşık tepkimelerin tümünü kapsadığı için kompleks bir mekanizmadır. Bu otooksidasyondaki tepkime hızı, kısmi oksijen basıncı, lipidin oksijenle temas ettiği yüzey genişliği, yağ bileşimindeki yağ asitlerinin çeşit ve miktarı, sıcaklık ve nem gibi depolama koşulları ile içerdiği pro- ve antioksidanların etkinlik ve miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (117).

Lipitlerdeki bozulmalar başlıca;

Hidroliz: Serbest yağ asidi ve gliserol oluşumu ile sabunumsu tat ve koku oluşması,

Acılaşma: Doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu,

Tat değişimi: Özellikle balık yağı ve soya yağı gibi yağlarda yüksek derecede doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu tat bozulması,

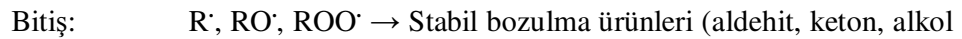
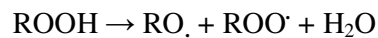
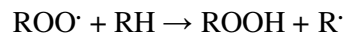
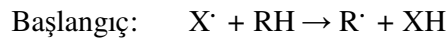
Polimerizasyon: Doymamış yağ asitleri arasındaki bağların koparak iki karbon arasında oksijen bağları oluşumuyla karakterizedir (58).

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlı olarak değişmekle birlikte, yağ asitlerine göre daha az hassastırlar. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, methionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler kolaylıkla etkilenirler (9). Hemoglobin gibi Hem proteinleri önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (13). Etin istenen kırmızı rengini temel pigmenti olan oksimyoglobin verir. Ancak Fe^{+2} içeren oksimyoglobin ve deoksimyoglobinin (ete mor renk verir) Fe^{+3} içeren metmyoglobine oksidasyonu et renginin istenmeyen kahverengiye dönüşmesine neden olur. Bu, ette doğal olarak bulunan oksidasyon/ redüksiyon enzimleri tarafından oksijen varlığında gerçekleşir (213). Bu aşamada pigmentlerin renk degradasyonunu antioksidanlar da dahil herhangi bir katkı maddesi engelleyememektedir. Bu nedenle hemoglobin içeren gıdalarda rengin kontrolünde belirli gazlara geçirgen olan ambalaj maddeleri kullanılmaktadır. Antioksidanlar

mum, parafin ve polimerler içinde veya emülsiyon halinde gıda ambalajlarına ilave edilirler ve buharlaşma yoluyla da gıdaların içine geçişi sağlanmaktadır (92).

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, peroksidatif hasara oldukça duyarlı olan Deoksi- Ribo Nükleik Asit'i (DNA) etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme neden olurlar (13). Karbonhidrat oksidasyonu sonucunda gıdalarda renk ve aromada önemli değişiklikler olmaktadır. Genellikle kahverengileşme (esmerleşme) reaksiyonları en başta olmak üzere, karoten gibi doğal pigmentlerin okside olmasıyla gıdanın renginde, tadında ve kokusunda bozulmalar gözlenir (58). Oksidatif bozulma son ürünün lezzet ve aroma gibi organoleptik özelliklerini değiştirebilmekte, tüketici tarafından kabul edilirliliğini olumsuz yönde etkileyebilmekte ve sağlık açısından olumsuz etkiler gösterebilmektedir (215).

Lipit içeren gıdalarda ilk oksidasyon ürünleri genelde belli bir depolama süresinden sonra ortaya çıkmaktadır. "İndüksiyon periyodu" denen sipesifik evrenin aşılmasından sonra tepkimeler hızlanmaktadır. Bununla birlikte, bileşimde prooksidan maddeleri fazla, antioksidan etkisindeki maddeleri az oranda içeren gıdalardaki lipitler bir indüksiyon periyodu geçirmeden, süratle oksidasyon tepkimesine girmektedirler (117). Hayvansal ürünlerde lipit oksidasyonu yüksek oranda doymamış yağ asitleri içeren membran fosfolipitlerinde üretim, işleme, pişirme ve depolama sırasında oluşur. Oksidasyonun ilk ürünü kokusuz olan peroksiditlerdir, fakat daha sonra hidrokarbonlar, aldehitler, ketonlar, alkoller ve organik asitlere parçalanırlar. Bu ikincil oksidasyon ürünleri ise ürünün rengini, kokusunu, tadını, aromasını, yapısını ve dolayısıyla raf ömrünü etkilemektedirler (112, 142). Genellikle doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonu ile uçucu bileşiklerin oluşması ve istenmeyen tat- koku oluşumu şeklinde ifade edilen ransiditenin zincir reaksiyonu aşağıdaki gibi özetlenebilmektedir:



vb.).

<i>RH:</i>	<i>Yağ asidi esterleri</i>
<i>R :</i>	<i>Yağ asidi serbest radikalleri</i>
<i>ROO :</i>	<i>Peroksit yapısındaki serbest radikaller</i>
<i>ROOH:</i>	<i>Yağ asidi hidroperoksitleri (188).</i>

Sonuç aşamasında hidroperoksitler ısı ya da metal katalizörlerin etkisi ile aldehit, keton, ester, alkol, alkil radikal ve kısa zincirli hidrokarbon gibi acılaşmış yağlardaki acı tat ve lezzeti oluşturan sekonder ürünlere parçalanırlar (92).

Gıdalarda oksidasyonun kontrolü oksijenin uzaklaştırıldığı ya da uygun kimyasalların kullanıldığı işleme ve paketleme teknikleriyle sağlanabilmektedir. Antioksidanlar oksidatif ransidite ve oksipolimerizasyon etkisiyle meydana gelen bozulmaları önleyebilmelerine rağmen oksidasyon sürecini geri döndüremezler veya hidrolitik acılaşmanın gelişimini durduramazlar (143).

1.5. Et ve Ürünlerinde Kullanılan Muhafaza Yöntemleri

Minimal işlenmiş, kolayca hazırlanan ve yemeye hazır taze gıdalara talebin artması, gıda ticaretinin küreselleşmesi ve merkezi işlemeden dağıtım gıda güvenliği ve kalitesi için önemli zorlukları barındırır. Son zamanlardaki gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar, gıdada kaliteyi, tazeliği ve güvenliği sürdürürken aynı zamanda mikrobiyal büyümeyi inhibe edecek yenilikçi yolların araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Güvenliğin ve kalitenin yükselen bir marjını sağlamak için paketlemeyi kullanmak bu yollardan biridir. Ambalaj teknolojileri gıdanın raf ömrünü uzatmak ve patojenlerden kaynaklanan riski azaltmak için önemli bir rol oynamaktadırlar (17). Gıdaların saklama ya da depolama koşulları ve stabiliteyi değişik koşullarda test edilerek bulunmaktadır. Bir ürünün raf ömrü kullanılan hammaddenin hasadından sonra geçen zamana, türüne, proses tipine, paket malzemesinin özelliklerine ve sıcaklık, nem gibi çevre koşullarına, depolama sırasındaki fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişimlere bağlıdır (121, 139). Gıdanın raf ömrünü uzatmak ve korumak için başvurulan güncel teknolojiler kimyasal koruyucular, ısıtma prosesi, modifiye atmosfer paketleme (MAP), vakum paketleme (VP) veya soğutmayı içerir (89). Gıdalar soğutma, dondurma, kurutma,

tuzlama, salamura ve tütüleme gibi yöntemlerle de saklanırlar (235). Et Ürünleri Tebliğinin 5. maddesinde sağlık kontrolünden geçen ve insan tüketimine uygun olduğunu belirtir sağlık damgası taşıyan etlerin, ısı işlem uygulanarak, kürlenerek, marine edilerek, kurutularak, tütüleme veya olgunlaştırma işlemi uygulanarak üretilbileceği ve et ürünlerinin üretiminde izin verilen katkı maddeleri, aroma maddeleri, gıda maddeleri ve lezzet vericilerin kullanılabilmesi belirtilmiştir. Yine bu Tebliğ'de 'işleme' tanımı altında 'karkas eti ürünleri veya sakatat ürünleri üretilirken kullanılan etin muhafaza süresini uzatmak amacıyla başka bir gıda maddesiyle birlikte veya tek başına ısı uygulaması, tütüleme, tuzlama, marinyon, kürlenme, pişirme, emülsifiye etme, olgunlaştırma veya kurutma gibi fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerden geçirilmesinden' bahsedilmektedir. Burada 'Isı uygulaması' kuru veya nemli ısı uygulamasını, 'Marinyon' etin tuz, bitkisel yağ gibi çeşitli gıda maddeleri ve gerektiğinde lezzet vericiler kullanılarak muamele edilmesini, 'Tuzlama' et ürünleri işlenmesinde tuz kullanılmasını, 'Kürlenme' etin korunması ve daha lezzetli hale getirilmesi amacıyla tuz ve katkı maddelerinin ürünün her tarafına dağıtılması işlemini, 'Tütüleme' et ürünlerini korumak rengi ve tadı geliştirmek, antimikrobiyal ve antioksidan etki sağlamak için uygulanan işlemi, 'Olgunlaştırma' etin tuz ve katkı maddeleriyle birlikte uygun iklimik koşullar altında neminin yavaş ve kademeli olarak azaltılması yoluyla doğal fermentasyona veya enzimatik işleme tabi tutulması sonunda zaman içerisinde ürüne tipik duyuşal özeliğini veren değişikliklerin meydana gelmesini, 'Kurutma' doğal veya yapay yollarla su içeriğinin düşürülmesi işlemini, 'Pişirme' etlerin gerektiği kadar ısıtılarak yenilebilir duruma getirilmesi işlemini, 'Emülsifiye etme' etlerin emülsiyon haline getirilerek çeşitli işlemlerden geçirilmesini ifade eder (221). Fakat, bu gibi gıda proses teknolojileri, *L. monocytogenes* gibi istenmeyen gıda patojenlerini elimine edemezler veya mikrobiyal bozulmayı tamamen geciktiremezler (89).

Patojen mikroorganizmaların neden oldukları yeni gıda kaynaklı salgın hastalıkların ortaya çıkış insidenslerinin yükselmesi ile gıda güvenliğiyle ilgili endişeler de yükselmektedir. Bozulma yapıcı ve patojenik mikroorganizmaların gelişmesini inaktive veya inhibe etmede kimyasal koruyucuların ve yapay antimikrobiyalların kullanımına ilişkin bir tedirginlik de gelişmektedir (211). Günümüzde gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonlar hem insan sağlığında hem

de ekonomide olumsuz etkileri ile büyük bir sorun oluştururlar. Gıda teknolojisinin ilerlemesine karşın gıda kaynaklı hastalıkların sayısı da hızla artmaktadır. Özellikle gıda kaynaklı patojenler olan *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 gibi patojenlerin ve bozulma bakterilerinin gıda teknolojisinde ve halk sağlığında oluşturdukları tehlike arttıkça gıda sanayinde farklı modern teknikler ve koruyucu maddeler önem kazanmaktadır (54, 100).

Gıdalara çeşitli yollarla bulaşan mikroorganizmalar, gıdaları kendi gelişimleri için besin kaynağı olarak kullanırlar. Bulaşmadan sonra besin öğelerini kullanır, hızla çoğalır, enzimatik değişikliklere yol açar ve yeni bileşikler sentezleyerek veya mevcut bileşikleri parçalayarak hoşta gitmeyen tat ve aroma oluştururlar. Gıdalarda mikrobiyolojik gelişmeyi besin öğeleri (protein, karbonhidrat, yağ, vitamin, mineral vb.), su aktivitesi, asitlik, pH, sıcaklık, redoks potansiyeli (gıdanın veya ortamın oksijen içeriği), inhibitör bileşikler (asetik, sorbik, propyonik asit, furfural vb.), ışık, gıdanın bulunduğu atmosferdeki gazlar (azot, karbondioksit, oksijen) gibi faktörler etkilemektedir (60, 121). Mikrobiyal bozulma ve oksidatif reaksiyonlar sonucu meydana gelen kalite kayıpları özellikle kolay bozulabilen gıdaların raf ömürlerini sınırlamada en fazla etkiye sahiptir (130). Kolayca bozulmaya eğilimli olan gıda maddeleri için raf ömrü büyük önem taşımaktadır. Gıdaların raf ömürlerini artırmak için uygulanan temel işlemlerin tümü, bozulmaya neden olan etmenleri, mikrobiyolojik enzimatik, kimyasal ve fiziksel değişimleri sınırlamaya veya tamamen ortadan kaldırmaya yöneliktir (121, 235). Raf ömrü tayininde mikrobiyolojik parametrelerden, gıdalardaki kimyasal ve fiziksel değişimlerden ya da duyuşal testlerden yararlanılır (121).

Gıda koruma, düşük bir bozulma potansiyeline sahip güvenli ürünler sağlarken ham maddenin kalite, fizikokimyasal özellikleri ve işlevselliğini korumak için gıda işleme sırasında uygulanan bir girişimdir. Bu, sonraki ürünün değişmesiyle, bilerek tasarlanmış işlem olarak gerçekleştirilir (43). Antibiyotiklere ihtiyacın azalması, gıdalarda mikrobiyal kontaminasyonun kontrolü, istenmeyen patojenleri elimine etmek ve/veya mikrobiyal bozulmayı geciktirmek için raf ömrünü uzatan teknolojilerin geliştirilmesi, insanlarda immun hücreleri kuvvetlendirmek veya patojenik mikroorganizmalar tarafından antibiyotik direncinin gelişmesini azaltmak gibi yararlılara da sahiptirler (90, 174).

Gıda kaynaklı patojen kontrolü ürün öncesi, ürün sonrası, işleme, depolama, dağıtım, ticaret, hazırlık, servis ve tüketimde birlikte hareket etmeyi gerektirir (203). Son zamanlarda sağlık şartlarını güçlendirmek ve hastalık risklerini önlemek için et ve et ürünlerinin fizyolojik fonksiyonlarını geliştirmeye çok önem verilmektedir. Bu gelişim hayvan üretimi, karkas kompozisyonu ve taze et kalitesini geliştirmek için hayvan diyetlerine konjuge linoleik asit, vitamin E, omega 3 yağ asitleri ve selenyum içeren fonksiyonel bileşiklerin ilavesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, sebze proteinleri, diyetlik fiberler, şifalı ot ve baharatlar ve laktik asit bakterileri gibi fonksiyonel ingredientler tüketiciler için fonksiyonel değerlerini geliştirmek üzere proses boyunca et ürünlerine direkt ilave de edilebilmektedirler (242). Gıda koruyucular dahil antimikrobiyal ajanlar, işlenmiş gıdanın raf ömrünü uzatmak ve gıda kaynaklı bakterilerin inhibe edilmesini sağlamak üzere kullanılmaktadırlar (68).

1.5.1. Soğutma

Bozulma yapan enzimatik ve kimyasal reaksiyonları geciktiren soğukta saklama tekniğinde, et aynı zamanda dinlendirilmeye (olgunlaştırma, gevrekleştirme) bırakılmaktadır (235). Çoğu patojen için gelişmelerini baskılayıcı etkiye sahip olan buzdolabı sıcaklığında *L. monocytogenes* ve *Y. enterocolitica* gibi bazı psikrofil-psikrotrof bakteriler yavaş da olsa üreyerek halk sağlığı açısından risk oluştururlar. *Pseudomonas* ve *Enterococcus* gibi gıdalarda en çok bulunan psikrotroflar ise et, balık, tavuk gibi soğukta muhafaza edilen ürünlerin bozulmasına neden olurlar (78). Soğuk muhafaza, sorun yaratabilecek mikroorganizma türünün değişmesine veya çoğalma hızının düşmesine neden olur, ancak mikroorganizma büyümesine engel olamamaktadır. Bu nedenle, gıda zehirlenmesi veya sporlanmaya neden olan birçok mikroorganizma düşük sıcaklıklarda da üreyebildikleri için buzdolabında saklanan gıdalarda bozulmaya neden olabilirler (139, 240). Gıdaların soğuk zinciri, korumaya yardımcı olabilir fakat ürünün bütün güvenliğini ve kalitesini garanti edemez. Ayrıca diyet, beslenme alışkanlıkları ve gıda proses pratiklerindeki değişiklikler ve hazır gıda talebinin artması gibi gelişmeler, patojen kaynaklı bildirimlerin artmasına neden olmaktadır (133).

1.5.2. Dondurma

Dondurma işlemi ile ürünün sıcaklığı ve a_w değeri düşürüldüğü için mikrobiyal ve enzimatik faaliyetler azaltılarak veya tamamen durdurularak ürünün kalitesi korunur. Düşük sıcaklık derecelerine mikroorganizmaların duyarlılıkları farklıdır. Küfler en dayanıklı mikroorganizmalar olup bunları sırasıyla mayalar ve bakteriler izlemektedir. Donma hızının yüksek olması halinde donmuş etin kalitesi taze et kalitesine yakın olmakta, fire oranı azalmakta ve donma süresi kısalmaktadır (21). Dondurma yöntemi ile taze sığır eti 1 yıl veya daha uzun, dana eti 10- 12 ay, koyun eti 8- 10 ay, domuz eti 6 ay bozulmadan saklanabilmektedir. Dondurma işleminin hızlı yapılması daha iyi sonuç verir. Yavaş dondurulmuş etlerin oda sıcaklığında öz suyu kaybı, hızlı dondurulanlara göre daha çok olur. Mikrobiyal büyüme açısından ise yavaş dondurmanın (büyük kristal yapısı) organizmalar üzerinde daha öldürücü etkiye sahip oldukları görülmüştür (235). Gıdanın dondurulmuş olması için tamamının katı faza geçmesi gerekmektedir. Aksi halde tat, renk ve tekstürde istenmeyen değişimler olabildiği gibi donmayan kısımlarında psikrotrof mikroorganizmalar da büyüebilmektedir (139). Dondurma işleminin, çözünme sonrası orijinal rengin geri kazanılmasında, yüksek basınç uygulamasının zararlı etkisine karşı biftek etini koruduğu da ortaya konmuştur (82).

1.5.3. Kurutma

Su aktivitesi (a_w) değeri mikroorganizmaların gelişmeleri üzerinde en etkili faktörlerden biridir. a_w değeri 0,95'in üzerindeki gıdalar daha çabuk bozulurlar. Özellikle Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas*'lar (0,97) a_w değerinin düşmesine çok duyarlıdır. Teknolojik olarak tuz ilavesi veya şeker gibi çözünebilir maddelerin ilavesiyle a_w değeri düşürülür (78). Geleneksel olarak etin kurutulması havada bekletme ile yapılmaktadır. Kurutulmakta olan etin suyunu daha çok vermesi için önceden et tuz (NaCl) ile ovulur. Kurutma işlemi ile etin rutubeti % 10'un altına düşürülür. En çok Güney Amerika ve Hindistan'da bu yöntemle etin muhafazası yapılmaktadır. Pastırma, ülkemizde kullanılan havada kurutma tekniği ile

hazırlanmış, kürlenmiş, preslenmiş, çemenle kaplanmış ancak pişirilmemiş ve fermente edilmemiş orta nemlilikteki bir et ürünüdür (119). Ancak pastırmada tuzlama dışında baharatla muamele gibi işlemler de uygulanmaktadır. Tuz, ette bakterilerin üremesini engelleyerek prezervatif etki göstermektedir (235).

1.5.4. Tütsüleme (Dumanlama)

Tütsüleme gıdalara lezzet verme, istenen rengin oluşturulması ve tekstürün iyileştirilmesi yanı sıra işlem sırasında oluşan kimyasalların antimikrobiyal ve antioksidatif etkileri ile muhafaza süresinin uzatılmasını sağlayan kayın, meşe veya ardıç gibi sert ağaçların dumanına tutulmasıyla uygulanan eski bir yöntemdir (14, 78, 235). Tütsülenmiş, kurutulmuş, tuzlanmış veya salamura edilmiş etlerdeki mikroflora düşük su aktivitesi nedeniyle az olmaktadır. Kürlenmiş etlerde daha çok Gram pozitif bakteriler, küfler ve mayalar gelişebilmektedir (167). Mikrobiyal gelişim açısından geleneksel tütsüleme yöntemiyle önemli farklılık göstermediği bildirilen sıvı tütsü kullanımının uygulama kolaylığı ve zamandan tasarruf sağlayan, üretim maliyetini azaltan, standart ürün sağlama kolaylığına sahip oluşu ve karsinojenik etkili polisiklik hidrokarbon bileşiklerini içermemesi nedeniyle sağlık açısından önemli avantajları bulunmaktadır (123).

1.5.5. Etin Nitratla İşlenmesi

Nitratın doğal kaynaklarının kullanımı ile kürlenmiş etlerin güvenliği, özellikle nitritin *C. botulinum* tarafından üretilen toksini önlemek için çok etkili bir antimikrobiyal olması ve rezidual nitrit konsantrasyonunun karsinojenik nitrozaminlerin potansiyel oluşumunda iyi bilinen bir risk faktörü oluşuyla önemli bir konudur (192). Bugün nitratlar, sosis, sucuk, pastırma gibi et ürünlerine prezervatif ve et renginin korunması amacıyla katılan "besin katkı maddeleri" arasında yer almaktadırlar. İlave edilecek miktar ilgili tüzük ve yönetmeliklerde

belirtilmiştir. Nitritin yüksek konsantrasyonda insanlarda methemoglobinemi yaptığı bilinmektedir (235).

Doğal ve organik gıdalarda kimyasal koruyucular kullanılmadığından nitrit ve/veya nitrat doğal ve organik işlenmiş et ürünlerine ilave edilemezler. Bununla birlikte, sebze esaslı ingredientler gibi yüksek nitrat içerikli maddeler kullanılan alternatif prosesler ve nitrat indirgeyen starter kültür ile tipik kürlenmiş et özellikleriyle böyle etler üretilebilirler. Bu proses tarafından üretilen nitritin miktarını ölçmek mümkün olmadığından bu ürünleri doğru olarak yansıtan etiketleme sağlanmalı, üretim prosedürleri ürün tutarlılığına ulaşmak için standardize edilmelidir (192).

Düzenlemelerde, buzdolabında tutulan bütün kürlenmiş ürünler için nitritin minimum 120 ppm düzeyinde katılması gerektirdiği bildirilmektedir. Minimum nitrit konsantrasyonu sonraki ürün güvenliği için önemlidir. Diğer yandan, raf stabilitesini sağlamak üzere kürlenmiş ürünler (ortam sıcaklığında depolanan ve soğutma gerektirmeyen) için gerekli minimum nitrit düzeyi yoktur (192). Pek çok ülkede gıdalara nitrat'ın (NO_2) 200 mg/kg'dan, nitrit'in (NO_3) 500 mg/kg'dan fazla katılmaması yasal olarak belirtilmiştir (21).

1.5.6. Isıl İşlem Uygulama

Isı alternatifli teknolojiler yüksek frekanslı ısıtma, ohmic ısıtma ve buhar pastörizasyon gibi teknikler olarak ortaya konmaktadır (24). Isı uygulaması (termal inaktivasyon) bozulma etkeni mikroorganizmaların yanı sıra bozulmaya neden olan doku ve mikrobiyal enzimlerin inaktivasyonunu sağlar. Pastörizasyon düşük sıcaklık-uzun zaman (LTLT) veya yüksek sıcaklık- kısa zaman (HTST) teknikleri ile süt, dondurma, sıvı yumurta ve meyve suyu gibi gıdalara raf ömrünü uzatmak amacıyla uygulanmaktadır. UHT (Ultra High Temperature) sterilizasyon ise steril yapıda ürün elde edilmesini sağlar ve soğutma işlemine gerek kalmadan birkaç aya kadar raf ömrünü uzatabilir (78). Yağı ile birlikte katılmış şekilde depolanan bir et ürünü olan kavurma ülkemizde ısıl işlem uygulama ile yaygın olarak kullanılan mahalli bir et saklama yöntemidir (119, 235). Konserve tekniği, gıdaların coğrafi bölge ve

mevsime bağlı yetiştirilen ürünlerin her yere ulaştırılabilmesi, üretim fazlası ürünlerin uzun süre muhafaza edilebilmesi, savaş, deprem gibi olağanüstü durumlarda ve modern iç hayatında hazır tüketime sunulabilmesi avantajlarını taşır (78). İyi işleme koşullarına (GMP) uygun şartlarda hazırlanan et ürünlerinin ya da etli yemeklerin uygun gaz geçirgenliğine sahip plastik poşetlerle paketlenerek pastörize edilmesi (sous- vide) ve soğukta muhafazası, özellikle hazır yemeklerin yaygınlaşması ile son zamanlarda gelişmiş ülkelerde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, pastörize olan bu ürünlere taşıma, depolama, satış ve kullanım sırasında sonradan bulaşma olabilmektedir (139). Final paketlemeden sonra yeni ısı alternatifli teknolojilerin uygulanması, ürünlerin son işlemler boyunca daha fazla çapraz kontaminasyonunu önleyebilecektir (24).

Mikrodalgalar, mikroorganizmalar üzerine oldukça öldürücü etki yapmakla birlikte mikrodalgaların üniform olmayan dağılımı sonucu bu fırınlarda ısıtılmış gıdalar mikrobiyal yönden güvenli kabul edilmemektedir (78).

1.5.7. Fermentasyon

Fermente gıdalar, sağlık üzerindeki faydalarının ışığında artan talepler doğrultusunda gıda sanayinde de büyük önem kazanmaya başlamışlardır. Gıdaların lezzetini ve aromasını arttırmak ve muhafaza süresini uzatmak için kullanılan en eski metotlardan biri olan fermentasyondan yeni ürünlerin elde edilmesi amacıyla da yararlanılmaktadır (48). Temel besleyici özelliklerinin ötesinde fizyolojik işlevleri geliştirdikleri, sağlığı olumlu yönde etkiledikleri ve hastalıkları önledikleri için “Fonksiyonel besinler” grubunda incelen prebiyotik ve probiyotikler oldukça dikkat çekmektedir (48, 56). Fermentasyon endüstriyel olarak, hayvansal ve bitkisel kaynaklarda olduğunun aksine miktar sınırlayıcı çevre, iklim, iç gücü, toprak alanı, mevsim vb. etmenlerin denetim altına alınabilmesini sağlayan, mikroorganizmalardan yararlanmanın en büyük avantajına sahiptir. Uygun mikroorganizma kültürü seçimi ve kontrollü fermentasyon ile kantite sorunu olmadan standart, hijyen şartlarına uygun, kaliteli ve aynı zamanda daha ekonomik ürün elde edilebilmektedir (216). Gıdadaki doğal mikrofloranın aktivitesini

kaybetmesi veya istenmeyen mikroorganizmaların bulunabilmesi gibi durumlara karşı starter kültürler standart bir fermentasyon sağlayarak, ürünün yüksek kalitede ve arzu edilen özelliklere sahip olmasını sağlarlar (124). Geleneksel Türk et ürünlerinden biri olan sucuk, pişirilmeden kürlenmiş ve fermente edilmiş bir et ürünüdür (119).

Tüketicilerin tipik organoleptik özellikleri dolayısıyla tercih ettikleri geleneksel ürünlerin son kalitesi işleme sırasındaki ortamın mikroflorasına ve hijyenik pratiklere bağlıdır. Uygun hijyenik pratiklerle bozulma ve patojenik bakteriler kontrol edilseler de, bu pratikler, fermentasyon sırasında starter kültürler için gereken teknolojik bakterilerin eliminasyonu riskini taşır. Bu durumda, negatif kontaminasyondan kaçınmak ve fermentasyonda pozitif bakterilerin devamını sağlamak için teknolojik bakterileri korurken bozulma etkeni ve patojen bakterilerin eliminasyonu sağlanmalıdır (129).

1.5.8. Işınlama (Irradyasyon)

Gama ve X ışınları gibi ışınlarla mikrobiyal büyümenin kontrol edilmesi özellikle baharatlarda ve yemişlerde kullanılmaktadır. Etlerde de bazı patojenik mikroorganizmaların azaltılması, risk oluşturan tenya ve kistler gibi parazitler infeksiyonların kontrolü için ışınlamadan faydalanılmaktadır. Gıda ışınlamada kullanılacak ışınlama dozu, gıdanın özelliklerine ve istenen doz aralığına uygun uluslararası kabul edilebilir dozimetri yöntemleriyle gıdanın belli hacim biriminde absorblanan ortalama doz ölçülerek belirlenir (224). Askorbik asit ile baharat içeren protein bazlı bir kaplama ile hazırlanan kıyma örneklerinin 0, 1, 2 ve 3 kGr dozda ışınlamaya maruz bırakılmasıyla uygulanan bir kombinasyon çalışmasında LAB ve *Brochothrix thermosphacta*'nın toplam koliform, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas*'a göre ışınlamaya daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Gram pozitif bakteriler arasında büyük farklılıklar gözlemlendiği, ışınlama dozuna bağlı olarak *S. aureus*'un belirgin bir hassasiyet sergilediği, buna karşın en büyük direncin LAB tarafından ortaya konduğu tespit edilmiştir. Gama ışınlama lipid oksidasyonunu yükseltmektedir. Askorbik asit ve baharat içeren yenilebilir film kaplama kullanımı ile

kıymada SH- radikallerinin üretimini ve lipid oksidasyonunun stabilize edilebileceği düşünülmektedir (164). Biberiye ve dağ kekiği ekstraktları ilave edilerek hazırlanan ve kontrol grubu olarak Bütillendirilmiş Hidroksi Toluen (BHT)/ Bütillendirilmiş Hidroksi Anisol (BHA) ilave edilmiş sığır burgerlerine donmuş et için izin verilen maksimum dozda (7 kGr) ışınlama uygulayarak, farklı antioksidanların etkileri ve ürünün kabul edilebilirliği araştırıldığında, ışınlama prosesinin gıdanın duyuusal kalitesini yükseltmeye yardımcı olabileceği düşünülmüştür (218).

1.5.9. Modifiye ve Kontrollü Atmosfer Paketleme (MAP ve KAP)

Taşıma ve depolama sırasında gıda bileşimindeki kimyasal değişimler ürünün kalitesini düşürür. Gıda kalitesini korumayı amaçlayan paketleme, geleneksel olarak dış çevreye karşı bir iç bariyer oluşturmaya dayanır. Son zamanlarda, bir iç bariyer oluşturmaktan ziyade gıdayı korumada rol oynayan bir grup paketleme teknolojisi olan aktif paketlemeye (AP) dikkat çekici bir eğilim vardır. Antioksidanlı paketleme, pakette bir antioksidan veya antioksidan karışımlarından oluşan bir çeşit yiyecek koruma sistemidir (42, 118). AP sistemleri oksijen tutucuları, karbondioksit tutucuları, parçacık ve nem kontrolü ajanları ve antimikrobiyal ambalaj teknolojilerini içerir. Akıllı paketleme sistemleri, taşıma ve depolama sırasında paketlenmiş gıdanın kalitesi ile ilgili bilgi vermek üzere paket şartlarını izlemektedir (118). AP, gıda teknolojisinde gıda güvenliği için mikroorganizmaların büyümelerini kısıtlamak için paket ve gıda sistemi arasında ürün veya üst tabaka ile etkileşime girer ve diğer kalite bozulma proseslerini yavaşlatır. Mikroorganizmaların gelişmesini önlemek için uçucu yağların paketin içine katılmaları spesifik bir uygulama olarak belirmektedir. Uçucu antimikrobiyallerle paketleme, teorik olarak, gıdanın dökme matriksine nüfuz edebilme ve direkt ürün teması gerektirmemesi gibi avantajlara sahiptir (17).

Bu yöntemler saklama, depolama odalarının, taşımada kullanılan konteynerlerin ya da paket malzemelerinin iç gaz kombinasyonlarını değiştirerek ürünün dayanma süresini artırmayı hedeflemektedir. MAP, O₂ konsantrasyonu tipik olarak düşürülen ve CO₂ konsantrasyonu yükseltelen gıdanın raf ömrünü artırmak

amacıyla kurulan iyi bir tekniktir (141). MAP'da ortamın veya paketin gaz kompozisyonu ilk doldurulduğu değerlerde kalması için kontrol edilmez ve ürünün depolanması sırasında başlangıç kompozisyonu yavaş yavaş değişir. Kontrollü atmosfer paketlemede (KAP) başlangıç gaz kompozisyonu ürünün raf ömrü boyunca sürekli kontrol edilerek aynı değerde tutulması sağlanmaktadır (139).

Taze etin renk ve raf ömrünü uzatan yaygın yaklaşımlardan biri de tercihen karanlıkta veya UV ışınımsız aydınlatma altında MAP kullanımudur. Göreceli olarak, yüksek karbondioksit düzeyi mikrobik büyümeyi kısıtlar. Kullanılan modifiye atmosferde oksijen, karbondioksit ve azot taze kırmızı etin kalitesini hem mikrobik hem de organoleptik korumak için birleştirilir. Buna ek olarak, antioksidanların kullanımı da üründeki oksidatif bozulmanın oranını ve kapsamını azaltabilir (190). Antimikrobiyal gıda paketlenme; paketlenmiş gıdada veya paketlenme maddesinin kendisinde bulunarak mikroorganizmaların büyümesini azaltma, inhibe etme veya geciktirme gibi yollarla rol alabilir (23). Gelecekte daha da büyümesi beklenen antimikrobiyal paketlenme;

- Paketlerin içine uçucu antimikrobiyal ajanlar içeren poşetler veya pedlerin ilavesi,
- Uçucu veya uçucu olmayan antimikrobiyal ajanların bileşiminin doğrudan polimerin içine konması,
- Polimer yüzeylerin üstüne antimikrobiyalların kaplanması veya emdirilmesi,
- İyon veya kovalent bağlarla polimerler için antimikrobiyalların immobilizasyonu,
- Doğal antimikrobiyalların kullanımını içeren formlarda olabilir (17).

Antimikrobiyal paketlenme maddeleri katı gıdaların (et, peynir vb.) veya sıvıların (süt, et eksudatı vb.) yüzeyi ile paketin direkt teması sonucu spesifik mikroorganizmaların büyüme oranını azaltarak güvenliği sağlamanın yanında kendi kendilerini de sterilize ederek sağlıklı kılabilirler ve işlenmiş ürünlerin potansiyel rekontaminasyonunu önleyebilirler (17).

Parafin kaplama kullanarak elde edilen aktif kağıt ile paketlenmede antimikrobiyal solusyonlar olarak karanfil ve tarçın uçucu yağlarının buhar faz aktiviteleri değerlendirilmiş, diğer ajanlara göre mantarlar tarafından sıklıkla daha

çok bozulan meyve ve sebzeler için bu tip paketlemenin umut verici olduğu bildirilmiştir (183).

1.5.10. Koruyucu Madde Kullanımı

Koruyucu maddeler mikroorganizmaları protein denatürasyonu, enzimlerin inhibisyonu, DNA'nın, hücre çeperinin ya da stoplazmik membranın tahrip edilmesi veya değiştirilmesi, hücre duvarı sentezinin baskılanması ya da uçucu metabolitlerle rekabet gibi birçok mekanizma ile etkilerler (167). Koruyucu maddeler üretilen gıdanın güvenli ve bozulmadan kalmasının garantisidir. Gıda korumada yaygın olarak, özellikle sorbik ve benzoik asit gibi zayıf organik asitlerle kimyasal koruyuculardan, hidrojen peroksit ortamlı sistemlerden, sitrik asit ve Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) gibi şelatörlerle mikrobiyal inaktivasyon mekanizmalarından, otlar ve baharatlar gibi doğal antimikrobiyallarda bulunan protein benzeri bileşiklerin potansiyellerinden yararlanılmaktadır (43). Bugün gıda endüstrisinde kullanılan en önemli koruyucu maddeler; kükürt dioksit ve çeşitli sülfidler, nitrat ve nitrat bileşikleri, sorbik asit, propiyonik asit, asetik asit, benzoik asit ve tuzları ile antimikotik etkiye sahip natamisin, bazı gliseril esterler ve nisin gibi bazı maddelerdir (139, 188). Antibiyotikler ise mikroorganizmaların bazı enzimatik fonksiyonlarını durdurarak veya yapı taşlarının sentezine engel olarak işlev görürler. Birçok ülkede kolay bozulan gıdalarda ve konservelede koruyucu olarak kullanılmaktadırlar. Bu antibiyotiklerin hastalık tedavisinde kullanılmayan ve sindirim sırasında yıkıma uğrayan nitelikte olmaları gerekmektedir. Gıdalarda kullanılan antibiyotikler tetrasiklinler, tylosin, nistatin, natamisin, subtilin ve nisin olarak sıralanmaktadır. Ancak nisin, yapısı ve etki şekli ile bu grubun dışında tutulmaktadır ve bakteriyosin olarak sınıflanmaktadır (167). Antimikrobiyaller Uluslararası Gıda katkıları Kodu 'E' sisteminde 200- 290 aralığında numaralanmışlardır (188).

Tüketici ve halk sağlığını ciddi şekilde tehdit eden *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* gibi önemli gıda patojenlerini elimine etmek için, günümüzde çeşitli antimikrobiyal maddeler

kullanılmaktadır. Gıdalara nitrat, nitrit, sorbat gibi antimikrobiyal maddelerin izin verilen dozların üzerinde katılmasının insan sağlığı üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler, bu gibi maddelerin gıdalarda serbestçe kullanılmalarını engellemektedir (95). Kimyasal gıda katkılarının güvenliğine karşı artan endişeler nedeniyle korumanın doğal metodları ve doğal koruyucular üzerinde tüketicilerin ilgileri giderek artmaktadır (160). Kimyasal koruyucuların yerine ‘Yeşil etiketli’ ürünler elde etmek üzere uçucu yağlar, çitosan, nisin ve lizozim gibi doğal bileşikler de araştırılmaktadır (66). Büyük bir halk sağlığı sorunu olan gıda kontaminasyonu doğal koruyucuların kullanımı ile daha iyi kontrol edilebilir. Hazır gıdalarda veya ingredient olarak gıdaya ilave edilen baharat ve şıfalı otların başlıca aromatik ve lezzet veren bileşiklerini içeren uçucu yağlar, organoleptik özellikleri etkilemeden gıda maddelerine eklendiklerinde bakteriyel kontaminasyonu da azaltacaklardır (166).

1.5.11. Yeni Teknikler

Tüketicilerin doğal aroma ve tadla birlikte yüksek kaliteli, doğal, besleyici, taze, uzun raf ömrüne sahip et ürünlerine talebi, son zamanlarda, güvenlikten ödün vermeden yüksek hidrostatik basınç, gama, elektron ve X- ray radyasyon, ışık darbe, doğal antimikrobiyallerle biyokoruma ve aktif paketleme gibi ısı uygulanmayan alternatif koruyucu tekniklerin çalışılmasını gerekli kılmıştır (23, 24). Nabız ışık, yüksek basınçlı nabız elektrik ve manyetik alan gibi teknikler, gıdada bozulma yapan mikroorganizmalar ve patojenleri kontrol etmek ve gıda korumak için geliştirilmiş tekniklerdir. Gıdadan çok yüzeyini korumak için paketleme materyallerinin içine doğal antimikrobiyallerin eklenmesi de son zamanlarda geliştirilmiş tekniklerdendir (66, 99). Aynı zamanda, engel kavramı altında ısı uygulanmayan (non- termal) ve termal koruyucu tekniklerin çeşitli kombinasyonları da onların verimliliğini yükseltmek için araştırılmaktadır. Mikrodalga ve radyo frekanslı tüneller veya buhar pastörizasyon gibi hızlı termal teknolojiler, özellikle yemeye hazır yemeklerde et ürünlerinin pastörizasyonu için yeni olanaklar sağlar (24). Ette yüksek hidrostatik basınç uygulaması, tüketicilerin reddetmesi nedeniyle ticarileşmeyi önleyen ciddi renk bozulmasına neden olmaktadır. Bir çalışmada yüksek basınç uygulanmış ve

düşük sıcaklıkta dondurulmuş bifteklerin çözünme sonrası taze örneklerle yakın parlaklık, kırmızılık ve sarılık değerleri gösterdiği gözlenmiştir. Buradan, dondurmanın basınçla oluşan renk kaybına karşı eti koruduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, yüksek basınç prosesinin (20 °C veya – 35 °C'de) toplam aerobik ve LAB sayılarını azaltmada efektif olduğu da ortaya konmuştur (82). Gaz ve elektrik şoku etkilerinin iki farklı modifiye atmosfer şartlarında, CO₂ konsantrasyonu- etki süresi kombinasyonlarının incelendiği bir çalışmada ise, farklı gaz şoku metodlarında elektrik şokuna göre daha az mikrobiyal üreme görülmüştür. Paketlemede bütün şok gruplarında düşük CO kullanımı oksidatif stabiliteyi yükseltmiş fakat mikrobiyal kaliteyi geliştirmemiştir (38).

Baharat tozlarını içeren yenilebilir film ile ışınlamanın kombinasyonunun katkısız bir etkileşim sağladığı görülmüştür (164). Sucuk kılıfının paketlenmesinde veya peynir dilimlerinde farklı uçucu yağlar ile yenilebilir biofilmlerin uygulamaları gibi teknikler de çalışmaya ihtiyaç duyulan teknikler olarak görülmektedirler (194). Bütün bu alternatif teknolojiler patojen ve bozulma yapıcı mikroorganizmaları hedeflerken doğal görünümü garantilemeye, enerji tasarrufu sağlamaya ve çevre dostu olmaya çalışırlar (24). Bununla birlikte, hafif ısıtma prosesi, MAP, vakum paketleme ve soğutma gibi teknikler ne istenmeyen patojenleri elimine etmek ne de mikrobiyal bozulmayı geciktirmek için yeterince etkili değildir (211).

1.5.12. Doğal Antimikrobiyal Maddelerle Koruma

Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmaların büyümelerini durdurarak (bakteriyostatik, fungostatik) veya onları öldürerek (bakterisidal, fungusidal, sporisidal) etki gösterebilmektedirler. Bununla birlikte, bakteri sporları kimyasal maddelere en dayanıklı mikrobiyal formdur. Bunlar, kimyasal maddelere olduğu gibi diğer antimikrobiyal faktörlere karşı da vejetatif formlardan daha fazla dayanıklılık gösterirler (167).

Antimikrobiyallar, gıdada doğal gıda bozulma prosesini kontrol etmek (gıda koruma) ve patojenik mikroorganizmaları içeren mikrobiyal gelişmeyi önlemek (gıda güvenliği) için başlıca kullanım alanı bulurlar. Doğal antimikrobiyallar

hayvanlardan, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan derive edilirler. Özellikle taze sebze ve meyvelerde olmak üzere gıdalarda doğal antimikrobiyalların kullanımı için kayda değer bir potansiyel vardır. Bununla birlikte, doğal antimikrobiyalların toksikolojik ve duyuşsal etkileri kadar etki metodları ve mekanizmaları tamamiyle anlaşılamamıştır (45, 174). Ticari olarak bitki orjinine dayanan antimikrobiyallar buhar distilasyon, hidro distilasyon ve kütle transfer oranını geliştiren ve yüksek çözünürlük sağlayan süperkritik sıvı ekstraksiyon gibi alternatif metotlarla çok yaygın olarak elde edilebilirler (45).

Antimikrobiyal ajanların etkisi mikroorganizmanın tipine bağlıdır ve hücre membran hasarı ile ilişkilili olarak uçucu yağların etkinliğini verir. Uçucu yağların kimyasal yapıları karakteristik olarak hidrofobiktir ve lipitçe zengin hücre membran yapılarının etrafında birikebilirler, yapısal ve fonksiyonel hasara neden olabilirler (127). Antimikrobiyal maddenin etkinliği gıda ürünlerinin özellikleri ile de yakından ilişkilidir. Gıdanın pH'sı veya gıda bileşenleri ile reaksiyonlar bu aktiviteyi etkilerler. Örneğin, pek çok koruyucunun aktivitesi asidik gıdalarda artmaktadır. Sıvı gıdalarda koruyucu maddeler mikroorganizmalarla daha iyi temas edebilmelerine karşın katı gıda parçalarının içinde bulunan mikroorganizmalar kimyasal maddelerin etkilerinden daha iyi korunabilmektedirler (167).

Birçok antimikrobiyal ürünün kombine kullanımı, gıdada her bileşimin dozunu azaltırken iyi bir mikrobiyal emniyet sağlayabilir. Ayrıca, aromatik bileşiklerin suya göre yağda daha iyi çözünebilirliği, patojenlere karşın efektif fırsata sahip olmalarını sağlaması açısından gıdanın sulu fazında bu bileşiklerin bulunabilirliğini değerlendirmek ilginç olacaktır (154).

1.5.12.1. Antimikrobiyal Etkili Bitki ve Baharatlar

Bitkiler gıda, giyim, barınma ve ilaç olarak kullanılabilirler ile insanların bütün ihtiyaçlarını karşılayabilmektedirler (88). Tıbbi bitkiler ve özellikle onların aktif bileşenleri uzun zamandan beri çeşitli hastalıkların tedavisi için güvenilir kaynaklar olarak bilinirler. Birçok infeksiyöz hastalık için çare olarak popüler tıpta sıklıkla kullanıldığından araştırmacılar tarafından ilgi görmektedirler ve bunlarla

ilgili oldukça sık araştırma yapılmaktadır (19, 35, 98, 207). Beslenmenin temel kaynaklarından olan bitkiler, bitkisel ekstraktlar ve bitki yağları birçok ülkede tıbbi amaçla özellikle insan hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Yine bu bitkilerin, aromatik etkilerinden başka antioksidatif, fungisidal ve antimikrobiyal gibi birçok etkileri ile gıdaları bozulmalara karşı koruma ve lezzet verme amacıyla da kullanıldıkları bilinmektedir (14, 115, 167, 173, 236). Önceleri Mısırlılar tarafından kullanılan uçucu yağlar ve baharatlar Çin, Hindistan gibi Asya ülkelerinde de yoğun bir şekilde kullanılırlar. Hindistan'da karanfil, tarçın, hardal, sarımsak, zencefil ve nane gibi bazı baharatlar alternatif tıp olarak da hala kullanılmaktadırlar. Baharatların koruyucu potansiyeline ait ilk bilimsel çalışmalar 1880'lerde *B. anthracis* sporlarına karşı tarçının antimikrobiyal aktivitesinin tanımlanması ile rapor edilmiştir. Karanfil et, şurup, sos ve pastalarda bozulmayı gizlemek için kullanılmıştır. 1910'larda tarçın ve hardalın elma püresini korumada etkili olduğu görülmüştür (45, 90, 211). Geleneksel tıpta karanfil (*Syzygium aromaticum*) gibi bazı bitkilerin çiçekleri oldukça yaygın ve popüler olarak kullanılmaktadır (88).

Antiinfektif ajanların fazla kullanımları sonucu ilaca dirençli bakteri, mantar ve virüslerin ortaya çıkmaları ve patojenik mikroorganizmaların artan dirençliliğiyle baş etmek için çeşitli tıbbi bitkilerin antimikrobiyal özellikleri izlenmektedir. Aromatik tıbbi bitkilerden derivate edilen uçucu yağların bakteriler, mayalar, filamentli mantarlar ve virüslere karşı oldukça iyi antimikrobiyal etkiler sergiledikleri rapor edilmektedir (180). Hayvan ve bitki dokularında doğal olarak meydana gelen antimikrobiyal ajanlar, muhtemelen, mikroorganizmalar tarafından işgaline karşı geliştirdikleri savunma mekanizmalarının bir parçası olarak ortaya çıkmıştır. Doğal antimikrobiyaller bitkilerin kabuk, kök, meyve, yaprak ve çiçeklerinden, çeşitli hayvan dokularından veya mikroorganizmalardan elde edilebilmektedirler. Doğal antimikrobiyallerin kaynakları otlar, baharatlar, meyveler, süt, yumurta ve gıda fermentasyonunda kullanılan LAB'dir (202).

Yasal otoriteler zayıf organik asitler, hidrojen peroksit, bazı şelatörler ve birkaç antimikrobiyal bileşiğin gıdalarda bulunmasına izin vermektedir. Bu bileşiklerden bazıları da baharatlarda doğal olarak bulunan kekik, dereotu, dağ kekiği, karanfil ve onların uçucu yağlarıdır (43). Doğal ürünler, uzman birliği

tarafından destek sağlanması kaydıyla GRAS (Generally regarded as safe- genel olarak kullanımı güvenli kabul edilen) statüsünde değerlendirilirler (88). 1958 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de kabul edilen Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde lezzet maddelerinin katkı maddesi olarak kabulü göze çarpmaktadır. Bu yönetmelikle ilgili olarak hazırlanan liste GRAS olduğu kabul edilen birçok maddeyi içermektedir. Bu liste doğal lezzet maddelerini, baharatları, doğala özdeş lezzet maddelerini ve bazı çok bilinen yapay lezzet maddelerini de kapsamaktadır (76). Avrupa ülkelerinde lezzet verici olarak uçucu yağlar güvenli maddeler olarak bilinirler. Carvacrol, carvone, cinnamaldehyde, citral, p-cymene, eugenol, limonene, menthol ve thymol bu grupta olmakla birlikte iki uçucu yağ bileşiği estagole ve methyl eugenol genotoksik olmaları nedeniyle 2001'de bu güvenlik listesinden çıkarılmışlardır (45). 1992 yılında yayınlanan Kodeks Alimentarius- Genel Gereksinimler- Cilt-1'de doğal lezzet maddelerine yer verilmiştir. Burada, doğal lezzet maddeleri insan tüketimine uygun fiziksel, mikrobiyolojik veya enzimatik proseslerle hayvansal veya bitkisel ham maddelerden üretilen maddeler olarak tanımlanırken, doğal aromatik ham maddeler olarak baharatlar ve yabani otlar belirtilmiştir (76). Et ürünleri tebliğinde de lezzet vericiler olarak insan tüketimine uygun baharatlar, aromatik bitkiler veya bunların özütlerinden bahsedilir (221). TKG Yönetmeliği'nde ise baharat, çeşitli bitkilerin tohum, çekirdek, meyve, çiçek, kabuk, kök, yaprak gibi kısımlarının bütün halde ve/veya parçalanması, kurutulması, öğütülmesi ile elde edilen, gıdalara renk, tat, koku ve lezzet verici olarak katılan doğal bileşikler veya bunların karışımı olarak ifade edilir (219). Baharat ve yabani otlar toplanıp kurutulduktan sonra belirli partikül büyüklüğüne öğütülerek kullanılırlar. Baharat ve yabani otları birbirinden kesin olarak ayırmak zor olsa da genel olarak aromatik sebze ürünleri baharat, bitki kökleri söz konusu ise yabani ot ifadeleri kullanılmaktadır. Baharatların lezzet özelliğini veren maddeler, aroma veren uçucu bileşikler (uçucu yağlar) ile uçucu olmayan tat (alkoloidler gibi) ve renk (karotenoidler gibi) maddeleridir (14, 76). Bazı bitkilerin çiçek, meyve, tohum ve gövde kısımlarından elde edilen, kendine özgü aroma ve çeşni oluşturan maddeler olan baharatlar, içerdikleri antimikrobiyal maddeler, eterik yağlar, aromatik bileşikler ve diğer maddelerle ürünün renk, dayanıklılık, lezzet ve sindirilebilme yeteneği üzerinde etkili olmaktadır (60).

Bitkilerin uzun süre depolamaya veya işlemeye bağılı olarak taze ve sezonunda hasat edilen ürünlere göre önemli ölçüde fenolik ve askorbik asit içeriklerinin düşmesi ve antioksidan kapasitelerinin orantılı olarak azalması söz konusudur (158). Baharat ve yabancı otların lezzet verici özelliklerinin yığından yığına ve mevsimsel olarak değişmesi, yeni üründe yoğun fakat sonrasında azalan lezzete sahip olmaları ve uygun koşullarda dezenfekte ve muhafaza edilmedikleri durumlarda gıdada mikroorganizma yükünün artmasına neden olabilmeleri gibi dezavantajları vardır (76). Bu nedenle, bitki materyalinin seçiminde bilimsel kriter kullanılmalı; bölge, mevsim, tarih ve günün zamanını içeren toplama spesifiklerini içermelidir (182).

Birçok üründe olduğu gibi baharatlar da çok sayıda farklı kimyasal bileşik içermektedirler. Baharatların kendisinin kullanılması halinde bu bileşikler de vücuda alınacağından, bazı durumlarda önem taşıyabilirler. Geçmişte pek çok gıdada bütün olarak kullanılmalarına rağmen günümüzde katkı olarak kullanımları ekonomik sayılmadığı için yerlerine uçucu yağları ve oleoresinleri gıdalara katılmaktadır (14). Bunun için aktif bileşiklerin izolasyonu bitkinin bilinen aktivitesinin ışığında yapılmalıdır. Böylece, fraksiyonların ve bileşiklerin aktivitesi toplam ekstrakt veya fraksiyondan aşağıda olduğunda, bu, bitkinin bilinen infeksiyona etkili özelliklerini teyit etmelidir (182).

Doğal sağlık ajanları olarak uçucu yağların teknolojik uygulamalarında, gıdaların hasat sonrası işlemlerinde gıda patojenlerini azaltmak için optimal şartların kurulması gereklidir. Bu şartlar patojenin hassasiyeti, uygun konsantrasyon, yağ ve patojen arasındaki temasın uygun zamanı gibi şartlardır (146). Yenilebilir şifalı bitki ve baharatlar Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin birçoğuna karşı antimikrobiyal ajan olarak, gıda maddeleri raf ömrünü uzatmak için direkt veya indirekt etkiler sergilerler. Bununla birlikte, etkinlikleri pH, ürünün işleme şartları, depolama sıcaklığı, oksijen miktarı, uçucu yağ konsantrasyonu ve aktif bileşiklerine bağlıdır (90, 99). Genel olarak, baharat ve baharat ekstraktları mikrobiyal gelişmenin tüm aşamalarında etkili olmaktadır. Bunların kullanımı ile lag faz uzar, logaritmik fazda üreme hızı azalır ve toplam hücre sayısı düşer (76). Doymamış yağ asitlerinin oksijenasyonunun neden olduğu yağ asidi hidroperoksidaz oluşumu, bakteriyel genetik materyali tehlikeye atmak, enzim sistemlerini aksatmak ve hücre

membranının fosfolipit çift katmanına saldırmak şeklinde çeşitli antimikrobiyal mekanizmalarla mikrobiyal hücreleri etkilerler (20).

Uzun yıllardır uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri bilinmektedir. Buna karşın, yakın zamanda 500'den fazla çalışmada onların ve bileşiklerinin bazı bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Baharatların çoğunun Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili oldukları bildirilmektedir. Bununla birlikte, sağlıklı şartlarda işlenmiş ve mikrobiyal yükü az olan gıdaların küf, Gram pozitif bakteri ve bir ölçüde de Gram negatif bakterilere karşı korunmasında önemli bir antibakteriyel katkı sağlayabilecekleri gösterilmiştir (74, 115). 38 çeşit baharatın karbondioksit ekstraksiyonu ile elde edilen uçucu yağlarının *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Penicillium crysogenum*, *Candida kruse* ve asitotolerant mikroorganizmalar olan *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, *Aspergillus glaucus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida haemulonii*'ye karşı antimikrobiyal etkileri incelendiğinde en çok etki gösterenler şerbetçiotu, defne yaprağı, karanfil, adaçayı, kekik, andızotu, tarhun, yaban kerevizi ve yabani mercanköşk olarak belirlenmiştir (74). Kekik, dağ kekiği, nane, tarçın, adaçayı ve karanfil uçucu yağlarının test edilen birçokları arasında güçlü antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları bulunmuştur (115). Başka bir çalışmada bitkilerin su ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini araştırmak için kuşburnu, hibiskus, sumak, kekik, karanfil, oğul otu, günlük, yeşil çay, ihlamur, yasemin, siyah çay, papatya, ısırgan, hazanbel, aspir, zencefil, meyan kökü, nane, biberiye, karabaş otu, mayasıl otu, adaçayı, sinameki, mercanköşk, kişniş ve rezene ile çalışılmıştır. Bunların arasında, test edilen *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* ve *S. aureus*'a karşı en etkili ekstraktların sırasıyla kuşburnu, hibiskus, sumak, kekik, karanfil, oğul otu ve günlük olduğu belirlenmiştir (69). Kekik, karanfil, biberiye ve defne hidrodistilatlarının birçok bitki hidrodistilatlarından daha etkili olduğu bulunmuştur. Patogen bakterilerin diğer kokuşma yapan bakterilerden daha dirençli olarak tespit edildiği çalışmada, kokuşmada başlıca rol alan bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkinin daha güçlü ortaya çıkması ile etlerin yüzeylerinin kokuşmaya karşı dekontamine edilmesinin patojenik bakterilere karşı dekontamine edilmesinden daha kolay olabileceği sonucuna varılmıştır (11). Başka bir kaynakta da genellikle uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri etkinlik sırasına göre dağ kekiği > karanfil

> kişniş > tarçın > kekik > nane > biberiye > hardal > cilantro/ adaçayı şeklinde sıralanmaktadır (45). Tablo 6’da antimikrobiyal aktiviteye sahip bazı baharat, şifalı bitki ve yağların temel aroma bileşikleri ve bakteriyel inhibisyon oranları verilmiştir.

Tablo 6: Baharatlar, Şifalı Bitkiler ve Yağların Antimikrobiyal Aktiviteleri (211).

Kategori	Türler	Bitki Bölümü	Temel Aroma Bileşeni	Bakteriyel İnhibisyon %
Şifalı Otlar	Fesleğen, Sweet (Ocimum basilicum)	Yapraklar	Linalool/ metil chavicol	<50
	Dağ Kekiği (Origanum vulgare)	Yapraklar/ çiçekler	Carvacrol/ Thymol	75- 100
	Biberiye (Rosmarinus officinalis)	Yapraklar	Camphor/1,8-cineole/ borneol/ camphor	75- 100
	Adaçayı (Salvia officinalis)	Yapraklar	Thujone/1,8-cineole/ borneol/ camphor	50-75
	Kekik (Thymus vulgares)	Yapraklar	Thymol/ carvacrol	75- 100
Baharat	Yeni bahar, Tatlı kırmızı biber (Pimenta diocia)	Meyve/ yapraklar	Eugenol/ β-caryophyllene	75- 100
	Tarçın (Cinnamomum zeylanicum)	Kabuk	Cinnamic aldehyde/ eugenol	75- 100
	Karanfil (Sygium aromaticum)	Çiçek tomurcuk	Eugenol	75- 100
	Hardal (Brassica)	Çekirdek	Allyl isothiocyanate	50- 75
	Küçük Hindistan Cevizi (Myristica fragrans)	Çekirdek	Myristicin/ α-piene/ sabinene	50-75
Yağlar	Vanilya (Vanillia planifolia, V. pompona, V. tahitensis)	Meyve/ çekirdek	Vanilin	-
	Zeytin yağı	Meyve	Oleuropein	-
	Çay ağacı yağı (Melaleuca alternifolia)	Yapraklar	Terpenoidler	-

Et ürünlerinde baharatların kullanılmasını ham madenin yapısı, et- yağ- su oranı, ham maddeye uygulanan ön işlemin şekli, kürlleme ajanı kullanılıp kullanılmadığı, parçalama aşamasının derecesi ve yapısı, karıştırma öncesi yapılan uygulama, pişirme, tütüleme, uygulanan ısı ve süresi, kullanılan koruyucunun yapısı, paketleme şekli ve depolama koşulları gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Et ürünlerine baharat karışımlarının katılmasının ana sebebi lezzeti artırmaktır. Genel olarak, yabani ot ve baharatların çeşitli boyutlarda öğütülerek karıştırılması ile elde edilen karışımların yanı sıra baharat ekstraktları da kullanılmaktadır. Lezzet

karışımlarındaki uçucu madde kayıplarını önlemek için püskürtmeli kurutma ile hazırlanan enkapsüle baharat ekstraktları da uzun raf ömrüne sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler (76).

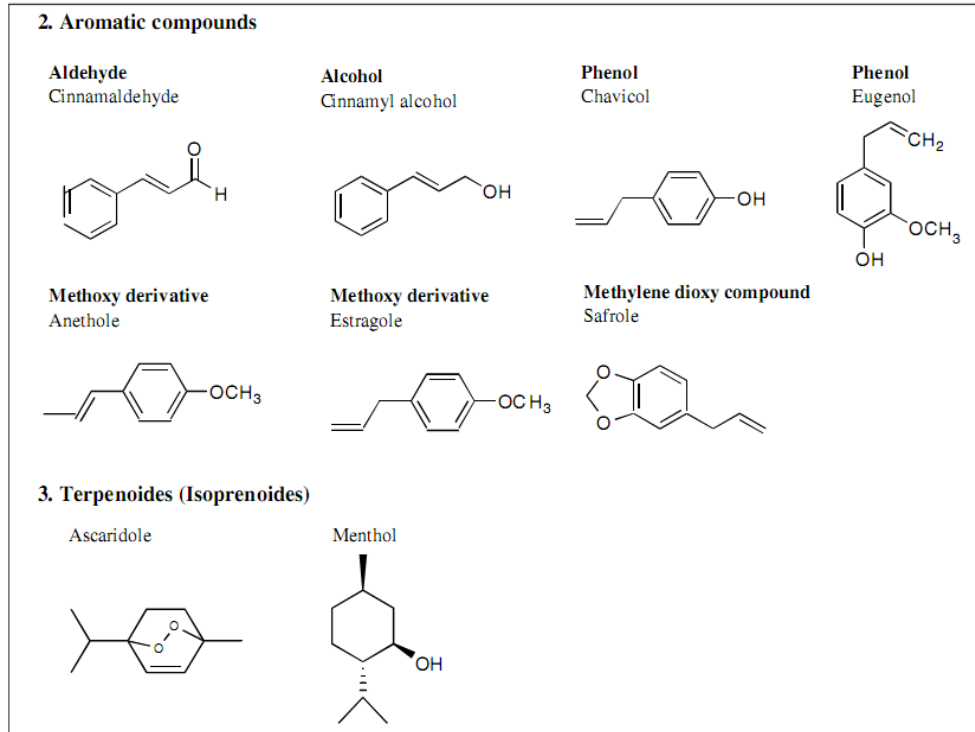
Gıdaların kimyasal kompozisyonu, kullanılan antioksidanlar ve koruyucular, muhafaza şartları ve ambalaj özellikleri uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine etki etmektedir (45). Genelde, baharatların etkinlikleri kültür ortamlarına göre gıda maddeleri içinde azalmakta ve pratikte kullanılan dozlarda kullanıldığında gıdaları korumada yetersiz kaldıkları görülmektedir (45, 76, 160). Yine de, tek tek kullanımlarına göre etkili olduğu bilinen baharat karışımlarının diğer antimikrobiyallerle ve işlemlerle kombine etkilerinin olabileceğinin dikkate alınması gerektiği bildirilmektedir (76). Doğal antimikrobiyallerin daha kapsamlı kullanımlarını sağlamak için;

- Gıda ve gıda sistemlerinde etkinlik ve işlevselliğini,
- Gıda formülasyonlarında toksikolojisini ve güvenliğini,
- Mikroorganizmalara karşı etki mekanizmalarını,
- Gıda kalitesine etkilerini (örneğin beslenme ve duyu etkileri),
- Ticari formülasyonlarda uygulama metodlarını,
- Ekstraksiyon, izolasyon ve ekonomik üretim yöntemlerini araştırmak gereklidir (202).

1.5.12.2. Uçucu Yağlar

Son yıllarda doğal maddelerin kullanımına yönelik ilgi artmaktadır. Sentetik bileşiklerin güvenliği ile ilgili sorular bitki kaynaklarının daha detaylı çalışılmasını teşvik etmiştir. Bitki sekonder metabolizma ürünleri olan uçucu yağlar, gıda aroması, koruma ve geleneksel tıpta geniş bir uygulama alanı bulmaktadırlar (115). Günümüzde bilinen yaklaşık 3000 uçucu yağın yaklaşık %10'u özellikle eczacılık, ziraat, gıda, kozmetik ve parfüm endüstrileri için ekonomik açıdan önem taşımaktadırlar (27). Uçucu yağlar, bitki materyalden yapraklar, kabuk veya meyveleri gibi özellikle bir bölgede yoğunlaşmış olarak bulunan özel hücreler veya hücre gruplarından şekillenen aromatik ve uçucu karakterde yağlı sıvılardır (166).

Bitkilerde oluşan su buharıyla uçabilen ve oda ısısında genellikle sıvı halde renksiz, veya açık sarı renkte, elde edildiği bitkiye özgü kuvvetli koku ve yakıcı lezzete çok sayıdaki bileşenden oluşan doğal ürünlerdir. Yetiştirme şartları, hasat, damıtma şekli gibi birçok etkene bağlı olarak değişen farklı bileşim gösterirler. Hidrokarbonlar ve oksijen içeren hidrokarbon türevleri olarak basitçe iki fraksiyondan meydana gelmektedirler (14, 76). Bitkisel materyalin özelliğine göre ekstraksiyon, distilasyon, presleme, enzimoliz, enflörasyon gibi değişik yollarla elde edilebilirler (14). Aromatik tıbbi bitkilerden daha çok distilasyonla ve ekstraksiyonla elde edilen bu yağlar, birçok uçucu moleküller, terpenler, fenol derivatifi aromatik bileşimler ve alifatik bileşimleri içerir (27). Tıbbi bitkilerle ilgili olarak son zamanlarda yapılan çok sayıdaki araştırma ile uçucu yağlar veya alkaloidler, flavonoidler, sesquiterpenler, laktonlar, diterpenler, triterpenler veya naftokinonlar gibi izole edilmiş birçok bileşik bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini belirleyen noktalardır (182).



Şekil 1: Uçucu Yağların Bazı Bileşiklerinin Kimyasal Yapıları (27).

Bir uçucu yağın kokusu çok sayıda bileşenin bir araya gelmesinden oluşmaktadır. Bazen ise tipik ve ayırt edici koku özelliğini karanfilde eugenol, tarçında cinnemaldehit, kekikte thymol gibi tek bir bileşen vermektedir. Uçucu yağa deterpenasyon (terpenleri giderme) uygulandığında kalan kısmın oksidasyona daha dayanıklı, alkol- su çözünlüğü yüksek, berrak ve lezzet açısından daha konsantre olduğu saptanmıştır. Terpen içermeleri dolayısıyla pek çoğunun derişik alkolde çözünlükleri yüksek, suda çözünlükleri düşüktür. Baharat ve yabani otların uçucu yağları, dolayısıyla karakteristik aromaları yoğun olarak uçucu yağ fraksiyonuna geçtiğinden genellikle tercih sebebidirler. Çoğu antioksidan madde bulundururlar (14, 76). Uçucu yağların kuru baharatlara oranla lezzet potansiyelleri aşağıdaki Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Bazı Uçucu Yağların Baharatlara Göre Lezzet Eşdeğerleri (14).

Baharat	Baharat Eşdeğeri kg¹
Karanfil	15.0
Rezene tohumu	5.0
Kakule	5.0
Dereotu tohumu	4.0
Kimyon	3.0
Defne	2.0
Kekik	2.0
Adaçayı	1.25
Karabiber	1.0
Seylan tarçını	0.5
Hardal tohumu	0.25
Reyhan	0.15

¹100 kg kuru baharat veya yabani ota eşdeğer uçucu yağın kilogram cinsinden miktarı.

Yakın zamandaki çalışmalar, uçucu yağların, ökaryotik hücrelerin hücre membranlarında ve mitokondri gibi organellerinde prooksidan gibi rol oynayabileceğini göstermiştir. Uçucu yağlar, tip ve konsantrasyona bağlı olarak,

yaşayan hücrelerde sitotoksik etki gösterirler. Bazı durumlarda, uçucu yağlarla intraselluler redoks potansiyelinde değişiklik ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olabilir. Bu bulgular, uçucu yağların yararlı etkilerinin hücresel düzeydeki prooksidan etkilerine bağlı olduğunu göstermektedir. Prooksidan bir aktiviteye dayanan uçucu yağların sitotoksik kapasitesi onları hava arındırma, kişisel hijyen veya oral tüketim yoluyla kullanımlarda ve mahsül veya gıda stoklarının korunması için insektisit olarak kullanımlarda mükemmel antiseptik ve antimikrobiyal ajanlar yapar. Ayrıca, uçucu yağların büyük bir avantajı genellikle uzun vadeli risklerinin olmayışdır (27).

Bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde birçok yöntem kullanılabilir. Disk difüzyon metodu, uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini izlemek için en sık kullanılan tekniklerden biridir. Bu metotta, uçucu yağ emdirilmiş bir kağıt disk besiyerinin yüzeyinde yer alır ve mikrobiyal inhibisyonun zonu ölçülür (39). Antibakteriyel etkinliği belirlemek için temel yöntemler olan dilüsyon metod (agar ve sıvı broth) ve agar difüzyon metod (kağıt disk ve kuyu) kadar test edilen uçucu yağların varlığında mikroorganizma üremesinin turbidimetrik ve impedimetrik izlenmesi de uçucu yağların antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (115). Damla-agar- difüzyon metodu, broth mikrodilüsyon metodu, agarda direkt temas tekniği de kullanılan diğer tekniklerden bazılarıdır (211). Yine, optik dansite (bulanıklık) ve kolonilerin sayımı da uçucu yağ çalışmalarında oldukça fazla kullanılan metotlardandır. Redoks indikatör resazurin, son zamanlarda yeni bir mikrodilüsyon metodu olarak kullanılmaktadır (45). Disk difüzyon metodunda *E. coli*'ye karşı denenen 6 baharattan hardal, karanfile göre daha başarılı olmuşken, kuyucuk metodunda yine bu baharatlar arasında karanfil en etkili baharat olarak bulunmuştur (201). Farklı metodlara göre yayınlanmış verinin karşılaştırması; kültür ortamı, inokulumun boyutu, emülsifiyer ve temel test metodunun seçimi, ekstraksiyon metoduna göre çeşitliliğin artmasıyla karmaşıklaşır (201). Kağıt diske emdirilen uçucu yağ miktarı, agar tabaka ve solventin inceliği gibi parametreler sonucu etkileyebilir. Farklı çalışmalarda kullanılan etanol, metanol, tween 20, tween 80, tween 80 + aseton kombinasyonu, polietilen glikol, propilen glikol, n- hekzan ve dimetil sülfoksit gibi farklı solventler karşılaştırmalarda zorluk çıkarabilir (39).

Yağ asitleri ve uçucu yağların kabul edilebilir konsantrasyonlarda seçici aktiviteleri ve/veya düşük aktiviteleri nedeniyle koruyucu olarak kullanımları sınırlıdır. Bununla birlikte, gıdalarda korumadan daha çok diğer amaçlar için uygun bulunurlar ve kullanılırlar (197). Uçucu yağların gıdalar ile birlikte kullanımlarındaki, gıdaya direkt olarak katılmalarındaki en önemli sorunlardan biri de bakteri popülasyonunu düşürebilmelerine karşın kattıkları güçlü kokunun yanı sıra kimi gıda bileşenleri ile reaksiyona girmeleri nedeniyle gıdadaki organoleptik değişikliklerdir. Gıdaya arzu edilmeyen yeni duyuşsal özellikler kazandırabilmektedirler (45, 191). Gıda ürünlerinin duyuşsal kalitesinde önemli oldukları için bir antimikrobiyal ajan olarak kullanımları çoğunlukla sınırlıdır (198). Organoleptik etkiyi azaltmak için; kombine metotları kullanmak, gıda formülasyonunu optimize ederek gıdada baharat/ şifalı ot/ uçucu yağ varlığının algısını minimize etmek ve uçucu yağ ile bakteriyel hücre membranı arasında etkileşimi artırmak için kalibre edilmiş bir buhar basınç kapasitesi geliştirmek gibi muhtemel yollar da bildirilmektedir (128). Bununla birlikte, gıdaların kimyasal bileşimi, kullanılan antioksidanlar ve koruyucular, muhafaza şartları ve ambalaj özellikleri uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkilidir. Uçucu yağların aktivitesinin in vitro çalışmalarda daha yüksek olmasına karşın gıdalarda davranışlarının in vitro model tahminlerinden dramatik bir şekilde farklı olabileceği dikkate alınmalıdır (43, 45, 160).

1.5.12.2.1. Karanfil

Karanfil'in (*Syzygium aromaticum*) kuru çiçek tomurcuklarının buhar distilasyonu ile açık sarı renkli % 7 oranında yağ elde edildiği ve eugenol ana bileşen olmak üzere eugenol acetate, caryophyllene ve α - humelene'i içerdiği bildirilmiştir (25). Karanfil yağının ana bileşenleri genel olarak, oranlarına göre eugenol, β -karyofilen, α - humulen ve humulen epoksit olarak sıralanmaktadır. Karanfil yağındaki hoş kokulu, kuvvetli antiseptik ve analjezik bir madde olan eugenol oranı bitkisel materyal ve ekstraksiyon metoduna bağlı olarak % 68 ile % 94,4 arasında değişebilmektedir (83, 114). Oussalah ve ark. (165) karanfilin ana bileşenlerini %

78,00 eugenol ve % 13,77 eugenol acetate olarak belirlemiştir. Karanfil tomurcuklarının GC- MS kullanarak n-hexane ekstraktından 16 uçucu bileşik tanımlanmıştır. Temel bileşenler eugenol (% 71,56) ve eugenol acetate (% 8,99) olmakla birlikte caryophyllene oxide (% 1,67), p- cymene (% 0,9), nootkatin (% 1,05), guaiol (% 0,90) ve thymol (% 0,87) gibi bileşikler de belirlenmiştir. Tomurcukların diklorometan ekstraktı eugenolle birlikte bir tetrahentriterpen olan limonin ve bir aromatik aldehit olan ferulic aldehit de rapor edilmiştir (151). Karanfil (*Syzygium aromaticum*) ve tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) uçucu yağları 23 bileşik (yağın % 97,8- 99,9'u ile temsil edilen) benzer bir kompozisyon göstermektedirler (114). Bir başka çalışmada ise GC ve GC- MS ile analiz edilerek karanfil tomurcuğu ekstraktından 22 bileşik tanımlanmıştır (Tablo 8) (131).

Tablo 8: Karanfil Ekstraktından Tanımlanan Aroma Kimyasalları (131).

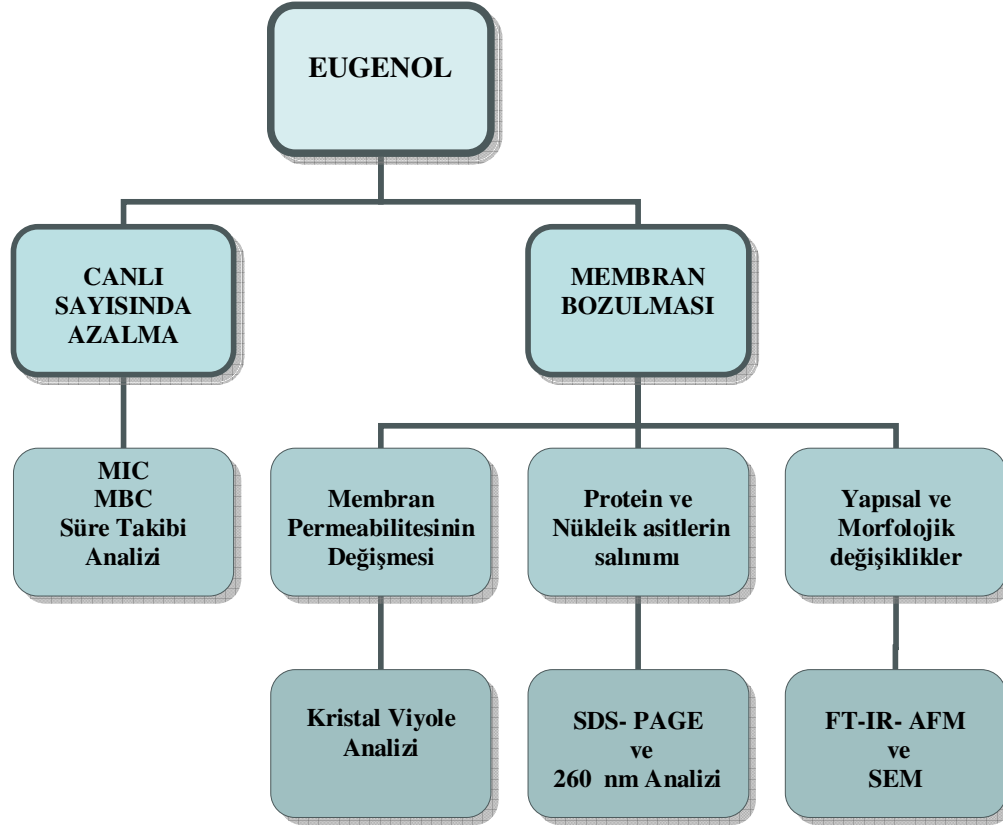
Konsantrasyon (mg/g)	Bileşik
1- 0.004	2-Heptanone
2- 0.001	3-Pyrrolidinol
3- 0.002	2-Heptanol
4- 0.002	2-Butenal
5- 0.004	2-Methylpentanal
6- 0.003	3(2H)-Pyridazinone
7- 0.162	1-Acetyloxy-2-propanone
8- 0.004	1-Acetoxy-2-propanol
9- 0.003	Methylbenzoate
10- 0.002	Benzylaldehyde
11- 0.003	Ethylbenzoate
12- 0.016	Phenylmethyl acetate
13- 0.033	Salicylic acid
14- 0.003	Benzyl alcohol
15- 0.136	2-Methyl-5-(1-methylethenyl)-cyclohexyl acetate
16- 0.005	(E,E)-2,4-heptadienal
17- 24.371	Eugenol
18- 0.004	Trans-isoeugenol
19- 2.354	Eugenyl acetate
20- 0.019	2-(1,1-Dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione
21- 0.043	2,5-Dimethylanisole
22- 0.126	Isophthalaldehyde

Eugenol, carvacrol ve thymol patojenik bakterilere karşı yüksek aktiviteye sahip olan fenolik bileşiklerdir. Bu yağların başlıca kimyasal yapıları özellikle

monoterpen fenolikler ve monoterpen hidrokarbonlardır (166). Alkolik, aldehidik veya karboksilik bir grup ile monosiklik aromatik bir halkaya sahip olan bu basit fenolik bileşikler kısa hidrokarbon zincir yapısındadırlar (88). Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi bitki uçucu yağlarının ilgili kompozisyonu ve yapısal konfigürasyonu, onların fonksiyonel grupları ve bileşenlerinin arasındaki muhtemel sinerjik etkileşimlerle ilgilidir (68). Antimikrobiyal aktivitesi ağırlıklı olarak temel bileşiği ile ilgilidir. Özellikle carvacrol, thymol veya eugenol gibi fenolik monoterpenler, *p*-cymene, γ -terpinene, α -pinene veya limonene gibi monoterpenik hidrokarbonlar, borneol, linalool, 1,8-cineole veya geraniol gibi alkol terpenoidler, cinnamaldehyde, geraniol veya citronnellal gibi aldehitler, piperitone veya carvone gibi ketonlar, test edilen uçucu yağlardan tanımlanmış temel bileşikler olarak görülürler (165). Uçucu yağların büyük bileşenleri % 85 üzerinde bir yapıda olurlar ve diğer bileşenler de genellikle iz düzeyde bulunabilmektedirler (45).

Karanfil, tarçın, hardal, zencefil vb. baharatlar patojenleri inhibe eden veya öldüren doğal inhibitör mekanizmaları yoluyla hareket ederler. Antimikrobiyal ajanlar olarak ve potansiyel koruyuculukları ile gıda katkıları olarak kullanılabilirler (201). Antimikrobiyaller, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak iki temel öldürme aktivitesi sergilerler. Eugenol'ün etkisinin öncelikli mekanizması bakteriyel membranın bozulması yoluyla. Böylece, antibiyotiklerin spesifik olmayan permeabilitesi yükselir (98). Karanfil yağının ana bileşeni olan eugenol'ün bakterilerde enzim sentezine engel olduğu, hücre duvarının yapısını bozduğu ve hücrenin lize olmasına neden olduğu bildirilmiştir (214). Dış membrana güçsüzce penetre olan kristal viyolenin membran bozulduğunda kolayca alımı ile eugenol'ün membran permeabilitesini yükselttiği gösterilmiştir. SDS- PAGE, elektron mikroskop tarama (SEM) ve atomik güç mikroskopi (AFM) ile stoplazmik membranda eugenolün yıkıcı etkisi onaylanmıştır. Eugenol ile muamele sonucu membranda makromoleküllerin deformasyonu FT- IR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. İntrasellüler bileşiklerin sızıntısı, plazma membranında porların oluşumuna neden olan eugenol'ün kritik etkisini gösterir. Bu hiperpermeabilite intrasellüler proteinleri kapsayan diğer hücresel içeriğin kapsamlı kaybı ve iyonların kaçışı ile devam eder ve hücre ölümü gerçekleşir. Bu sonuca göre *S. typhi*'ye karşı eugenol'ün antibakteriyel etkisinin bakteriyel hücre membranında interaksiyon

olduğu gösterilmiştir (65). Eugenol'ün antibakteriyel aktivitesi ve etki şekli, Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Eugenol'ün Antibakteriyel Aktivitesi ve Etki Şekli (65).

Karanfilin kurutulmuş çiçek tomurcuklarının ekstraktından elde edilen uçucu yağı, iyileşmeye katkıda bulunmak ve topikal olarak ağrıyı gidermek için kullanıldığı gibi aroma ve parfüm endüstrisinde de kullanım olanağı bulur. Karanfil antimikrobiyal, antioksidan, antifungal ve antiviral aktivitesine ilave olarak antiinflamatuvar, sitotoksik, insekt kovucu ve anestezik özelliklere de sahiptir (51). Son yıllarda çalışılan karanfilin tansiyon düşürücü, diüretik etkilerinin yanında (228) arteroskleroz ve trombozisi içeren kardiyovasküler hastalıklar, kanser gibi hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde rol alan hipolipidemik, antilitojenik, antidiabetik,

antiinflamatuvar, antimutojenik, antikarsinojenik ve antioksidan potansiyelleri nedeniyle baharatların önemi vurgulanmaktadır (31, 73, 207). Karanfil etanol ekstraktının antiinflamatuvar ve antibakteriyel etkilerine ilave olarak ağrı hissini azaltıcı ve yangı giderici, lokal anestezi kullanımı destekleyici sonuçları da mevcuttur (1, 98, 212). Karanfil yağı ve eugenol antimikrobiyal etkisinin yanı sıra farklı biyolojik aktiviteleri ile antiinflamatuvar ve lokal anestezi etkilerinden dolayı diş hekimliğinde, kozmetik ve aroma endüstrisinde yaygın olarak kullanım alanı bulmaktadır (30, 83, 88, 177). Yaygın bir mutfak baharatı ve ev tarzı bir ilaç olan karanfil yağından eugenol ve asetil eugenol, iki antiplak bileşik olarak tanımlanmıştır (208). İnsan kan hücreleri ile yapılan deneyler, kombinasyon çalışmaları için kullanılan eugenol konsantrasyonunun sitotoksik değerlerin altında olduğunu göstermiştir (98). Uçucu yağların uygun dozlarda tüketildikleri takdirde zararlı etkilerinin çok düşük olabileceği ve potansiyel olarak hasarlı intestinal hücrelerin büyük çoğunluğunun apoptotik yolla kendi kendini elimine edebileceği düşünülmektedir (71). Karanfilin konstipasyon tedavisinde, anti ülser ve müshil etkili bir ajan olarak kullanılabilirliği de gösterilmiştir (5). Diyabetik hastalarda insülin taklitçi ajanlar olarak karanfilden elde edilen bileşiklerin potansiyel yararlı etkilerinin olabileceği sonucuna varılmıştır (176).

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen son derece toksik mikotoksinler olan aflatoksinler gıda ve yemlerin doğal kirleticisidirler. Aflatoksinlerin farklı hayvan türlerinde hepatotoksik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik olduğu gösterilmiştir. Aflatoksikozis sırasında üretilen serbest radikalleri yakalama amacıyla çörek otu (*Nigella sativa*) ve karanfil yağının etkileri araştırılmış ve aflatoksinle kontamine bir diyetle beslenen sıçanlarda önemli bir koruma sağladıkları görülmüştür (1). *Aspergillus niger*, fırsatçı bir insan patojeni ve güçlü bir hava kirleticidir. *A. niger*'in spor oluşumu ve hif büyümesinin inhibisyonu için 75 farklı uçucu yağ ile yapılan bir çalışmada tarçın (kabuk ve yaprak), Çin tarçını, karanfil ve limon otu'nun en belirgin inhibisyon sağlayan beş uçucu yağ olduğu ortaya konmuştur (171). Mısır tanesinde farklı a_w şartlarında *Aspergillus*'a karşı anason, boldus, dağ kekiği, karanfil ve bir çeşit nane uçucu yağlarının etkinliğinin konsantrasyona, maddenin a_w değerine ve inkübasyon periyoduna bağlı olduğu

görülmüştür. Bununla birlikte bütün uçucu yağlar AFB1 birikiminde belirgin etki göstermiştir (37).

Orta nemlilikteki gıdalarda dört küf; *A. flavus*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor plumbeus* ve *Eurotium spp.*, dört maya; *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxii* ve *Candida lipolytica* ve iki bakteri; *S. aureus* ve *Pediococcus halophilus*'a karşı N₂ ile dengelenmiş modifiye atmosfer altında 1000 - 4000 µl tarçın ve karanfil yağlarının inhibitör etkisi incelendiğinde O₂ konsantrasyonunun % 10'dan % 0,05'e azaltılması ve CO₂ konsantrasyonunun % 20'den % 40'a yükseltilmesi ile yağların inhibitör etkilerinin yükseldiği görülmüştür. Yağların düşük O₂ (% 0,05) ve yüksek CO₂ (% 40) ile kombine kullanılmaları sonucu *S. aureus*'un gelişmesi 41 gün, *P. halophilus*'un gelişmesi 38 gün geciktirilmiştir. Tarçın ve karanfilin yüksek oranları (4000 µl), toksin ürettiği bilinen ve en dirençli bulunan *A. flavus* da dahil, daha etkili bulunmuştur (141). Yapay olarak *A. parasiticus* inokule edilen % 9,3 nem içeren yerfıstığı içleri için koruyucu olarak % 3 Afrika fesleğeni ve karanfil tozları çeşitli paketleme metotları ile kombine olarak kullanılmış ve % 6,6 nem içeren ve doğal mikrofloralı içlerle eş zamanlı olarak izlendiğinde karanfil tozu ile insekt infestasyonu önlenmiş ve 4 ay % 100 mantardan koruma sağlanabilmiştir (22). *Penicillium citrinum* üremesinin ve citrinin toksini üretiminin inhibisyonunu içeren İspanyol peynirleriyle yapılan bir çalışmada eugenol'ün katı kültür ortamında koloni büyüme oranını azalttığı ve büyüme lag zamanını 9 güne çıkardığı görülmüştür. Sıvı ortamda fungal büyümenin tamamen bir inhibisyonu gözlenmiştir. 100 µl/ml eugenol, citrinin üretimini 6. güne kadar geciktirmiştir. Arzua- Ulloa peynirinde (bir çeşit İspanyol peyniri) 150 µl/ml eugenol konsantrasyonunda citrinin'e rastlanmamıştır (233). Karanfil yağı ve eugenol, *Candida*, *Aspergillus* ve *Dermatophyte*'e karşı etkili olmuşlar, spesifik bir mantar hücre membran bileşeni olan ergosterol miktarında önemli bir azalma sağlamışlardır. MIC düzeylerin altındaki miktarlarda *Candida albicans*'ın oluşturduğu jerm tüpü oluşumunu tamamen veya tamama yakın olarak inhibe ettikleri, Fluconazole dirençli suşlar da dahil, klinik mantarlara karşı oldukça etkili antifungal aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (173).

Patojenik organizmalar tarafından antibiyotik direncinin gelişimini azaltmak için yeni metodlar bulmak gittikçe önem kazanmaktadır. Bitkilerden fenolik ve

fenolik olmayan bileşiklerin antibiyotiklerin MIC düzeyini azaltma yoluyla konakçıda veya kontamine gıdada bakterilere karşı antibiyotiğe dirençli bakterilerin gelişimini kontrol etmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (98, 170).

Bitki ve baharatlar gıdalardaki antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini önlemede önemli bir rol oynarlar. Gıdalarda yaygın olarak kullanılan karanfil, meyan kökü, Hindistan cevizi ve kakulenin konsantrasyona bağlı olarak lipit peroksidasyonunda etkili oldukları ve prooksidan özellik göstermedikleri bildirilmektedir. Bu baharatlar içinde karanfil, muhtemelen daha yüksek polifenol içeriği nedeniyle en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir (237). Karanfil ana bileşikleri gibi bileşiklerin tüketimi kanser, arterioskleroz, diyabet ve immun yetersizliği içeren birçok hastalıkla ilgili olan lipit peroksidasyonu gibi in vivo oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olabilmektedir (131). Genel olarak, karvakrol, eugenol ve timol gibi fenolik bileşikler yüksek oranlarda içeren uçucu yağlar gıda kaynaklı patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal özelliklerin yanı sıra yapılarındaki flavanoidler ve fenolik asitler gibi fenolik bileşenlerle ilişkili antioksidan etkilere de sahiptir (194). Hekzan ekstraktının dikkat çekici antioksidan aktivitesinin eugenol, eugenol acetate ve thymol gibi fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonunu içermesi nedeniyle olduğu düşünülen karanfilin 50 mg/ml'den 400 mg/ml'ye kadar bütün konsantrasyonlarda uçucu ekstraktlarının radikal yakalama aktivitesinin oldukça güçlü olduğu gözlenmiştir (% 42- 83) (151). Gıda ürünlerinde acılaşmaya neden olan temel proseslerden biri olan lipit oksidasyonunu azaltmanın teknik olarak en basit yollarından biri doğal antioksidanların uygulamasıdır. Oda ısısında çalışılan bütün yağlar (etkinlik sırasına göre karanfil \geq tarçın > küçük Hindistan cevizi > fesleğen \geq dağ kekiği \geq kekik) 2, 2-diphenyl- picrylhydrazyl (DPPH) analizinde iyi radikal yakalama özellikleriyle ortaya çıkmışlardır. 180 °C'de 10 dakika ısıtma ile termik stres sonrası α - tokoferol miktarının çok düşmesi ile antioksidan kapasite etkili bir şekilde azalmıştır. Termal oksidatif bozulmaya karşı zeytinyağını korumak için 200 mg zeytinyağı için 10 μ l uçucu yağın ilavesinde ısıyla uyarılmış α - tokoferol kaybının önlenildiği görülmüştür. Akdeniz tarzı gıdanın hazırlanmasında aromatik özellikleri için geleneksel olarak kullanılan baharatlar, uçucu yağın kimyasal kompozisyonuyla ilgili olarak karanfil > kekik \geq tarçın > fesleğen \geq dağ kekiği >

küçük Hindistan cevizi şeklinde sıralanan serbest radikal yakalayıcı/ antioksidan özellikler sergilemişlerdir (215).

Yaklaşık 1000 çeşit şifalı otun etanol ekstraktlarının süperoksit yakalama aktiviteleri, Elektron Spin Resonans (ESR)- spin tuzaklama metodu ile kapsamlı olarak izlendiğinde, Japon mevzuatlarına göre gıda maddesi olarak kullanılan *Punica granatum* (nar- kabuk), *Syzgium aromaticum* (karanfil- tomurcuk), *Mangifera indica* (mango- çekirdek) ve *Phyllanthus emblica* (amla- meyve) ekstraktlarının göze çarpan bir indirgeme yeteneği olduğu ortaya konmuştur. Bu kapsamlı araştırmanın bir gıda maddesi için güçlü bir antioksidan seçmede yararlı bilgiler verebileceği görülmektedir (187). Başka bir çalışmada kullanılan ekstraktlar ve izole edilen flavonoidler DPPH'e karşı güçlü antioksidan aktivite göstermişlerdir. Test edilen ekstraktlar arasında karanfil'in etanol ekstraktı (% 93), BHT ile karşılaştırıldığında (% 95) dikkate değer yakalama aktivitesi göstermiştir. Bu sonuçlar *S. aromaticum* ekstraktlarının ve izole edilen flavonoidlerinin primer antioksidan ve hidrojen vericiler olarak etkili aktiviteye sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır (151).

Hint baharatlarının aktivitelerini değerlendiren bir başka çalışmada karanfilin meyan kökü, Hindistan cevizi ve kakule tarafından takip edilen en yüksek DPPH radikal yakalama aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Diğer baharatlara göre güçlü antioksidan olarak karanfilin Demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) değerleri de en yüksek olarak bulunmuştur (236). Ayoola ve arkadaşları (25)'de çalışmalarında DPPH ile karanfil yağının antioksidan taramasında, fenolik bir bileşik olan eugenolün varlığına bağladıkları pozitif bir serbest radikal yakalama aktivitesi tespit etmişlerdir. 400 µg/ml düzeydeki karanfil ve okaliptus ekstraktları kan plazma oksidasyonu ile MDA oluşumunda sırasıyla % 48 ve % 23 oranında inhibisyon sağlamışlardır. Güçlü antioksidanlar olarak bilinen α- tokoferol % 52, BHT % 70 inhibisyon sağlamışken aynı düzeydeki eugenol ise MDA oluşumunu % 57 düzeyinde inhibe etmiştir (132). Ilımlı şartlarda (55 °C ve 95 mm Hg) karanfilin aroma ekstraktı 30 gün boyunca heksanal oksidasyonunda inhibisyon sağlamış, 160 µl/ml düzeyde balık yağında oluşan MDA'yı % 93 oranında inhibe etmiştir. Karanfil ekstraktının ana bileşenleri eugenol, eugenyl acetate ve benzyl alcohol 160 µl/ml'de sırasıyla % 88, % 79 ve % 63 ile balık yağında MDA oluşumu inhibisyonu sağlamışlardır. Yine eugenol, eugenyl acetate ve benzyl alcohol 500 µl/ml'de 30

günlük bir periyotda, sırasıyla % 99, % 99 ve % 82 ile heksanal'ın oksidasyonunu inhibe etmişlerdir. Karanfil ekstraktı ve temel bileşenleri α - tokoferol ve BHT kadar güçlü olmasalar da kombine aktiviteleriyle antioksidan etkinlik açısından bu bilinen antioksidanlarla karşılaştırılabilirler (131). MAP'le paketlenmiş üzümelerde kontrol örneklerle karşılaştırıldığında eugenol ve thymol, toplam fenoliklerin, toplam antosiyaninlerin (kabukta) ve askorbik asidin (özde) kaybını geciktirmiştir (229).

Gıda koruyucuları olarak uçucu yağlar büyük bir potansiyel kullanıma sahiptirler. Bununla birlikte, gıdalara aroma ajanları olarak eklenen veya hazır gıdalarda ingredientler olarak kullanılan baharat ve şifalı otların antibakteriyel özelliklerinin belirgin olması için daha yaygın kullanılmaları gerekirse organoleptik etkilerinin önemi artacaktır (165). Antimikrobiyal etkinliği kanıtlamak için gıdanın duyuşal profiline ve gıda kompozisyonuna uygun uçucu yağın dikkatlice seçilmesi ve incelenmesi gereklidir (89). Diğer yandan, şifalı ot ve baharatların başlıca aromatik ve lezzet bileşenlerini içeren uçucu yağlar, gıda maddelerine küçük miktarda ilave edilirse organoleptik özellikler etkilenmeden bakteriyel kontaminasyonu geciktirir ve bozulma etkisini azaltırlar. Uçucu yağ ilavesinin pratik olabilmesi için duyuşal kaliteyi etkilemeksizin verimli antimikrobiyal etkilere sahip en düşük konsantrasyonunu, güvenlik ve toksisite düzeylerini bilmek gereklidir (165). Gıdalarda organoleptik kaliteyi etkilemeden patojenik bakterilerin büyümesini inhibe etmek için gerekli olan uçucu yağların minimum konsantrasyonu belirlemek önemlidir. Test edilen mikroorganizmanın gelişmesini tamamen inhibe etmek için gereken uçucu yağın en düşük konsantrasyonu; Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) olarak tasarlanmıştır (89, 166). Maksimal Tolere Edilen Konsantrasyon (MTC) ise, bakteriyel gelişmeyi etkilemeyen uçucu yağ en yüksek konsantrasyonu olarak değerlendirilmiştir (166). MIC, test mikroorganizmasının tamamen inhibisyonu için gerekli olan en düşük konsantrasyon (39, 65), inokulumun canlılığının azaltılması veya sürdürülmesiyle sonuçlanan en düşük konsantrasyon, test organizmasının görünür büyümesini inhibe eden en düşük konsantrasyon (39, 85), inokulumun canlılığında belirgin bir azalmaya (> % 90) neden olan en düşük konsantrasyon (39), veya inhibisyonun açık bir zonunu gösteren en düşük konsantrasyon (87) olarak ifade edilebilmektedir. Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBC) ise, başlangıç inokulumunun % 99,9 veya daha fazlasını

öldüren konsantrasyon (39) veya taze broth içinde sub-kültür sonrası hiçbir büyümenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir (39, 65).

Karanfil uçucu yağının antimikrobiyal duyarlılık aktivitesi bazı Gram negatif bakteriler (*E. coli* ATCC 35218, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. paratyphi*, *Citrobacter* spp. ve *Enterobacter cloacae*) bir Gram pozitif bakteri (*S. aureus* ATCC 25923) ve bir küf (*C. albicans*)'a karşı geniş bir spektrumda etkinlik göstermiştir. MIC düzeyleri *S. aureus* ATTC 25923, *E. cloacae*, *S. paratyphi*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ATTC 35218, *E. coli*, *Citrobacter* spp. ve *C. albicans* için sırasıyla 2.4, 1.6, 0.27, 0.016, 0.23, 1.63, 0.73 ve 0.067 mg/ml olarak belirlenmiştir (25). *E. coli* O157:H7'nin suşları, okaliptus, çay ağacı, biberiye, nane, karanfil, limon, dağ kekiği, çam, tatlı fesleğen, ve misk gülü (*Rosa moschata*) uçucu yağlarının etkilerine karşı benzer etkilenebilirlik sergilemişlerdir. En düşük MIC ve MBC düzeylerini (sırasıyla 0,25 ml/100ml ve 0,3 ml/100ml ile) karanfil uçucu yağı sergilemiştir. Bu sonuçlar, karanfilin belirgin bir bakterisidal ve bakteriostatik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (146).

Karanfilin su infüzyonu, çayı ve yağı kullanılarak, Gram negatif olan *E. coli*'nin 36, *Proteus mirabilis*'in 6, *P. aeruginosa*'nın 10, *Enterobacter aerogenes*'in 5, *Klebsiella ozaenae*'nin 2, *K. pneumoniae*'nin 24, *Serratia marcescens*'in 4, *S. typhi*'nin 3, *S. dysenteriae*'nin 5 ve *Vibrio cholerae*'nin 5 izolatına karşı standart disk difüzyon metodu ile in vitro antibakteriyal etkileri incelenmiştir. Karanfilin su infüzyonu ve çayı *P. aeruginosa*'ya karşı, yağı ise *V. cholerae*'ya karşı maksimum aktivite göstermişlerdir. *K. ozaenae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* ve *V. cholerae* sulu infüzyon ve dekoksiyona karşı dirençli bulunurken, uçucu yağ test edilen bakteri izolatlarının hepsine karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergilemiştir (186). Bozulmuş gıda ürünlerinden izole edilen *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Bacillus* spp., *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Klebsiella* spp. üzerinde çalışılan bir araştırmada yerel bir marketten temin edilen 10 uçucu yağın aktivitesi izlenmiş ve bunlardan sadece tarçın ve karanfilin geniş bir antibakteriyel aktivite sergilediği görülmüştür (87). Karanfilin su infüzyonunun *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* ve *S. aureus* suşlarına karşı güçlü bir antimikrobiyal etki sergilediği

belirtilmiştir. Karanfil hidrodistilatı infuzyonuna göre daha güçlü bir aktivite sergilerken, test edilen bakterilerin tamamını inhibe edebilmiştir (69).

Baharat ve bitkilerden derivate edilen uçucu yağların 0,2 ve 10 µl/ml arasındaki düzeylerde *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirtilmektedir (45). Broth mikrodilasyon metodu ile *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *P. Aeruginosa*, *C. Albicans* ve *A. niger* türlerine karşı karanfil ve biberiyenin tek tek ve kombine olarak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada biberiye yağı için % 0,125- 1,000 arasında, karanfil yağı için % 0,062- 0,500 (v/v) arasında MIC değerleri belirlenmiştir. Test edilen bu iki yağın da mikroorganizmalara karşı belirgin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitesi sinerjistik veya antagonistik etkilerinin göstergesi olarak ortaya çıkmıştır (83). Hammer ve ark. (94) broth mikrodilasyon metodu ile karanfil uçucu yağının *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* için MIC değerlerini % 0,12 olarak tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada tarçın, karanfil, fesleğen, biberiye, dereotu ve zencefil uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri katı ve buhar difüzyon testleri ile dört Gram pozitif bakteri (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, ve *L. monocytogenes*), dört Gram negatif bakteri (*E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. choleraesuis*, ve *P. aeruginosa*), bir maya (*C. Albicans*) ve iki küf (*Penicillium islandicum* ve *Aspergillus flavus*)'e karşı değerlendirilmiştir. Organoleptik değişiklikleri minimize ederken paketlenmiş gıda maddelerinin raf ömrünü uzatabilme potansiyeli değerlendirilen çalışmada katı difüzyon testlerde fesleğen ve biberiye tarafından takip edilen tarçın ve karanfil en güçlü (ve çok benzer) inhibisyonu göstermişlerdir. Buhar fazda uçucu yağların hiçbiri tarafından inhibe edilemeyen *P. aeruginosa* hariç Gram negatif ve Gram pozitif suşlar arasında belirgin farklılık olmamasıyla birlikte genel bir kural olarak MIC- maya- küf << MIC- bakteri şeklinde değerlendirilmiştir. Uçucu yağların antimikrobiyal etkilerindeki farklılıkların uçuculukları arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (137). Sıvı- Gaz kromatografi ile analiz edilen uçucu yağlardan karanfil, tarçın, biberiye ve tatlı kırmızı biber, iki Gram negatif; *P. fluorescens* ve *Serratia liquefaciens* ve dört Gram pozitif; *B. thermosphacta*, *Corin piscicola*, *Lb. curvatus* ve *Lb. sake* gibi ette bozulma nedeni olan bakterilere karşı BHI veya MRS

agarda çalışıldığında en aktif bitkiler olarak bulunmuştur. Karanfil uçucu yağının 1/100 dilüsyonunda test edilen bütün bakterilere karşı etkin olduğu görülmüştür. Eugenol ve cinnemaldehit varlığıyla uçucu yağların inhibitör etkisi arasında bir ilişki bulunmuştur. Eugenol miktarı yağın toplam kütlelerinde, karanfilde % 19,81, tarçında % 5,38 ve tatlı kırmızı biberde % 9,33 oranında tespit edilmiştir. Yağlarda iz miktarda bulunabilen bileşiklerin bile güçlü antibakteriyel aktivite sergileyebilecekleri bildirilmiştir (163). Karanfilin su infuzyonu *B. thermosphacta* ve *S. putrefaciens* bakterilerini tamamen inaktif hale getirirken, *Y. enterocolitica* suşunu yaklaşık 3 logaritma, *E. coli* O157:H7'yi 1 logaritma, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* suşlarında 4 logaritma, *P. fluorescens*'te ise 5 logaritma değerinde bir indirgeme sağlamıştır. Karanfil hidrodistilatı ise bütün test mikroorganizmalarına karşı önemli bir antimikrobiyal etki yaratarak *L. monocytogenes*'te 6 logaritma değerinde indirgeme sağladığı, diğer test organizmalarını ise tamamen inaktive ettiği görülmüştür. Çalışma sonucunda karanfil bitkisinin, tüm bakteriler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (11).

Patojenik mikroorganizmaları elimine etmek, azaltmak ve gıda ürünlerinin kapsamlı kalitesini ve raf ömrünü artırmak için doğal biyokoruyucular olarak baharatlar ve onların uçucu yağlarının daha fazla kullanımlarıyla ilgili araştırmalar gittikçe artmaktadır (45). Nitekim, Baharatlar ve şifalı otlar, hem aroma hem de koruma amaçlı kullanılabilirler. Lezzeti geliştirmek için gıdaya katılan baharat ve şifalı otların ürünün raf ömrünü de geliştirdikleri ortaya komuştur (99). Kimyasal koruyucular, düşük sıcaklık, düşük O₂, yüksek basınç teknikleri gibi diğer koruyucu tekniklerle birlikte bitki uçucu yağlarının kullanımı umut verici olabilmektedirler (198). Karanfil ve tarçın uçucu yağları genelde fenolik yapıda eugenol içermeleri ile mikroorganizmalarına karşı oldukça aktif olarak değerlendirilmişlerdir. Bu yağlar gıda mikrokoruyucuları olarak potansiyel bir kullanıma sahiptirler (87). *E. coli* O157:H7'nin toksijenik olmayan bir suşuna karşı bir stabilizer ile bir emülsifiyerin varlığında ve yokluğunda uçucu yağların antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesine dayanan bir çalışma yapılmıştır. 10 °C, 20 °C ve 37 °C de denenen çalışmalarda karanfilin dağ kekiği ve kekiği takiben bakteriostatik ve bakterisit özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (46). En yüksek sağlık ajanı performansını elde etmek için patojen ve uçucu yağ arasındaki temas zamanını optimize etmek çok önemlidir. 20

saatlik bir periyod sırasında *E. coli* canlılığında uçucu yağ inhibitör etkileri değerlendirildiğinde karanfil için yüksek, çay ağacı için orta ve biberiye için düşük etki gösterdikleri sonucuna varılmıştır (146).

Uygun bir raf ömrüne ulaşmak için gıda ürünlerinin üretim adımları sırasında mikrobiyal kontrol veya inhibisyonu kadar azaltılmış bir başlangıç mikrobiyal yüke gereksinim vardır (146). 5- 20 µl/gr düzeyde eugenol, kişniş, karanfil, dağ kekiği ve kekik yağları et ürünlerinde doğal (otokton) bozulma florasında *A. hydrophila* ve *L. monocytogenes*'in büyümesini inhibe etmektedirler (45).

Ette yaygın olarak bozulma yapan *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *Lc. mesenteroides*, *B. thermosphacta* ve patojen olan bakteriler *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı monolaurin (bir emülsifiyer), eugenol (doğal bir baharat ekstraktı) ve sodyum sitrat (şelatör; aroma artırıcı ve asitleştirici) kullanımı ile mikroorganizmaların gelişimleri incelenmiştir. Çalışmada 100 ve 250 ppm monolaurin ile 500 ve 1000 ppm eugenol ve % 0,2- 0,4 sodyum sitrat her bileşenin ayrı ayrı oluşuna göre daha etkili bulunmuştur. Seçilen kombinasyonlarda LAB ve *E. coli* O157:H7'nin daha dirençli ve *B. thermosphacta* ve *L. monocytogenes*'in daha hassas olduğu bulunmuştur. Sodyum sitratın varlığı monolaurin ve eugenol kombinasyonlarıyla *Lb. curvatus* ve *Lb. sake*'nin güçlü inhibisyonunu sağlayabilmek için gerekli olduğu görülmüştür. Laktobasillerin diğer organizmalara göre eugenol'ün etkisine daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. *Lc. mesenteroides*'in laktobasillere göre eugenol'ün etkisine daha hassas olduğu gözlenmiştir. Eugenol tek başına *E. coli* O157:H7 için yüksek inhibitör etki sağlamış ve *B. thermosphacta*'ya karşı belirgin aktivite göstermiştir. Yüksek konsantrasyonlarda *Lc. mesenteroides* ve *L. monocytogenes*'in gelişmesini tamamen önlemiştir. Lipofilik monolaurin (hücre membran yapısını etkiler), eugenol (hücre membranını etkiler veya hücre enerji düzeylerini düşürür) ve sodyum sitrat (duvarın lipopolisakkarit bariyerini destabilize eder) sinerjistik etkileri ile Gram negatif ve LAB içeren et bozulma etkeni ve patojenik organizmaların büyük bir çoğunluğunu inhibe edebilmişlerdir (36). Köfte ve kebapta sarımsak, soğan, karanfil ve tarçın ekstraktlarının kullanımıyla doğal mikroflora gelişimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada sarımsak ve karanfilin gıda zehirlenmesine ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı maksimum antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Karanfil uçucu yağının 1/100

oranındaki dilusyonunda etlerde bozulmadan sorumlu *P. fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *B. thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (75). Yapılan bir çalışmada karanfilin hidrodistilatı tavuk but yüzeyinde dekontaminasyon uygulaması sonrasındaki başlangıç (0. gün) mikroorganizma sayısında indirgeme sağlamıştır. Sumak ve hibiskus infuzyonu ile kekik ve karanfil hidrodistilatlarının tavuk etlerinde ve diğer gıdalarda dekontaminant ve raf ömrünü uzatıcı doğal ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur (11).

Tarçın, karanfil ve kimyon disk difüzyon metodu ile *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. fecalis*, *Micobacterium smegmatis*, *M. luteus* ve *C. albicans*'a karşı < 10 > 30 mm arasında inhibisyon zonları ile güçlü antimikrobiyal etkiler sergilemişlerdir (6). 20 bitki örneğinden elde edilen hidrosollerin *in vitro* antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens* üzerinde kekik ve karanfil hidrosollerinin en yüksek antimikrobiyal etkiyi sağladıkları bulunmuştur. Kekik ve karanfil bitki hidrosollerinin gıdaların bozulmaya karşı korunmalarında antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilirler önerilmiştir (161). 14 baharatın antimikrobiyal aktivitesi dört yaygın et bozulma etkeni ve patojenik bakteriye (*L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. fluorescens* ve *L. sake*) karşı ikili (1:1 v/v), üçlü (1:1:1 v/v) ve dördü (1:1:1:1 v/v) karışımlar (20 mg/ml) şeklinde kombinasyonlar oluşturarak kültür ortamında, modifiye atmosfer paketlenmiş taze domuz etinde ve vakum paketlenmiş jambon dilimlerinde, 4 C'de muhafaza ile 28 günlük bir periyotda izlenmiştir. Karanfil, biberiye, meyan kökü ve sinameki kabuğunun bireysel ekstraktlarının güçlü antimikrobiyal aktivite sergiledikleri gösterilmiştir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve GRAS olarak kabul edilen bu bitki ekstraktları, et endüstrisi için doğal ve uygun koruyucular olarak değerlendirilmişlerdir (242). Singh ve ark. (198) çalışmalarında maruz kalma zamanının (5 ve 10 dakika) çeşitli gıda bileşenleri (yağ, protein vb.) ile uçucu yağın etkileşiminde bakteriyel popülasyonun azalmasında belirgin bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Sosiste *L. monocytogenes*'in hücre duvarında fazla yağ varlığı ile sağlanan korumayı aşmak için karanfil uçucu yağı ile *L. monocytogenes* arasında 10 dakikadan daha uzun bir temas süresi gerekebilmektedir. Fakat yağsız ve az yağlı soslerde maksimum antibakteriyel etki

10 dakika maruz kalma süresinden önce (5 dakika) sağlanmış olabilmektedir. Böylece maruz bırakılma açısından anlamlı bir fark elde edilebileceği bildirilmiştir. Buradan, uçucu yağların tek başlarına patojenlere karşı tam koruma sağlayamayacakları sonucuna varılmıştır. Yemeye hazır kanatlı sosislerinin yüzeyine uygulanan % 1 ve % 2 karanfil yağının inhibitör etkisi, düşük (10^2 - 10^3 kob/gr) ve yüksek (10^4 - 10^6 kob/gr) inokule edilmiş yedi *L. monocytogenes* suşu üzerinde çalışılmış, örnekler 5 °C ve 15 °C'de 1 hafta depolanmıştır. Kontrol örneklerinde bütün *L. monocytogenes* suşlarının canlı kalmasına rağmen karanfil yağı varlığında gelişme inhibe edilebilmiştir (148). Taze somon balığı 10^6 kob/gr *L. monocytogenes* ile kontamine edilmiş ve % 1 ve % 2 karanfil yağı ile muamele edilerek 4 °C ve 25 °C'de iki hafta muhafaza süresince inhibisyonu izlenmiştir. Depolama boyunca farklı aralıklarda kontrolle karşılaştırmalı olarak takip edildiklerinde karanfil yağı varlığında *Listeria* sayılarında 1- 4 log₁₀ kob/gr azalma gözlenmiştir (144). Güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olan kekik ve karanfil uçucu yağlarının yenilebilir ve kaplanmış film solüsyonlarına ilavesi ile filmlerin antimikrobiyal etkisinin kayda değer oranda arttığı görülmüştür. Karanfil uçucu yağı ilavesinin yenilebilir filmlerin *E. coli* O157:H7 üzerine etkisini artırdığı belirlenmiştir. Kekik ve karanfil yağları hem yenilebilir hem de kaplanmış filmlerin *S. aureus*'a etkisini önemli düzeyde artırmıştır (217). Tüketicilerin sentetik ürünlere duyduğu endişeler nedeniyle et ürünlerinin raf ömrünü uzatmada sentetik orjinlerine göre daha sağlıklı görülen doğal antioksidan katkıları olarak baharatların kullanımı önerilmektedir (189, 232).

1.5.12.3. Bakteriyosinler

Gıda sanayinde kullanılan antimikrobiyal amaçlı katkı maddelerinin seçiminde en önemli kriterler patojenlere karşı olan antimikrobiyal etki spektrumu ve bu katkıların insan sağlığına olabilecek olumsuz etkileridir. Çeşidi ve miktarı gün geçtikçe artan, gıdanın raf ömrünü uzatan bu kimyasalların insan sağlığına kısa veya uzun vadeli olumsuz etkileri hem gıda teknolojisi uzmanlarında hem de tüketiciler üzerinde büyük endişe yaratmaktadır. Bu endişeleri gidermek üzere gıdaların raf ömrünü uzatacak, gıda üretim işlemini kolaylaştıracak, doğal ve etkili gıda katkı

maddesi araştırmalarında, son yıllarda, doğal bir katkı maddesi olarak nitelendirilen, LAB'nin ürettikleri antimikrobiyal maddeler büyük ilgi uyandırmaktadır. Özellikle, biyokoruyucu olarak adlandırılan bakteriyosinler üzerinde birçok araştırma yapılmaktadır (66). Mikroorganizmaların sahip olduğu savunma sistemleri arasında, pratik kullanımlara uygun olmalarından dolayı en detaylı çalışılan ajanlar bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinlerin savunma sistemlerinin mekanizmaları, evrimleşme süreçleri ve ekolojik rolleri ile ilgili bilgiler yeterli düzeyde olmasa da doğada fazla miktarda ve çok çeşitte bulunmaları, bu bileşikler üzerinde çalışmayı kolaylaştırmaktadır. Bakteriyosin proteinleri, etki mekanizmaları, bunları kodlayan gen kümeleri ve genlerin regölasyon mekanizmaları tamamen aydınlatıldığında nasıl bu denli etkili olabildikleri sorusuna da yanıt bulunacaktır (8).

Günümüzde hızlı nüfus artışı, sınırsız seyahat edebilme olanağı, ayaküştü yemek yeme (fast-food) gibi etkenler kolay hazırlanabilen, farklı damak tadında değişik yiyeceklere talebi artırmıştır. Fakat son yıllarda, hazır gıdaların raf ömrünü uzatmak, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin daha iyi hale getirmek amacıyla gıdalara eklenen katkı maddelerine karşı temkinli yaklaşım daha doğal ve daha sağlıklı yiyeceklere yönelimi getirmiştir. Fermente gıdalara gün geçtikçe artan ilgi sonucunda gıda üretiminde yeni ürünlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmıştır (93).

Teropatik antibiyotiklerin gıdalarda kullanımının yasaklanmasıyla antimikrobiyal veya koruyucu özelliği olan antagonistik katkıların kullanımı gıda güvenliği ve korunmasında başvurulan bir yol olmaya başlamıştır. Gıdalarda ve içeceklerde işlenmiş gıdalara antimikrobiyal bileşiklerin ilavesi gıda korumada geleneksel bir yöntemdir. Ticari gıda koruyucularından biri de bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler bakteriler tarafından üretilir ve antibiyotik özelliğe sahiptir. Fakat insanda alerjiye sebep olduğundan dolayı yasaklanan teropatik antibiyotiklerle karıştırılmaması için antibiyotik olarak isimlendirilmezler (52, 54). Bakteriyosinler, laktik aist bakterileri tarafından ribozomal olarak sentezlenen peptit ya da protein yapısındaki bileşiklerdir (8, 54, 55). Biyokimyasal özellikleri, genetik orijinleri, moleköl ağırlıkları, etki tarzları ve inhibisyon spektrumları farklı olan antibakteriyel protein gruplarıdır (2). Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenerek ortama salgılanan ve genelde yakın türlerin inhibisyonunda etkili, kısa veya uzun zincirli

protein tabiatında sekonder metabolit ürünleri olan antimikrobiyal etkili proteinler ya da peptitlerdir. Çoğu küçük katyonik moleküller olan bu yapılar genellikle gastrointestinal sistemde proteazların etkisiyle inaktif olurlar. Genellikle 30- 60 amino asit rezidüsü içerirler (100, 120).

Hedef ve translokasyon sistemlerinin spesifite göstermesi nedeni ile bakteriyosinler yalnız benzer hedefi tanımaktadırlar. Uzak akraba olan taksonların tamamen farklı yapılarda reseptörlere ve translokasyon sistemlerine sahip olması ile bakteriyosinler, genellikle üretici suşa yakın akraba türlere karşı antimikrobiyal etki gösterirler. Bakteriyosinlerin çoğunlukla Gram pozitif bakteriler tarafından üretildiği bilirse de son araştırmalarda bazı Arke üyeleri tarafından da bakteriyosin üretildiği gösterilmiştir (181). Bu polipeptitler, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engellemekte ve bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadırlar (8).

Bakteriyosinler genellikle ısıya dayanıklıdırlar, hipoallerjeniktirler, insan intestinal sisteminde proteolitik enzimler tarafından kolayca inaktive edilirler (55, 167). Geleneksel fermente gıdalardan bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerininin identifikasyonu çalışmalarında *Lb. casei* ve *Lb. acidophilus* bakteriyosin üreten iki izolat olarak belirlenmiş, bakteriyosinlerin amilaz ve katalaz enzimlerinden etkilenmedikleri fakat proteolitik enzim uygulamasında aktivitelerini tamamen kaybettikleri görülmüştür. Isıya stabil olan bu bakteriyosinlerin 121 °C’de 15 dak., 80 °C’de 1 saat’lik ısı uygulamalarında ve pH 3- 8 gibi geniş bir pH aralığında aktivitelerini sürdürdükleri belirlenmiştir (110). Laktik asit bakterileri özellikle düşük pH değerlerinde aktiftirler ve ürettikleri bakteriyosinlerin en iyi çalışma pH değerleri yine asidik karakterlidir. Yapılan denemelerde pH 2 gibi düşük bir pH değerinde hiçbir örneğin aktivitesini kaybetmediği fakat bazik pH değerlerinde özellikle pH 12 gibi yüksek değerlerde örneklerin bir kısmının aktivitelerini yitirdikleri görülmüştür (195).

Bakteriyosinler genel olarak gıdaların korunmasında kullanılırlar, fakat lantibiyotiklerin Gram pozitif insan ve hayvan patojenlerine karşı aktiviteye sahip olmaları ve toksik etkilerinin olmayışı ile klinik etkileri de araştırılmaktadır. Bakteri grupları içerisinde LAB’ni oluşturan; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsleri tarafından üretilen bakteriyosinler

antibiyotiklerin geliştirilmesi açısından en umut verici gruptur. LAB'ların probiyotik ve gıda koruyucusu olarak kullanılmaları nedeniyle LAB kökenli bakteriyosinlerin oral ve gastrointestinal antibiyotikler olarak kullanılmaları muhtemeldir (63, 184, 199). Bazı lantibiyotiklerin çoklu ilaç dirençliliğine sahip patojenlere karşı aktiviteye sahip olmaları, tedavi amacı ile kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (199).

Bakteriyosinler duyarlı hücelere bakteriyostatik veya bakteriyosidal şekilde etki ederler. Bakteriyosinin saflık derecesi, bakteriyosinojenik suşun fizyolojik durumu ve deneysel şartlar (pH, ısı, diğer antimikrobiyal bileşikler vs.) gibi birçok faktör etki tarzlarını ve etki kapasitelerini değiştirebilmektedir. Bakteriyosidal aktiviteleri duyarlı hücrelerin lizisine dayanan bakteriyosinler, bakteriyolitik bakteriyosinlerdir (53). Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Çoğunlukla enzimatik aktiviteyle hedef bakterinin hücre zarına yönelirler. Hücrenin stoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girer ve zarda gözenekler oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar. Bununla birlikte, iyonların, özellikle de Adenozin trifosfat (ATP) kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan K^+ iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır. Tip A lantibiyotikler esas olarak duyarlı hücrelerin sitoplazmik membranlarında por şekillendirirken, Tip B lantibiyotikler duyarlı hücre metabolizmasının uçucu enzimatik bileşiklerini hedef alırlar. Sitoplazmik zarda oluşturulan porlardan glutamat, ATP gibi birçok önemli fonksiyona sahip intraselüler moleküller hücre membranı dışına çıkar ve membranın iyon dengesi bozulur. K^+ iyonları kayba uğrar ve amino asit inhibisyonu gerçekleşir. Böylelikle birçok yaşamsal fonksiyon bloke olur, pH değerindeki düşüğe bağlı olarak glikolitik denge bozulur. ATP'nin hidroliziyle tüm yaşamsal faaliyetler durur ve hücre ölür (227).

Bakteriyosin üretimi yarışmada olduğu diğer türlerin öldürülmesi gibi yaşadığı popülasyonda üretici türe pek çok avantaj sağlarken bazı zararlara da yol açmaktadır. Bunlar, diğer hücresel fonksiyonlar için ihtiyaç duyulan enerjinin kullanılması veya *E. coli*'nin de dahil olduğu pek çok Gram negatif bakteride bakteriyosinin salınması için hücre ölümü gibi sonuçlar olabilmesidir. Bu gibi zararlar bakteriyosin üreticisi ile bakteriyosine duyarlı ve dirençli türlerin bir arada bulunduğu popülasyonlarda kritik önem taşımaktadır (181). Bakteriyosinler

koruyucu ajan olarak kullanımlarını sınırlayan proteolitik bozulma ve gıda ingredientlerinde adsorbsiyona duyarlı amfifilik özellikteki yapılardır (55). Laktik asit bakterilerince üretilen bakteriyosinlerin gıdaları patojenlere karşı korumada gıda katkı maddesi olarak kullanımı büyük ilgi uyandırmakla birlikte, gıdadaki etkileri çeşitli sebeplerden dolayı sınırlıdır. Gıdalarda uygulamalarını sınırlayan en büyük engel, genellikle Gram negatif bakterilere karşı aktif olmamaları nedeniyle sınırlı aktivite spektrumları ve antibakteriyel etkilerinin az olmasıdır. Ayrıca, gıda katkı maddesi olarak ekonomik değerleri, kullanımı engelleyen diğer bir problemdir. Bu nedenle, yapılan çalışmalar sadece yeni ve daha etkili bakteriyosinlerle sınırlı değildir. Bakteriyosinlerin optimum ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesiyle hem biyolojik hem de ekonomik kolaylıkların belirlenmesi yönünde de ilerlemektedir. Araştırmacılar bu sorunlara çözüm bulmak üzere gıda güvenliğini ve raf ömrünü arttırmak için engeller teknolojisi kavramını da kullanmışlardır (52). Bunların yanında, gıda uygulamalarında bir müddet sonra inhibisyonda azalma da görülebilmektedir. Bu durumun, muhtemelen bakteriyosinlerin aktivitesindeki azalma ve/veya bakteriyel hücrelerin direnç geliştirmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Örneğin, deve kuşu et salamında pH 4 civarında maksimum aktivitelerinin olduğu bildirilen Curvacin ve Plantaricin'in başlangıçta *L. monocytogenes* büyümesini inhibe ettiği, fakat fermentasyonun 15. saatinden sonra *L. monocytogenes*'in canlı sayısında yükselme olduğu görülmüştür (67). Holzapfel ve ark. (100) bakteriyosin üreten mikroorganizmaların veya direk olarak bu kültürlerin ürettiği bakteriyosinlerin gıda sanayinde kullanımlarını sınırlayan faktörleri aşağıdaki gibi sıralamışlardır;

* Adaptasyon

- Ürün grubuna ait faktörler,
- Dayanıklılık ve rekabet gücü,
- Yöntem parametrelerine duyarlılık,

* Metabolik aktivite

- Gıda sistemindeki gereklilikler (İnaktivasyon riski),
- Duyusal özelliklere muhtemel olumsuz etkiler,

* Bakteriyosin gibi spesifik antibakteriyel faktörler

- Aktivite spektrumu,

- İnaktivasyon (Yan ürün, spesifik proteazlar vs.),
- Katı materyalde difüzyonun sınırlı olması,
- Gram negatif bakterileri etkilememe,
- Dirençlilik gelişimi,
- Gıda bileşenleriyle spesifik olmayan bağlanma (Lipitlerin neden olabileceği inaktivasyon).

Gıda korumasında bakteriyosinlerin kullanımı gıdanın raf ömrünü uzatırken endüstriyel ve tüketici taleplerini de karşılayabilir olmalıdır. Ancak gıda sistemlerinde bakteriyosinlerin etkinliğini, bakteriyosin stabilitesi ve/veya üretimi için çevre yeterliliğini de göz önünde bulundurmamak gerekmektedir. Bu bağlamda gıda korumak için bakteriyosinler tek yöntem olarak değil çoklu engeller sistemine entegre kullanılmak üzere tasarlanmalıdır (79). Mikroorganizma üremesini inhibe etmek için farklı koruyucu yöntemlerin bir arada kullanılmasını içeren engeller teknolojisinin temel prensibi, gıda sistemlerindeki engellerin yanı sıra tüm işlem aşamalarında oluşabilecek engelleri ortadan kaldırmaktır (54).

Bakteriyosinler gıdalarda koruyucu olarak farklı yöntemlerle kullanılabilir. Bu yöntemler; fermente gıdalarda starter kültür olarak bakteriyosin üreten suşların kullanılması, yüzeyde istenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek için gıda yüzeyine koruyucu kültür olarak uygulanmaları veya bakteriyosinlerin saf olarak ya da kısmi saflaştırılmış konsantreleri halinde gıdaya uygulanmaları şeklinde olabilmektedir (227). Et fermentasyonunun mikrobiyal ekolojisi, LAB ve koagülaz negatif kokların büyük bir rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Laktobasiller et ürünlerinde endüstriyel gıda fermentasyonunda önemli bir rol oynarlar. Aroma ve tekstür gibi ürün karakteristiklerine katkıda bulunan kapasiteleriyle, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal bileşiklerin üretimi ve asitleştirme sağlayarak ham maddenin korunmasına katkıda bulunurlar (79).

Gıda uygulamalarında, izole edilen bakteriyosinin kullanıma uygun bulunması için üretici suşun GRAS statüsünde, bakteriyosinin patojen bakterileri de kapsayan geniş bir etkinliğe ya da spesifik patojenlere karşı inhibisyon etkinliğine sahip, ısıya dayanıklı, sağlık açısından risk taşımayan, kaliteyi ve aromayı artırıcı özellikte olması gereklidir (100). Gıdalarda kontrolü zor olan ve çevrede yaygın olarak bulunan patojenik bakteriler, *L. monocytogenes* dahil gıda kaynaklı

hastalıklarda önemli rol oynayan Gram pozitif patojenlere karşı etkili olan çoğu bakteriyosin “GRAS” olarak nitelendirilen bakterilerden elde edilir. *Lc. lactis ssp. lactis* tarafından üretilen Sınıf I içinde yer alan nisin gıda maddelerinde kullanılan GRAS katkı maddeleri statüsünde yer alır (52).

1.5.12.3.1. Nisin

Lisanslı olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin nisin olmasından dolayı pek çok çalışmada bakteriyosinlere direnç mekanizması da nisin üzerinde yapılan denemeler ile araştırılmaktadır (209). Önemli birçok gıda kaynaklı bozulma yapıcı ve patojen Gram pozitif bakteriye karşı etkinliği ve nispeten uzun bir güvenli kullanım geçmişi ile en önemli ticari bakteriyosin olan nisin (55), lantibiotikler grubuna ait bir peptiddir (41). Nisin laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* tarafından üretilen, lantibiotik olarak adlandırılan ve I. sınıf bakteriyosinler grubunda yer alan bir bakteriyosindir. Çok geniş bir yelpazede Gram pozitif bakterilere ayrıca *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin sporlarına karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir (18, 95, 167). Asidik bir doğal yapıya sahip olan nisin, düşük pH’larda yüksek çözünürlüğe sahip bir antimikrobiyal madde olarak bilinmektedir. Isıya karşı dirençlidir ve depolama stabilitesi yüksektir (167). Ancak, nisin Z’nin farklı sıcaklık derecelerinde farklı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Örneğin, *L. monocytogenes* inhibisyonu için Nisin Z’nin minimum inhibisyon değeri 7 °C’de 400 µg/l iken 30°C’de 1200 µg/l’dir. *L. innocua* için ise 7 °C’de 800 µg/l iken 30 °C’de 400 µg/l’dir (2). Kullanıldığı gıdada olumsuz bir lezzete neden olmamaktadır. Nisin vücuda alındıktan sonra sindirim enzimleri tarafından hızlı bir şekilde inaktive edilmektedir (167). Bunun yanı sıra, yapılan araştırmalar sonucunda nisinin insan ve hayvanlar üzerinde toksik etkisinin olmadığı, yüksek miktarda kullanımlarının toksik etki göstermediği belirlenmiş ve güvenli bir gıda katkı maddesi olduğu anlaşılmıştır (95).

FAO- WHO’ya bağlı Gıda Katkıları Uzmanlar Komitesi tarafından 1969 yılında nisinin gıdalarda bir antimikrobiyal olarak kullanılabilirliği onaylanmıştır. Nisin, E 234 no’lu gıda katkı maddesi koduyla ‘nisin koruyucu’ veya ‘doğal

koruyucu' etiketi ile 50'den fazla ülkede kullanılmaktadır (52, 54, 64, 79). Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç İdaresi tarafından "GRAS" statüsünde kabul edilen ve yapılan araştırmalar sonucunda insanlar için tamamen güvenli olduğu tespit edilen nisin, özellikle çeşitli maddelerle kombine edildiğinde, antimikrobiyal spektrumunun daha da genişlemesi, gıdalarda kullanımını yaygın hale getirmektedir (95). Gıda katkı maddesi olarak kullanımının resmi olarak onaylanmış olması, nisini üzerinde en çok çalışılan bakteriyosin yapmaktadır. Genetiği en iyi bilinen laktik asit bakterisinin *Lactococcus lactis* olması da bunda etkindir (195).

Nisin biyokoruyuculuğuna ilave olarak eczacılık, veterinerlik ve sağlık ürünlerinde potansiyel bir ajan olarak kullanılmaktadır (18). Lisanslı olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin nisin olmasından dolayı, pek çok çalışmada bakteriyosinlere direnç mekanizması da nisin üzerinde yapılan denemeler ile araştırılmaktadır. Bakteriyosinler antibiyotiklerden farklı bir yapıya sahiptirler. Birçok antibiyotiğe karşı yüksek direnç kazanmış patojenler üzerinde bakteriyosinlerin direnç mekanizması ilgi odağı olmasına karşın bu konuda yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Bakteriyosinler için mutlaka değerlendirilmesi gereken konulardan biri de direnç konusudur. Tüm bakteriyosinler için bu mekanizmaların nasıl işlediği bilinmese de, düşük molekül ağırlıklı bakteriyosinlerin çoğunun bakteriyel membran ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle, direnç genellikle bakteriyosinin hedeflediği bakterinin membranındaki değişikliklere bağlı olarak şekillenmektedir (209). Antibiyotik dirençliliği, genellikle genetik determinant ile türler, suşlar ve hücreler arası dirençliliğin transfer edilebilmesiyle alakalıdır. Fakat antibiyotik dirençliliğinin aksine bakteriyosin dirençliliği hedef hücre membranında fizyolojik değişiklikler sonucu gerçekleşir. Nisin dirençliliği için hücre membran bileşiklerinde değişiklik gözlemlendiği, enzimlerin ve nisini parçalayan nisinaz enziminin bazı mutantlar ürettiği belirtilmiştir (57). Birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmış mikroorganizmalara 400 IU/ml nisin uygulandığında organizmalarda herhangi bir direnç gelişmemesi ve nisine karşı duyarlılıklarını korumalarına dayanarak antibiyotiklerin ve bakteriyosinlerin etki mekanizmaları birbirinden farklı oldukları sonucuna varılmıştır (193). Bununla birlikte, çoğunlukla gastroenteritiste gıda kaynaklı hastalıklarda yaygın olarak kullanılan 20 farklı antibiyotiğe karşı *Cl. perfringens*, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* ve

Shigella'nın bazı suşlarında antibiyotik direncinin gıda koruyucuları ile etkilenebilirliğinin izlendiği bir çalışmada, *B. cereus* ve *Cl. Perfringens*'in suşlarının 5000 IU/ml nisin'e (Nisaplin) dirençli olduğu bulunmuştur. *S. aureus*'un suşlarına karşı ise MIC değerleri 3000- 5000 IU/ml arasında olmuştur. Spor oluşturan bakterilerin Nisaplin MIC'i *S. aureus*'a karşı olanlardan daha yüksek olarak değerlendirilmiştir (29).

Nisin, Gram pozitif bakterilere karşı nispeten yüksek aktivitesini sağlayan bağlı lipit II membranları ile yüksek bir affinite etkileşimi ile bakteriyel hücreleri öldürmek için por oluşturma kombinasyonuna sahip olmasıyla özel bir yapıyı barındırmaktadır (41). Bakteriyosinlerin hedefi sitoplazmik membrandır. Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkisiz olması veya sınırlı bir etki göstermesi Gram negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakkaritin koruyucu bariyerine bağlanabilir. Etki mekanizmaları stoplazmik membran üzerindedir ve hücrenin çatlamasına yol açarak ATP gibi hücre içi maddelerin sızmasına neden olmaktadır (2, 48, 53, 167). Bu nedenle bakteriyosinler çoğu gıda üretim yöntemlerinde koruyucu olarak tek başına yetersiz kalmakta ve kombine bir sistemle bakteriyosinlerin aktiviteleri arttırılmaktadır. Gram negatif bakterilerin hücre geçirgenliği, elektrostatik basınç, yüksek hidrostatik basınç gibi koruma metotları kullanılarak arttırılabilir. Buna ilaveten, lipopolisakkarit tabakasında Mg iyonu tutan sitrat, EDTA gibi şelat kullanarak Gram negatif bakterilerin membran bütünlüğü bozularak bakteriyosinlerin etkisi arttırılabilmektedir (2, 48, 53). EDTA'nın düşük düzeylerinin *L. monocytogenes*'e karşı nisin ve lizozimle, enterohemorajik *E. coli*'nin iki suşuna karşı nisin, monolaurin ve lizozimle birlikte sinerjik etkilerinin olduğu Branen ve Davidson (40) tarafından da gösterilmiştir. Bununla birlikte, Gill ve Holley (84), Gram negatif bakterilere karşı nisin ve EDTA arasında ve Gram pozitif bakterilere karşı nisin ve lizozim arasında antibakteriyel etkiyi yükselten bir etkileşim bulamamışlardır. Ancak, besin elementlerinin eksikliği şartlarında böyle bir aktivitenin varlığını gözlemlemişlerdir. Ultra Yüksek Basınç (UHP) ve Nabız Elektrik Akım (PEF) ile bakteriyosinlerin kombinasyonu, bakteriyosinlerin veya bu teknolojilerin yalnız kullanımından daha büyük bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (2). Ayrıca ozmatik şok, ısı uygulaması, şelatlama ajanlarına maruz kalmaları ve dondurma gibi uygulamalarla Gram negatif bakterilerin hücre

duvarı geçirgenliklerinin nisine karşı etkilenebilir hale getirilebileceği de bildirilmiştir (64). Kombinasyon çalışmalarından bazıları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9: Gıda Güvenliğini Yükseltmek İçin Engeller (Hurdling) Teknolojisinde Nisin Uygulamaları (52).

Bakteriyosin	İnaktivasyon Etkisi	Referans
Isıyla Kombinasyon		
Nisin	Nisin (1000 IU/g) ve hafif ısı uygulaması (60- 65 °C) ile ıstakozda <i>L. monocytogenes</i> inaktivasyonu	Budu-Amoako ve ark.1999
Nisin	Nisin (500-2500 IU/g) ve hafif ısı uygulaması (55 °C) ile <i>S. enteritidis</i> inaktivasyonu	Boziaris ve ark.1998
Nisin, pediocin AcH	Her iki bakteriyosinin ve sublethal baskı uygulanması ile Gram negatif/Gram pozitif bakterilerde canlı hücre sayısında azalma	Kalchayanand ve ark.1992
Şelat Ajanlarıyla Kombinasyon		
Nisin	EDTA, sitrat ya da laktat ile nisin (2000 IU/g) ve modifiye atmosfer (MAP) ambalajlama, Gram negatif bakterilere (<i>S. typhimurium</i> ve <i>E. coli O157:H7</i>) karşı etkilidir.	Cutter ve Siragusa, 1995
Nisin	MAP, düşük ısı ve Nisin (400 IU/g) <i>L. monocytogenes</i> lag fazında azalma, 1250 IU/g seviyesinde nisin kullanıldığında ise üremede inaktivasyon	Szabo ve Cahil, 1998
Nisin	MAP (% 100 CO ₂ , % 80 CO ₂ + % 20 hava) ve nisin (1000 ya da 10000 IU/g) <i>L. monocytogenes</i> ve <i>Pseudomonas fragi</i> üremesini inhibe eder.	Fang ve Lin, 1994
Antimikrobiyallerle Kombinasyon		
Nisin	% 0,3 potasyum sorbat ile nisin (400 IU/g) <i>L. monocytogenes</i> üremesini inhibe eder.	Buncic ve ark. 1995
Pediocin AcH	% 0,3-0,5 sodyum diasetat ile pediocin nisin (5000 IU/g) <i>L. monocytogenes</i> üremesini inhibe eder.	Schlyter ve ark. 1993
Nisin	Sukroz, yağ asitleri ve nisinin sinerjistik etkisi Gram pozitifleri inhibe eder.	Thomas ve ark. 1998
Nisin	CO ₂ ve nisin, <i>L. monocytogenes</i> ’e karşı sinerjistik etki gösterir.	Nilsson ve ark. 2000
Nisin	Carvacrol (0.3 mmol/l), nisin (6 IU/ml) kombinasyonu, nisin tek başına etkisine göre <i>Bacillus cereus</i> sayısını azaltmada daha çok etkilidir.	Periago ve ark. 2001
Nisin	Monolaurin (0.25mg/l) ile nisin (100 IU/ml) kombinasyonu, sütte <i>Bacillus ssp.</i> ’nin vejetatif hücrelerine karşı sinerjistik etkilidir.	Mansour ve Milliere, 2001
Laktoperoksidaz Sistemle Kombinasyon		
Nisin	Laktoperoksidaz sistem ve nisin (100 ya da 200 IU/ml), <i>L. monocytogenes</i> ’e karşı bakteriasidal etki gösterir	Boussouel ve ark. 2000
Nisin	Laktoperoksidaz sistem ve nisin (10 ya da 100 IU/ml), yağsız sütte <i>L. monocytogenes</i> ’in inaktivasyonunda sinerjistik etki gösterir	Zapico ve ark. 1998
Diğer Bakteriyosinlerle Kombinasyon		
Pediocin AcH	Lacticin 481, lacticin F, pediocin AcH nisinle birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösterir.	Mulet- powell ve ark.1998
Leucocin F10	Nisin ve leucocin F10 kombinasyonu <i>L. monocytogenes</i> ’e karşı çok etkilidir.	Parente ve ark. 1998
Curvaticin	Nisin (50 IU/ml), ve curvaticin 13 nisin (160 AU/ml), aynı anda ilavesinde, tek başına yaptıkları etkiye göre <i>L. monocytogenes</i> ’e karşı daha fazla etkililerdir.	Bouttefroy ve Milliere, 2000

Nisin ilk olarak peynirlerde koruyucu olarak kullanılmış, ancak son yıllarda, sadece peynirlerle sınırlı kalmayıp diğer süt ürünleri, et, kanatlı ve deniz ürünleri gibi çeşitli gıdalarda, ayrıca şarap ve bira sanayinde koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır (95). Birçok ülkeyle birlikte Türkiye’de de peynir ve bazı gıdalarda prezervatif olarak kullanımı onaylanmıştır (188). Süt ürünlerinde etkili sonuçlar veren nisin et ürünlerinde başarılı bir koruyucu değildir. Ette nisinin çözünürlüğünün azalması ve stabilitesini koruyamaması başta gelen etkenlerden biridir. Aynı zamanda, bazı laktik asit bakterileri üreme döneminin başında bakteriyosin üretirken bazıları bu dönemin sonunda bakteriyosin üretmektedir. Ayrıca, etkili olabilen konsantrasyon için kullanılan bakteriyosin miktarının yüksek olması ekonomik bulunmamaktadır (102).

Fermente sucuk üretiminde istenilen kırmızı rengin oluşması için ve özellikle *Clostridium botulinum* inhibisyonu için et ürünlerine katılan nitrit, sekonder aminlerle reaksiyona girerek karsinojenik nitrozaminler oluşturur. Yüksek miktarlarda nitrit kullanımı ile ilgili endişelerden dolayı araştırmacılar nitritin tamamıyla olmasa da bir kısmı yerine nisinin kullanılabilceği üzerine çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Nisinin *B. cereus* ve *L. monocytogenes*’e karşı oldukça etkili olduğu, *Clostridium spp.*’nin toksin üretimini ve sporlanmasını engellediği bildirilmektedir. 5,6- 6,0 pH, nem içeriği ve düşük redoks potansiyeli (anaerobik ortam) bulunduran peynir 85- 100 °C’de 6- 10 dakika ısı uygulamasında canlı kalabilen Clostridium sporlarının vejetatif hale geçmesi ve üremesi için uygun bir ortamdır. Clostridium sporu (yaklaşık 200 spor/gr) ile kontamine edilerek üretilen peynirlerde 6,5 mg/kg nisin uygulamasıyla 37 °C’de depolama süresince bozulma önlenmiştir. Yine de yüksek miktarlarda nisinin *C. botulinum* üzerinde oldukça etkili olmasına rağmen fazla miktarlarda nisin kullanımı ekonomik değildir (64). Rayman ve ark. (179), çalışmalarında 3000 IU/g nisin ve 40 ppm nitrit kombinasyonunun ette *Clostridium sporogenes* sporlarını 37 °C’de 56 gün inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Davies ve ark. (62) peynir örneklerine 10^2 - 10^3 kob/g *L. monocytogenes* inoküle ederek 70 gün olgunlaşmaya bırakmışlardır. Çalışmanın sonucunda 2,5 mg/l nisinin 8 hafta ve daha fazla sürede peynir türüne bağlı olarak örneklerde *L. monocytogenes* üremesini inhibe etmiştir.

Nisin konservecilikte sterilizasyonun daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesini sağlar. Konserve meyve ve sebze ürünlerin işlenmelerinden sonra ortaya çıkabilen *C. botulinum*'un ısıya dayanıklı sporlarının inaktif edilememesi sorununa karşı sterilizasyon sıcaklığında etkinliğini koruyabilen antimikrobiyallerin kullanımı gerekmektedir. Ayrıca, bu etkinliğin depolama koşullarında da korunması istenmektedir. Nisinin termofiliklerin üremelerini önlediği, ısı işlemi görmüş kutu konserve meyve ve sebze ürünlerinde kullanılabileceği belirlenmiştir (167).

Bakteriyosinlerle ambalaj materyalinin kombine edilmesiyle patojen ve bozulma yapan bakterilerin kontrolü üzerine çok etkin çalışmalar yapılmaktadır. Et ve peynir gibi gıdalarla direk temas eden antimikrobiyal ambalajlama materyalinden yüzeye difuze olan bakteriyosin, gıdanın yüzeyinde mikrobiyal gelişmeyi önler. Bakteriyosinin ambalaj materyalinden gıda yüzeyine kademeli salınımı, gıdaya bakteriyosinin spreyle uygulanmasına veya gıdanın bakteriyosin çözeltisine daldırılmasına göre daha avantajlıdır. Spreylemede antimikrobiyal aktivite gıda bileşenleriyle etkileşime ya da gıdaya nüfuz eden miktarına bağlı olarak azalabilir veya tamamen kaybolabilir (52). Fang ve Lin (80), domuz etinde nisinin MAP (% 100 CO₂; % 80 CO₂ + % 20 hava) ile kombine kullanımının *L. monocytogenes* ile *Pseudomonas fragi* üzerinde çok etkili olduğunu göstermişlerdir. Modifiye atmosfer ve nisin (10³, 10⁴ IU/ml) her iki organizmayı 4 °C'de, 20 °C'ye göre daha belirgin olan bir inhibisyonla inhibe etmiştir.

Değişik *B. cereus* suşlarının vejetatif formları üzerinde nisin ve carvacrol'un etkisi incelendiğinde farklı pH ve sıcaklık derecelerinde duyarlılıkta belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. 0,3 mmol/l konsantrasyondaki carvacrol *B. cereus* üzerinde etkili olmazken nisinle birlikte kombine kullanıldığında, tek başına nisin uygulanmasına (0,15 µg/ml) göre yaşayan hücre sayısında daha fazla azalma sağlamıştır. Bu sonuca göre, carvacrol'un nisinin bakterisidal etkisi üzerinde önemli bir rol oynadığı ve bu bileşiklerin kombinasyonunun sinerjik etki yarattığı görülmüştür. Bunun yanında 6,30 ve 5,75 gibi düşük pH seviyelerinde nisin *B. cereus* suşları üzerinde 7,0 gibi daha yüksek bir pH seviyesine göre daha etkin olmuştur. Nisin ve carvacrol kombinasyonu pH 7,0 ve 5,75 seviyelerinde oldukça farklı sonuçlar ortaya koymuşlardır. Nisin pH 7,0 ve 6,30'da *B. cereus*'a karşı 8 °C'de, 30 °C'de olduğundan daha az aktif bulunmuş, düşük pH değerlerinde nisinin

etkisi belirgin olarak yükselmiştir. Yine düşük sıcaklık değerlerinde test edilen pH değerlerinde nisin ve cavracrol'un sinerjik etkisi de gözlenmiştir. 8 °C'de küçük bir etkiye sahip olan nisinin maksimum bakterisidal etkisi için düşük pH, cavracrol veya her ikisiyle kombine edilmesi gerekmektedir. Nisin, cavracrol ve pH gibi kombinasyonların en büyük avantajı, bazı gıdaların aroma ve tekstürüne çok az zarar vererek, yüksek sıcaklığa ihtiyaç olmadan bu gıdalardaki mikroorganizmaları inaktif hale getirmektir. Bu, özellikle Nisin'in tek başına *B. cereus*'a karşı az etkili olduğu düşük sıcaklıklarda yararlı olabilir (172). Yine, düşük sıcaklıklarda tam bir inaktivasyonun sağlanamaması nedeniyle, sıvı yumurtada ılımlı ısı prosesiyle birlikte nisin ve lizozimin ayrı ayrı ve kombine etkileri, optik dansimetre ölçümleri yoluyla tahminsel modeller olarak *B. cereus* inaktivasyonu için kullanılmış ve *B. cereus*'un gıda güvenliği sınırlarını belirlemek için kullanışlı, kolay bir yöntem olarak sunulmuştur (16).

2 mg/ml nisin, 10 mg/ml lizozim ve bunların karışımı solüsyonları ile muamele edilen tüketime hazır Bologna hindi örneklerinin 65 °C'de 32 saniye pastörize edilerek *L. monocytogenes* sayılarının incelendiği bir çalışmada nisin veya nisin- lizozim kombinasyonlarının 2- 3 haftalık depolama periyodunda tespit edilebilir düzeylerin altında indirgeme ile etkili oldukları görülmüştür. Paket pastörizasyonunun bu antimikrobiyal uygulamalarla desteklenmesi, bakteriyal popülasyonun 12 haftalık periyodun 9 haftasında tespit edilebilir düzeylerin altına inmesini sağlamış ve *L. monocytogenes*'in soğuk depolama boyunca gelişmesi engellenmiştir (140).

Son yıllarda özellikle gıdalardan identifiye edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretebilme yetenekleri ve onların ürettiği bakteriyosinlerin tanımlanması yönünde yapılan araştırmalar sonucu bakteriyosinlerin başta Gram pozitif mikroorganizmalar olmak üzere birçok patojene karşı bakteriyosidal ve bakterisit etki gösterdiği bildirilmektedir. Fakat gıda ortamında bakteriyosinlerin antimikrobiyal etkilerini araştıran çalışmalar bakteriyosinlerin laboratuvar ortamındaki etkileri ile gıda sistemlerdeki etkilerinin çok farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Direk olarak gıda uygulamalarında aynı başarı söz konusu olmamaktadır (102). Nisinin aktivitesi gıdanın fiziksel özelliklerine ve kimyasal kompozisyonuna bağlı olmakla birlikte gıdalarda uygulanmasını sınırlayan en büyük

engel, Gram pozitif mikroorganizmalara karşı oldukça etkili olmasına karşın, hücre duvarı zayıf geçirgenlik özelliğine sahip olan Gram negatif bakterilere, maya ve küflere karşı etkisiz kalmasıdır (2, 48, 53, 64, 167). Nisinin dar bir antimikrobiyal spektrumunun olması, vücut sıvılarında çözünürlüğünün az olması, proteazlar tarafından parçalanması ve 7- 7,5 pH aralığında stabil olmaması, dezavantajları olarak karşımıza çıkmakta ve bazı amaçlar için kullanımını olumsuz kılmaktadır (167).

1.5.13. Antioksidan Etkili Maddelerle Koruma

Antioksidanlar, yiyeceklerin hazırlanması ve tüketimi esnasında ortaya çıkan yağın acılaşması ve renk değişimleri gibi major değişikliklerden biri olan oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan ve gıda kalitesini koruyan maddeler olarak ifade edilmektedir (44). Gıda sanayi açısından antioksidanlar, bitkisel ve hayvansal yağlar ve yağ içeren gıdaların üretimi, depolanması, taşınması ve pazarlanması sırasında normal sıcaklıklarda atmosfer oksijeninin etkisini geciktirerek, gıdanın bozulması ve acılaşmasını belli bir süre engelleyen en etkili maddeler olarak belirtilmektedir (58). Ham maddenin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi insan sağlığı için faydalı, yüksek kaliteli gıda için uygunluğunun belirlenmesine izin verdiği için oldukça önemlidir. Antioksidanların, genellikle fenolik bir hidroksil gruptan bir H atomu vererek lipit zincirinde serbest radikalleri nötralize ettiğine inanılmaktadır (151). Antioksidanlar zincir tepkimesinin ilerleme aşamasında oluşan ROO[·] serbest radikale hidrojen atomu vererek bu reaksiyonu durdururlar. Bitiş aşamasında serbest antioksidan radikalleri kendi aralarında reaksiyona girerek antioksidan molekülünü yeniden oluşturarak veya ilerleme aşamasında oluşmuş ROO[·] serbest radikali ile reaksiyona girerek etki gösterirler (42, 113).

Lipitler fermente et ürünlerinin kalitesi üzerinde anahtar rol oynamaktadır. Et ürünlerinin duyu niteliklerinin çoğu, içerdikleri lipitlerinin özellikleri ile bu lipitlerde işleme sırasında meydana gelen lipolitik ve oksidatif parçalanma olaylarına bağlıdır. Fermente et ürünlerinde lipit reaksiyonları etin kaynağına, özellikle ırka ve

besleme programına, üretim sürecinde kullanılan diğer hammaddeler, katkı maddeleri, starter kültürler ve işleme koşullarına bağlıdır. İşleme sırasında lipitler, işleme boyunca aktif kalan et lipazları tarafından gerçekleştirilen şiddetli bir hidrolize maruz kalmaktadır. Lipit hidrolizi sonucu açığa çıkan serbest yağ asitleri okside olarak ürünün özellikle duyuşal niteliklerini etkilemektedir (77).

Yağ ve yağlı gıdalardaki oksidasyon, hem beslenme fizyolojisi hem de teknolojik ve ekonomik açılardan oldukça önemlidir. Bu yüzden, otooksidasyonun fiziksel ve teknolojik olarak önlenemediği durumlarda, gıdalarda, antioksidanlar ve sinerjistler kullanılmaktadır. Antioksidanlar E sisteminde 300- 326 aralığında bulunmaktadır (117). Yağlarda ve yağ içeren gıdalarda kullanılan antioksidanların taşınması gereken özellikler aşığıda özetlenmiştir:

- Gıdalarda kullanıldıkları dozlarda toksik etkileri olmamalı,
- Düşük konsantrasyonlarda etkili olabilmeli,
- Kolayca temin edilebilmeli,
- Kızartma gibi ısı işlemlerde etkisini kaybetmemeli,
- Gıdada istenmeyen renk ve lezzet değişimlerine neden olmamalı,
- Maliyeti düşük olmalıdır (92).

Antioksidanların büyük bir kısmı yapısında flavonoidler, fenolik asitler, alkoller, stilbenler, tokoferoller ve tokotrienoller içeren fenolik bileşikler, askorbik asit ve karoten bulunan bitkilerden elde edilir (126). Çeşitli sebzeler ve meyveler, biberiye, adaçayı, soya, turunçgiller, susam, zeytin, keçiyoynuzu zarfı ve üzüm gibi birçok gıda doğal antioksidan olarak lipit oksidasyonunda yüksek aktiviteye sahiptirler (149). Örneğin askorbik asit, meyve ve sebzelerde kesilen yüzeylerin havanın oksijenine bağlı olarak enzimatik esmerleşmesini, hidrojen atomlarını fenolik bileşiklerin enzimatik oksidasyonu ile oluşan “quinon”lara geri göndererek önleyen indirgeyici fonksiyona sahip bir antioksidandır (117).

Bütün doğal sıvı ve katı yağlar, genellikle düşük sınırlar içinde ve değişik miktarlarda doğal antioksidan maddeleri içerirler. Özellikle yağların oksidatif tepkimelere karşı direnç gösterdiği indüksiyon periyodu olarak bilinen süreçte, yağların ana bileşenleri yerine kendileri okside olarak bu bileşenleri korurlar (117). Antioksidanlardan en etkili sonucun alınabilmesi için, gıdaya erken safhalarda,

oksidasyonun başlangıcından önce, örneğin rafinasyondan önce ilave edilmesi gerekmektedir. Bu durumda reaksiyonu önleyebilir veya azaltabilirler (92).

Bitkisel yağların çoğu doğal antioksidanları önemli ölçüde içermelerine rağmen hayvansal yağlar doğal yapılarında oksidatif etkiye karşı korunmaya sahip değildirler. Bu bakımdan sığır iç yağı, tavuk yağı, domuz yağı gibi hayvansal yağlarda stabilizasyon oldukça önemlidir (117).

İki veya daha fazla antioksidanın bir arada kullanılmasıyla elde edilen daha kuvvetli etki sinerjizm olarak ifade edilir (92). Antioksidanların istenen etkiyi oluşturmaları belirli dozlarda kullanımları ile mümkündür. Konsantrasyonlarına bağlı olarak hem antioksidatif hem de prooksidatif olarak etki gösterirler. Yüksek dozlarda kullanılmaları halinde prooksidan gibi davrandıkları da gözlenmiştir (27, 47, 136, 234). Bu iki karşıt etki in vivo ve in vitro verilerin karşılaştırılmasında zorluk çıkarır (234). Ekstraktları daha çok distilasyonla elde edilen, aromatik bitkiler, terpenler ve terpenoidler, aromatik ve alifatik bileşikler ihtiva ederler. Bunların çoğu in vitro fizikokimyasal çalışmalarda antioksidan olarak karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, son çalışmalar uçucu yağların ökaryotik hücrelerde, hücre membranları ve mitokondri gibi organellerde prooksidan etkili olarak da rol oynadığını göstermektedir. Quercetin, gossipol ve myricetin gibi bitki kökenli fenolik bileşiklerde, antioksidan (düşük mikromolar konsantrasyonlarda) ve prooksidan (100 μM 'de) etkiler gözlemlenmiştir. Uçucu yağlar tip ve konsantrasyona bağlı olarak, yaşayan hücrelerde genotoksik değildir, fakat sitotoksik etki gösterirler. Bazı durumlarda, uçucu yağlarla intraselluler redoks potansiyelinde değişiklik ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olabilir. Bu bulgular, uçucu yağların yararlı etkilerinin, hücresel düzeydeki prooksidan etkilerine bağlı olduğunu gösterir (136).

1.5.13.1. Doğal Antioksidanlar

Fenolik bileşikler veya polifenoller, 8000'den fazla fenolik yapı ile bitkilerin ikincil metabolitlerinin geniş bir bölümünü oluştururlar. Coğrafi bölgeler arasındaki farklılığın sonucunda, diyetteki alımları değişiklik gösterebilir. Bununla birlikte, diyetin bütününde ayrılmaz bir parçadırlar ve sebzeler, meyveler ve içeceklerde

önemli miktarda bulunurlar. Polifenoller antibakteriyel, antiinflamatuvar, antialerjik, hepatoprotektif, antitrombolik, antiviral, antikarsinojenik ve vazodilatasyon etkiler içeren geniş biyolojik yararlılık sergilerler. Bunun yanında, bitkisel gıdalarda bulunmaları, elde edilebilmelerindeki kolaylık ve kimyasal yapı karakterleri baz alınarak yapılan çalışmalarda, 30'dan fazla fenolik bileşikte antioksidan aktivite ölçülmüştür (206). Bitkisel dokuların antioksidan kapasiteleri, superoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi serbest radikal toplayıcı enzimlerin aktivitesi ve başlıca fenolik bileşikler, karotenoidler, tokoferol ve askorbik asit gibi antioksidan maddelerin içerikleri ile yakından ilişkilidir (32).

Antioksidan olarak değerlendirilen uçucu yağlar antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparaziter, insektisidal, iyileştirici olarak kullanımlarının yanında son zamanlarda farmasötikal, sanitasyonda, kozmetik, plastik sanayide, tarım ve gıda endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (27, 147). Meyveler, sebzeler, şifalı bitkiler veya onların fitokimyasal bileşikleri, kanser oluşumunu başlatan DNA hasarına karşı koruyucu olarak, antioksidan içeren gıdaların diyetle bulunması önerilmiştir. DNA hasarına aracılık eden ROS'un etkileri, endojen enzimler ve diyetle hücre içinde biriken antioksidanlarla sınırlandırılır (136).

Biberiye, adaçayı, kekik, dağ kekiği, tarçın, karanfil, zencefil, kimyon, kişniş, fesleğen, zahter, nane, maydanoz, mercanköşk, karabiber, kırmızıbiber ve sarımsak gibi birçok bitki potansiyel antioksidan aktiviteleri ile dikkat çekmektedirler (238). Karanfil yağının bitkisel yağlar içinde en aktif antioksidan olduğu belirlenmiştir. Fakat biberiye ve adaçayı, az kokularıyla, baharatlar içinde en etkili antioksidanlar olarak tercih edilirler. Zerdeçal ise gıdalarda, genelde renk verici olarak kullanılır ve kokusuz, ısıya dayanıklı antioksidan bir bileşik olan tetrahydrocurcumin içerir (81). BHA gibi sentetik antioksidanlar hayvansal yağlarda yüksek çözünürlüğe sahip oldukları için birçok işlem görmüş ve pişmiş gıdalarda stabilite sağlamaktadırlar (12). Bununla birlikte, bu gibi sentetik antioksidanların kullanılmasının sağlık açısından kanserli hücre oluşumunu uyararak insan sağlığını olumsuz etkileme potansiyeli taşıması ve toksisiteleri nedeniyle güvenin azalması, doğal özellikli diğer antioksidanların araştırılması ve geliştirilmesine ilgiyi artırmaktadır (28).

Türk Gıda Kodeksi'nde geçen "*Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği*"nin ekler bölümünde, gıda katkı maddesi olarak

kullanılan antioksidanlardan bahsedilmektedir. “E” kodu ile verilen bu antioksidan maddeler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10: Gıda Sanayiinde Kullanılan Antioksidan Katkı Maddeleri ve Kodları (223).

E Kodu	Adı
E 300	Askorbik asit
E 301	Sodyum askorbat
E 302	Kalsiyum askorbat
E 304	Askorbik asidin yağ asidi esterleri (i) Askorbil palmitat (ii) Askorbil stearat
E 306	Tokoferolce zengin ekstrakt
E 307	Alfatokoferol
E 308	Gamatokoferol
E 309	Deltatokoferol

Yine aynı tebliğde kullanımına izin verilen sentetik antioksidanlar aşağıdaki Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sentetik Antioksidanlar (223).

E kodu	Adı
E 310	Propil gallat
E 311	Oktil gallat
E 312	Dodesil gallat
E 320	Bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA)
E 321	Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT)
E 315	Eritorbik asit
E 316	Sodyum eritorbat

Kıymanın raf ömrünü azaltan 3 önemli faktör vardır. Mikrobiyal kontaminasyon, sadece renk için değil aynı zamanda güvenlik için de önemlidir. Diğer 2 faktör ise acılaşmaya neden olan lipid oksidasyonu ve renk bozulmasına neden olan myoglobinde oksidatif etkilerdir. Bütün bu faktörlerin ikincil defekti ise aromada ve kokuda bozulmalardır (70). Buzdolabı sıcaklığında, atmosferik şartlarda, sığır kıymalarının maksimum 48 saat tüketici tarafından kabul edilebilir parlak kırmızı rengini koruduğu bilinmektedir. Oksitlenmenin rengi olan kahverengi renge karşı parlak kırmızı renk, tazelik ve güvenlik açısından tüketiciler için önemli bir kriterdir. Kıyma, kastan alınan et kesitine kıyasla, daha çok yüzeyi hava ile temas eder ve daha fazla mikrobiyolojik kontaminasyona maruz kalmak suretiyle daha hızlı kahverengileşmeye ve ekşimeye meyillidir. Ayrıca, metmyoglobin oluşumunu azalttığı bilinen indirgeyicilerin de kaybını hızlandırır (190). Etin ezilmesi, parçalanması oksidasyona karşı eğilimi artırdığından antioksidan madde kesilmiş, kıyma haline getirilmiş veya ezilmiş ürünlerde daha etkin sonuçlar vermektedir (92).

Protein oksidasyonu ile ilgili medikal araştırmalar yapılmışsa da gıda ile ilgili araştırmalar oldukça sınırlıdır. Etlerdeki protein oksidasyonu gerek lipid oksidasyonu ile farklı yollar izlemesi, gerek antioksidanların etkilerinin farklı olmasından dolayı ilgi kazanmıştır. Bitki ekstraktı ve baharatların içerdikleri polifenollerin antioksidatif etki gösterdikleri bilinmektedir, fakat gıdadaki protein oksidasyonu ile ilişkileri açıklanmamıştır. Protein oksidasyonu gıdada yumuşaklığı ve sululuğu azaltarak tadın bozulmasına neden olur ve yenilebilme kalitesini düşürür. Proteinlerdeki oksidasyon kaynaklı değişiklikler, hidroperoksit ve karbonil oluşumuna, molekül içi ve moleküller arası çapraz disülfid bağların oluşumuna, peptit iskeletin parçalanmasına ve protein çözünürlüğünün azalmasına neden olur. Kas dokusundaki karbonil içeriği, oksidasyon başlatıcı seviyeye, kas tipine ve protein çözünürlüğüne bağlı olarak okside olmuş dokuda 2- 14 Nmol/g iken, okside olmamış kas dokusunda 1 Nmol/g proteindir. Son çalışmalarda, 6 günlük muhafaza sonrasında, sığır eti örneklerinde paketleme atmosferi ve antioksidan kullanımına bağlı olarak, karbonil içeriği 2 Nmol/g'dan az olarak bulunmuştur. Protein karbonil içeriği Dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatizasyonu yoluyla ölçülmektedir (138).

Antioksidanlı paketlemede ürünün raf ömrüne katkıda bulunan antioksidan belli bir miktarda eklenir. Oksidasyon yaygın olarak gıdanın yüzeyinde görüldüğünden, antioksidanlı paketleme, ürünün yüzeyini acılaşıma ve bozulmalardan (küflenme) koruyan bir araçtır. Yavaş olan bu mekanizma, aynı zamanda gıdaya kesintisiz antioksidan sağlar (42).

Kaliteli ürün gelişimi için bu değişikliklerin kontrol edilmesi ve gıdanın güvenli olarak tüketiciye ulaştırılabilmesi için raf ömrünü uzatacak kimyasal koruyucular kullanılsa da muhtemel karsinojenik etkileri olduğu sonucunu ortaya çıkaran çalışmalarla bu maddelere güven azalarak kullanımları sınırlanmıştır. Tüketicilerin kimyasal koruyucuları içermeyen ve az işlem görmüş gıdaları tercih etmeleri ve son yıllarda antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan infeksiyon riski artışıyla bağışıklık sisteminin baskılanmasının getirdiği endişeler sonucu oluşan doğal ürünlere yönelimlerle bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır.

Özellikle gıdalarda kullanılan kimyasal koruyucuların yerini alabilecek alternatif doğal koruyucular olan bitki, baharat ve uçucu yağların gıdalarda doğal kaynaklı koruyucular olarak kullanım imkanını araştıran birçok çalışma yapılmaktadır. Yine, nisin gibi tüketimleri güvenli olan, bakteriler tarafından üretilen ve az işlem görmüş gıdalarda dahi patojen ve bozulma etmeni organizmalara karşı etkili olan bakteriyosinler üzerindeki çalışmalar da giderek artmaktadır. Bununla birlikte, nisin bazı koruyucu madde ve proseslerle birlikte kullanımıyla gıdaların mikrobiyolojik kalitesi üzerinde daha etkili olabileceğinin bildirilmesi, bu konuda daha fazla araştırmaya gereksinim olduğunu göstermektedir. Ayrıca, şifalı bitki ve baharattan elde edilen uçucu yağların, in vitro denemeler ile antimikrobiyal etkinlikleri ortaya konulsa da gıda ortamındaki etkinliklerinin araştırıldığı çok sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu konuda bilimsel araştırmalar çoğaldıkça doğal antimikrobiyal maddelerin gıda muhafazasında kullanılma olanakları da netlik kazanacaktır.

Bu çalışmada, sığır etinin raf ömrünü uzatmak amacı ile karanfil uçucu yağı ve nisin kombine edilerek emici pedlere uygulanması yöntemiyle, gıda güvenliği açısından sorun yaratan ve ekonomik kayıplara neden olan mikroorganizmalar ve özellikle gıda zehirlenmesine neden olan patojen bakteriler üzerine olası antimikrobiyal ve antioksidan etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Karanfil

Karanfil (*Syzygium aromaticum*) Isparta il merkezindeki bir aktardan temin edilmiştir.

2.1.2. Nisin

Araştırmada 1000 IU/mg kuvvetinde nisin (Maysa E 234 TM) ticari olarak temin edilmiştir.

2.1.3. Kırmızı Et

Sığır eti Kars'ta bulunan ticari bir kasaptan temin edilmiştir. Bir gün önce kesilen ve dinlendirilen sığır karkasının *M. longissimus dorsi* kasından elde edilen yaklaşık 1 cm kalınlığında ve ortalama 100 g ağırlığında bifteklik dilimler kullanılmıştır. Etler soğuk zincir altında aseptik koşullarda en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir.

Kırmızı et örneklerini paketlemede kullanılan polystren tabaklar (130 x 200 x 35 mm.) ve streç film Kars'ta ticari bir marketten temin edilmiştir. Karanfil yağı'nın emdirildiği kuru ped'ler (90 x 135 mm.) MNM Hijyen Ped firmasından sağlanmıştır.

2.1.4. Referans Suşlar

Antibakteriyel etki denemelerinde kullanılan referans suşlar, özellikle gıda kaynaklı patojen bakteriler ile kırmızı ette bozulmaya neden olan bakteri türleri arasından seçilmiştir. Denemelerde kullanılan suşlar ve temin edildiği kaynaklar Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12: Antibakteriyel Etki Denemelerinde Kullanılan Suşlar.

Mikroorganizma	Kodu	Temin Edildiği Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i>	RSKK NO:389	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu (RSKK)
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	ATCC 11509	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Lactobacillus casei</i>	-	Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i>	-	Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Listeria monocytogenes</i>	RSKK NO:475	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Micrococcus luteus</i>	RSKK NO:1123	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Salmonella Enteritidis</i>	RSKK NO:538	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Salmonella Typhimurium</i>	RSKK NO:95091	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Shigella dysenteriae</i>	RSKK NO:1124	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Staphylococcus aureus</i>	RSKK NO:25923	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Yersinia enterocolitica 03</i>	RSKK NO:920	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu
<i>Yersinia enterocolitica 09</i>	RSKK NO:920	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu

2.1.5. Alet ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan temel mikrobiyolojik ve kimyasal malzemeler Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı ve Kafkas Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Karanfil yağının bileşimi Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarında analiz edilmiştir.

2.2. METOD

2.2.1. Karanfil Yağının Hazırlanması

Karanfil yağı, mikserde öğütülüp toz haline getirilen karanfilden Clevenger cihazında (Wisd- Wise Therm) su buharı distilasyonu yöntemiyle elde edilmiştir. Bu amaçla 40 g bitki mikserde (SM, SMP- 104) ince toz haline getirilmiştir. Öğütülen örnek 500 ml'lik cam balon içerisine konularak üzerine 400 ml distile su ilave edildikten sonra Clevenger cihazına yerleştirilmiştir. Üç saatlik distilasyonda elde edilen uçucu yağ, denemelerde kullanıncaya kadar koyu renkli şişelerde, ağzı kapalı olarak 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen karanfil yağı en geç 72 saat içinde analizlerde kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan karanfil yağı, kimyasal bileşiminin belirlenmesi için Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarına gönderilmiş ve burada, Adams (4) tarafından belirtilen yöntemle göre identifiye edilmiştir.

2.2.2. Nisinin Hazırlanması

Denemelerde kullanılan nisin istenilen konsantrasyonlarda olacak şekilde Govaris ve ark. (86)'nın belirttiği şekilde 0,02 N HCl'de çözündürülmüş, 0,22 µm por çaplı mikrofiltre (MILLEX-GV- PVDF, 33 mm) ile sterilize edilmiş ve bekletilmeden taze olarak kullanılmıştır.

2.2.3. Karanfil Uçucu Yağının Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Referans suşların (Tablo 12) her biri Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM 0225)'a inokule edilip, uygun ısı ve atmosferde inkübe edilmiştir. Her bir suş için saflık kontrolü Tablo 13'de bildirilen besi yerlerine ekilerek yapılmıştır. Denemelerde 18 saatlik aktif kültürler kullanılmış ve bakteri yoğunluğu en az 10^7 kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Karanfil yağının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkilerini belirlemek için, Nostro ve ark. (159) tarafından bildirilen broth dilüsyon metodu kullanılarak karanfil yağının bakteri hücrelerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) belirlenmiştir. Bunun için % 0,1 oranında Tween 80 (Merck-822187) içeren Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM 0225) içerisine farklı konsantrasyonlarda karanfil yağı ilave edilmiştir. Aynı zamanda % 1 oranında test mikroorganizmaları da broth'un içine inoküle edilerek ½., 2., 4. ve 24. saatlerde yayma plak ve dökme plak metodları ile her bir referans suş için belirtilen besiyerlerine ekimleri yapılmış ve uygun inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir. Ekimlerin 24. saatleri sonunda besi yerlerinde koloni sayımı yapılmıştır. MIC, 24. saat sonunda bakteri üremesinin tespit edilemediği en düşük yağ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Denemeler üç tekrar halinde yapılmıştır.

Araştırmada karanfil yağının broth içerisinde homojen dağılmasını sağlamak adına kullanılan %0,1 konsantrasyonundaki tween 80 çözültisinin de tek başına söz konusu referans suşlar üzerine yukarıda belirtilen yöntem ile antimikrobiyel etkisi

denenmiştir. Böylece Antimikrobiyel etkinin karanfil yağından mı yoksa tween 80 çözeltisinden mi kaynaklandığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Tablo 13: Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar, Besiyerleri ve İnkübasyon Koşulları.

Mikroorganizma	Kullanılan Besiyeri	İnkübasyon Koşulları
<i>Escherichia coli</i>	Violet Red Bile Agar (Oxoid CM0107)	Aerob 44,5 °C 24 sa.
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Brillant Green Agar (Modified) (Oxoid CM0329)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Brillant Green Agar (Modified) (Oxoid CM0329)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Shigella dysenteriae</i>	Salmonella -Shigella Agar (Merck 1.07667)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeria Selective Agar Base (Oxoid CM0856)	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker Agar Base* (Oxoid CM0275)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Micrococcus luteus</i>	Baird Parker Agar Base* (Oxoid CM0275)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillus Cereus Selective Agar (Oxoid CM0617)	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	STAA Agar Base** (Oxoid CM0881)	Anaerob 25 °C 24 sa.
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS Agar (de Man-Rogosa, Sharpe) (Oxoid CM0361)	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Lactococcus lactis</i>	MRS Agar (de Man-Rogosa, Sharpe) (Oxoid CM0361),	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MRS Agar (de Man-Rogosa, Sharpe) (Oxoid CM0361)	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonas Agar Base*** (Oxoid CM0559)	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Yersinia enterocolitica 03</i>	Yersinia Selective Agar Base**** (Oxoid CM0653)	Aerob 30 °C 24 sa.
<i>Yersinia enterocolitica 09</i>	Yersinia Selective Agar Base**** (Oxoid CM0653)	Aerob 30 °C 24 sa.

* + **Egg yolk K-Tellurite:** (200 ml egg yolk, 4,25 g NaCl, 2,1 g K. Tellurite, 1000 ml distile su -50 ml emulsiyon + 950 ml besiyeri), ** + **STAA Supplement** (Oxoid SR 151E), *** + **CFC Supplement** (Oxoid SR 103) **** + **Yersinia Selective Supplement** (Oxoid SR 0109E).

2.2.4. Nisinin Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM 0225)'a inoküle edilen referans suşların (Tablo 12) her biri uygun ısı ve atmosferde inkübe edilerek saflık kontrolleri Tablo 13'de bildirilen besi yerlerine ekilerek yapılmıştır.

Nisin, 0,02 N HCl'de çözülürerek 0,22 µm por çaplı mikrofiltre (MILLEX-GV- PVDF, 33 mm) ile sterilize edilmiş ve 25.000 IU/ml oranıyla stok solusyon olarak hazırlanmıştır. Antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için, Nostro ve ark. (159) tarafından bildirilen broth dilüsyon metodu kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) belirlenmiştir. Bunun için, Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM 0225) içeren tüpler içerisine stok solusyondan alınan farklı konsantrasyonlarda nisin ilave edilmiştir. Aynı zamanda % 1 oranında test mikroorganizmaları da broth'un içine inoküle edilerek ilk ½., 6. ve 24. saatlerde yayma plak ve dökme plak metodları ile her bir referans suş için belirtilen besi yerlerine ekimleri yapılmış ve uygun inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir. Ekimlerin 24. saatleri sonunda besi yerlerinde koloni sayımı yapılmıştır. MIC, 24. saat sonunda bakteri üremesinin tespit edilemediği en düşük nisin konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Denemeler üç tekrar halinde yapılmıştır.

Araştırmada nisinin çözünmesi için kullanılan 0,02 N HCl çözeltisinin de tek başına söz konusu referans suşlar üzerine yukarıda belirtilen yöntem ile antimikrobiyel etkisi denenmiştir. Böylece antimikrobiyel etkinin nisinden mi yoksa HCl çözeltisinden mi kaynaklandığı belirlenmeye çalışılmıştır.

2.2.5. Karanfil Yağı ve Nisinin Soğuk Muhafazada Kırmızı Et Raf Ömrü Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Satış yerinden soğuk zincir şartlarına uygun olarak laboratuvara getirilen sığır eti örnekleri (*M. longissimus dorsi* kasından elde edilen bifteklik dilimler) aseptik olarak yağ ve fasiolarından temizlenerek eşit miktarlarda olacak şekilde ayarlanmıştır. Resim 1'de örneklerin yerleştirildiği deney düzeneği verilmiştir.



Resim 1: Çalışmada Et Örneklerinin Yerleştirildiği ve Muhafaza Periyodu İçin Hazırlanan Deney Düzenegi.

Oral ve ark. (162) tarafından antibakteriyel maddenin pedlere emdirilmesi şeklinde uygulanan yöntem temel alınarak deneysel düzenegin oluşturulması aşamasında dokuz grup belirlenmiştir. Birinci grup et örnekleri (Kontrol grubu- K) pedlere 5 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) emdirilerek her bir pakette yaklaşık 100'er g olacak şekilde et dilimlerinin yerleştirilmesiyle hazırlanmış ve üzerileri streç film ile kaplanmıştır. Deneme grupları için de aynı düzenekler oluşturulmuş fakat deneme gruplarında pedlere FTS yerine 5 ml karanfil yağının 2 farklı konsantrasyonu, karanfil yağı ile nisin 4 farklı kombinasyonu ve nisin 2 farklı konsantrasyonu emdirilmiştir. Böylece 8 adet deneme düzenegi oluşturulmuştur. Hazırlanan bu gruplar % 7 (1. Grup) ve % 10 (2. Grup) karanfil yağı içeren gruplar, 3.000 IU (3. Grup) ve 6.000 IU (4. Grup) nisin içeren gruplar ile % 7 karanfil yağı + 3.000 IU nisin (5. Grup), % 7 karanfil yağı + 6.000 IU nisin (6. Grup), % 10 karanfil yağı + 3.000 IU nisin (7. Grup), % 10 karanfil yağı + 6.000 IU nisin (8. Grup) kombinasyonlarını içeren gruplar olarak adlandırılmıştır. MIC çalışmaları sırasında yapılan ön denemelerde gıdaya uygulanacak konsantrasyonların daha yüksek olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle uygulanacak konsantrasyonlarla ilgili olarak karanfil yağı için belirlenen MIC düzeylerinin üzerindeki konsantrasyonlar denenmiştir. Pedlere emdirilecek karanfil yağı % 0,1 tween 80 içeren steril distile

suda hazırlanmıştır. Tween 80 karanfil yağının distile su içerisinde dağılımını kolaylaştırmak ve pedler üzerine eşit miktarda bırakılabilmesini sağlamak üzere kullanılmıştır. Deneme gruplarının bileşimi Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14: Çalışmada Kullanılan Deneme Grupları.

Gruplar	Deneme Gruplarının Bileşimi
Grup K (Kontrol)	% 0,85 Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)
1. Grup	% 7 Karanfil Yağı
2. Grup	% 10 Karanfil Yağı
3. Grup	3.000 IU Nisin
4. Grup	6.000 IU Nisin
5. Grup	% 7 Karanfil Yağı + 3.000 IU Nisin
6. Grup	% 7 Karanfil Yağı + 6.000 IU Nisin
7. Grup	% 10 Karanfil Yağı + 3.000 IU Nisin
8. Grup	% 10 Karanfil Yağı + 6.000 IU Nisin

Bütün deneme grupları (9 grup) 4 °C \pm 1 °C’de muhafaza edilmiştir. Muhafaza periyodunun 0., 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13. ve 14. günlerinde et örnekleri alınarak organoleptik, fiziksel, mikrobiyolojik ve kimyasal analizleri yapılmış ve denemeler 3 defa tekrarlanmıştır.

2.2.5.1. Mikrobiyolojik Analizler

Kontrol (K) ve deneme gruplarının (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) toplam mezofil aerob bakteri (TMAB), toplam psikrotrof aerob bakteri (TPAB), *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, koliform ve fekal koliform grubu bakteri, laktik asit bakterileri, anaerob sülfid indirgeyen bakteriler, *Brochotrix spp.* ve *S. aureus* sayıları muhafaza süresi boyunca takip edilmiştir.

10 g et örneği 90 ml FTS ile sulandırılarak stomacher'de (IUL Instrument-MASTICATOR) 2 dakika süreyle homojenize edilmiş ve elde edilen homojenizat, steril boş tüplere aktarılmıştır. Homojenizatın FTS içerisinde desimal dilusyonları hazırlanarak mikroorganizmaya spesifik olan ve Tablo 15'de bildirilen besi yerlerine dökme ve yayma yöntemleri ile paralel ekimleri yapılmıştır.

Tablo 15: Mikrobiyolojik Analizler ve Bakteri Kültürlerinin İnkübasyon Koşulları.

Mikroorganizma	Kullanılan Besi Yeri	İnkübasyon Koşulları
Muhtemel Fekal Koliform Grubu Bakteri	Violet Red Bile Agar (Oxoid CM0107)	Aerob 44,5 °C 24 sa.
Muhtemel Koliform Grubu Bakteri	Violet Red Bile Agar (Oxoid CM0107)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid CM0485)	Aerob 37 °C 24 sa.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Pseudomonas Agar Base** (Oxoid CM0559)	Aerob 30 °C 48 sa.
Toplam Mezofil Aerob Bakteri (TMAB)	Plate Count Agar (PCA) (Oxoid CM0325)	Aerob 30 °C 24 sa.
Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB)	Plate Count Agar (PCA) (Oxoid CM0325)	Aerob 7 °C 10 gün
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker Agar Base* (Oxoid CM0275)	Aerob 37 °C 24 sa.
Laktik Asit Bakterileri (LAB)	M.R.S. Agar (de man-Ragosa, Sharpe) (Oxoid CM0361)	Aerob 30 °C 72 sa.
<i>Brochotrix spp.</i>	STAA Agar Base*** (Oxoid CM0881)	Anaerob 22 °C 48 sa.
Sülfite İndirgeyen Bakteriler	SPS (Sülfite Polymyxin Sulfadiazine) Agar (Merck 1.10235)	Anaerob 30 °C 24 sa.

+Egg yolk K-Tellurite: (200 ml egg yolk, 4,25 g NaCl, 2,1 g K. Tellurite, 1000 ml distile su -50 ml emulsiyon + 950 ml besiyeri), ****+CFC Supplement** (Oxoid SR 103), *****+STAA Supplement** (Oxoid SR 151E).

2.2.5.1.1. Toplam Mezofil Aerob Bakteri (TMAB) Sayımı

Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM 325) besi yeri kullanılmıştır. Yayma plak yöntemi ile uygun dilüsyonlardan ekimi yapılan petripler 30 °C'de 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılarak değerlendirilmiştir (7).

2.2.5.1.2. Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB) Sayımı

Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM 325) besi yeri kullanılmıştır. Yayma plak yöntemi ile uygun dilüsyonlardan ekimi yapılan PCA plakları 7 °C'de 10 gün inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılarak değerlendirilmesi yapılmıştır (7).

2.2.5.1.3. *Pseudomonas spp.* Sayımı

Pseudomonas Agar Base (Oxoid CM 559) ile C-F-C Supplement (Oxoid SR 103) kullanılmıştır. Ekimi yapılan petripler 30 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılarak değerlendirilmesi yapılmıştır (97).

2.2.5.1.4. Laktik Asit Bakterisi (LAB) Sayımı

De Man- Rogosa, Sharpe Agar (MRS, Oxoid CM 361) besi yeri kullanılmıştır. MRS Agar'a ekimi yapılan petripler 30 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda üreyen koloniler sayılarak değerlendirme yapılmıştır (97).

2.2.5.1.5. Enterobacteriaceae Sayımı

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Oxoid CM 485) besi yeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan petriler 37 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan pembe renkli koloniler değerlendirilmeye alınmıştır (97).

2.2.5.1.6. Koliform Grubu Bakteri Sayımı

Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL, Oxoid CM 107) besi yeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan petrilerin 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda oluşan pembe- kırmızı renkli koloniler değerlendirilmiştir (7).

2.2.5.1.7. Fekal Koliform Grubu Bakteri Sayımı

Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL, Oxoid CM 107) besi yeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan petriler 44,5 °C'de 24- 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan pembe- kırmızı renkli koloniler değerlendirilmeye alınmıştır (7).

2.2.5.1.8. Sülfid İndirgeyen Bakteri Sayımı

SPS (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine) Agar (Merck 1.10235) besi yeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan petriler anaerob ortamda 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda üreyen siyah renkli koloniler sayılarak değerlendirme yapılmıştır (97).

2.2.5.1.9. *Brochotrix spp.* Sayımı

STAA Agar Base (Oxoid CM0881) besi yeri ile STAA Supplement (Oxoid SR 151E) kullanılmıştır. Ekimi yapılan petriler 22 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılarak değerlendirilmesi yapılmıştır (101).

2.2.5.1.10. *Staphylococcus aureus* Sayımı

Baird Parker Agar Base (Oxoid CM0275) besi yeri kullanılmıştır. 950 ml besi yerine 50 ml Egg yolk K-Tellurite Supplement (200 ml egg yolk, 4,25 g NaCl, 2,1 g K. Tellurite, 1000 ml distile su) aseptik olarak ilave edilerek hazırlanmıştır. Ekim sonrası 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda oluşan berrak zon oluşturan siyah veya gri renkli, parlak, düzgün koloniler değerlendirilmiştir (7).

2.2.5.2. Kimyasal Analizler

2.2.5.2.1. pH Değeri

Örneklerin homojenizatlarının ve denemeler için hazırlanan karanfil, nisin ve bunların kombinasyonlarını içeren sıvıların pH'ları pH metre (Hanna H1221) ile ölçölüp kaydedilmiştir (134).

2.2.5.2.2. Kokuşma Testi

Soğuk muhafaza süresince kokuşmanın tespiti amacıyla örneklere Eber testi yapılmıştır. Eber deneyinde prensip kokuşma sırasında oluşan amonyağın tespitine dayanır. Bunun için bir deney tüpü içeresine 2- 3 ml taze hazırlanmış Eber Reaktifi

konmuştur. Nohut büyüklüğündeki et örneği bir pens yardımı ile reaktife değdirilmeksizin tüp içine sokularak bir süre tutulmuştur. Duman çıkışı, pozitif olarak kabul edilmiştir. Dumanın yoğunluğu kokuşma derecesine göre değişmektedir (235).

2.2.5.3. Duyusal Analizler

Örneklerin duysal analizleri Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında görev yapan 5 akademik personel tarafından değerlendirilmiştir. Örnekler görüntü, renk ve koku açısından değerlendirmeye alınmıştır. Panelistlerin verdiği rakamlar puan olarak alınmış ve ortalamaları hesaplanmıştır. Muhafaza periyodunun belirlenen günlerinde incelenen örneklerin duysal analizleri Tablo 16’da verilen özellikler göz önüne alınarak değerlendirilmiştir (185).

Tablo 16: Duyusal Analiz Veri Tablosu, (Modifiye Edilmiştir) (185).

Özellik	Özelliğın Tanımı	Yapılacak İşlem
ETİN RENGİ	Etin renginde görülen değişim	Et yüzeyinde açık renk oluşumu “5”, ve etin kendine has parlak kırmızı rengi için “0” puan verip her iki renk arasındaki tonlamalar için 2, 3, 4 puanlarından birini kullanarak değerlendirme yapınız.
ETİN GÖRÜNÜMÜ	Kaslarda gözlenen açıklık-koyuluk durumu	Kırmızı renk için “0” etin parlak kırmızı renginin kaybı, kuruma – kararma-kahverengileşme için “5” puan verip her iki renk arasındaki tonlamalar için 2, 3, 4 puanlarından birini kullanarak değerlendirme yapınız.
KOKU BOZULMA KOKUSU BİTKİ YAĞI KOKUSU	Paket açıldığında gıda maddesinden alınan kokudur. Bozulma belirtilerine ait koku Karanfil yağına ait tipik koku	Kokunun şiddetinin artışına göre -Bozulma kokusu için ‘5’ en fazla- ‘0’ en az, -Karanfil yağı’na ait tipik koku için ‘5’ en fazla- ‘0’ en az olacak şekilde 0- 5 arasında puanlama yapınız.
TAT	Karanfil yağının ağızda bıraktığı aroma	Aromanın ağızda bıraktığı rahatsız edici etkiye göre ‘5’ en fazla, ‘0’ en az olacak şekilde 0- 5 arasında puanlama yapınız.

2.2.5.4. Biyokimyasal Analizler

Örneklerde muhafaza süresi boyunca oksidasyonu takip edebilmek amacıyla Malondialdehit (MDA) değerleri ölçülmüştür.

2.2.5.4.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

0,25 g et örneği alınarak 5 ml fosfat tamponu ile doku homojenizatörü (Biospec, 985370) yardımıyla parçalanmıştır. Daha sonra 4000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, MDA ölçümünde kullanılmak üzere -18 °C'de stoklanmıştır (241).

Örneklerdeki MDA miktarı tayininde sonuçlar, oluşturulan standart eğri yardımıyla MDA/ml doku homojenizatı olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan (D:0,02; % 97; MA: 220,3) ile 20 µmol/l'lik standart çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden 2,5- 5- 10- 20 µmol/l'lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okunmuş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (241).

Aerobik şartlarda 2-thiobarbitürik asit (TBA- (% 98)- Sigma-aldrich- T5500) ile 90 °C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturan MDA'nın absorbansı spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda okunmuştur. Analiz ve analize ait değerlendirmeler Yoshioka ve ark. (241)'a göre yapılmıştır.

Deney tüplerinin her birine 0,5 ml plazma konmuş ve üzerlerine 2,5 ml % 20'lik Triklorasetik asit (TCA- Carlo erba- 411527) ile 1 ml % 0,675'lik TBA eklenmiştir. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılıp vorteksle karıştırılmıştır. 90 °C'de su banyosunda 30 dakika inkübasyonu sağlanmış ve ardından buzlu suda 15 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelmeleri sağlandıktan sonra 4 ml n- Bütanol (Merck- 1.00988) eklenerek tekrar vortekslenmiştir. 3000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu oluşan üst tabakalar ayrılarak 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okunmuştur. Kör tüpü ise deneyin başlangıcında alınan 0,5 ml plazma yerine n- Bütanol konulması ile sağlanmıştır ve diğer tüplere uygulanan işlemlerin aynısı bu tüpe de uygulanmıştır.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

Bağımsız üç tekrar olarak yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Gruplar arasındaki fark değerlendirilirken Tukey testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler Minitab 12 paket programı ile yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Karanfil Yağının Kompozisyonu

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Laboratuvarında GC- MS ile analizi yapılan karanfil yağının ana bileşeni olarak % 87,5 oranında bulunan eugenol tespit edilmiştir. Adams (4)'a göre yapılan analizde elde edilen karanfil yağının bileşimini oluşturan maddelere ait konsantrasyon bilgileri Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17: Karanfil Yağında Tanımlanan Bileşikler.

Sıra	Bileşikler	% oranı
1	Eugenol	87.5
2	α - Humulene	8.0
3	(E,E)- α - FARNESENE	2.1
4	Δ -Amorphene	1.4
5	Caryophyllene oxide	0.2
Toplam		99.2

3.2. Karanfil Yağının Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

MIC çalışmalarında 24 saatlik inkubasyonun sonunda tam bir inhibisyon sağlayarak referans suşlar üzerinde etkili olan karanfil yağı konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Araştırmada karanfil yağının broth içerisinde homojen dağılmasını sağlamak için kullanılan % 0,1 oranındaki tween 80 çözeltisinin tek

başına ekimleri yapılmış ve referans suşlar üzerinde indirgeyici bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

% 30 oranındaki karanfil yağının bile etki edemediği *P. aeruginosa* hariç, kullanılan diğer tüm mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki sağlandığı görülmüştür.

Karanfil yağının *L. monocytogenes* üzerinde % 0,8 oranında kullanıldığında ilk yarım saatte tam bir inhibisyon yapabildiği belirlenmiştir. Bu orandaki karanfil yağı 2., 4. ve 24. saatlerde de tamamen bir inhibisyon sağlamıştır. Karanfil yağı % 0,7 oranında kullanıldığında ise ilk yarım saatte ($4,9 \times 10^2$ log₁₀ kob/ml) ve 2. saatte (2×10^1 kob/ml) oldukça büyük bir indirgeme sağlayarak 24. saatlik inkübasyon sonunda da etkili olduğu görülmüştür. *L. monocytogenes*'e karşı MIC olarak belirlenen % 0,7 oranındaki karanfil yağı $1,2 \times 10^{11}$ kob/ml düzeyinde bir indirgeme sağlamıştır.

Karanfil yağının % 0,8 oranında kullanımı ile $2,9 \times 10^8$ kob/ml düzeyindeki *S. aureus* yoğunluğunun ilk yarım saatte inhibisyonu sağlanmıştır. Karanfil yağı *S. aureus* üzerinde % 0,5 oranında kullanıldığında ilk yarım saatte üreme görülmesine rağmen 2., 4. ve 24. saatin sonunda üreme olmadığı görülmüştür. *S. aureus* için % 0,5 karanfil yağı MIC düzeyi olarak belirlenmiştir.

İlk yarım saatte % 0,2 karanfil yağının *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'e karşı sırasıyla 10^7 log₁₀ kob/ml ve 10^6 log₁₀ kob/ml oranında oldukça yüksek bir indirgeme düzeyine sahip olduğu görülmüştür. $4,3 \times 10^8$ log₁₀ kob/ml düzeyindeki *S. Typhimurium* ve $1,6 \times 10^7$ log₁₀ kob/ml düzeyindeki *S. Enteritidis* için kullanılan % 0,2 oranındaki karanfil yağının 24. saatte tamamen bir inhibisyon sağladığı tespit edilmiştir ve bu oran *S. Typhimurium* ile *S. Enteritidis* için MIC oranı olarak belirlenmiştir.

E. coli'nin 24. saatte $1,3 \times 10^9$ kob/ml düzeyinden indirgenmesini sağlayan MIC oranı % 0,2 olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyon *E. coli* üzerinde ilk yarım saatte oldukça büyük bir indirgeme sağlasa da tamamen temizleme sağlayamamış fakat diğer deneme saatlerinde başarı göstermiştir. % 0,26 oranındaki karanfil yağı ilk yarım saatte, 2., 4. ve 24. saatte de *E. coli*'nin yıkılmasını sağlamıştır.

S. dysenteriae için karanfil yağının % 0,2 oranında kullanılması ile bakteri üzerinde $7,8 \times 10^7$ log₁₀ kob/ml indirgeme sağlanabildiği görülmüştür. *S.*

dysanteriae için % 0,2 oranıyla yarım saatte oldukça büyük bir inhibisyon düzeyine sahip karanfil yağı % 0,1 oranında kullanıldığında 24. saat sonunda bakteriyi $1,2 \times 10^2$ log₁₀ kob/ml bakteri düzeyine indirmişdir.

% 0,8 oranında kullanılan karanfil yağının ilk yarım saatte 10^9 log₁₀ kob/ml düzeyinde bir indirgeme yaptığı *M. luteus* için denemenin 2., 4., 6. ve 24. saatlerinde tamamen inhibisyon sağlanabilmiştir. Karanfil yağı % 0,5 oranında kullanıldığında 24. saatte tamamen inhibisyon sağlamış ve bu konsantrasyon *M. luteus* için MIC düzeyi olarak alınmıştır.

B. subtilis'e karşı % 0,3 karanfil yağı ile ilk yarım saatte $1,5 \times 10^7$ log₁₀ kob/ml düzeyinde bir indirgenme sağlanarak mikroorganizmanın tamamen yıkımlandığı görülmüştür. İnkübasyonun 2., 4. ve 24. saatlerinde de aynı başarıyı gösterdiği tespit edilen karanfil yağının % 0,2 düzeyindeki konsantrasyonu 24. saat sonunda etkili bir şekilde inhibisyon sağlayarak *B. subtilis*'e karşı MIC düzeyi olarak belirlenmiştir.

B. thermosphacta'nın $2,6 \times 10^7$ log₁₀ kob/ml düzeyindeki üremesini 24. saatte indirgeyen MIC düzeyi % 0,1 olarak belirlenmiştir. % 0,2'lik karanfil yağı ise ilk yarım saatte ve analizin diğer saatlerinde başarılı bir şekilde inhibisyon sağlamıştır. *B. thermosphacta* % 0,1 düzeyindeki karanfil yağı MIC değeri ile duyarlı bakterilerden biri olarak belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinden olan *Lb. casei*'nin $1,8 \times 10^9$ log₁₀ kob/ml bakteri yoğunluğunu inhibe etmede kullanılan % 0,5 karanfil yağının ilk yarım saatte daha az etkili olsa da 2. saatte oldukça yoğun bir indirgeme gösterdiği tespit edilmiştir. % 0,8 oranında *Lb. casei*'nin ilk yarım saatte inhibisyonunu sağlayarak etkili olan karanfil yağı % 0,5 konsantrasyonda kullanıldığında 4., ve 24. saatte tam bir inhibisyon sağlamıştır.

Lc. lactis'i ilk yarım saatte ve diğer analiz saatlerinde 1×10^{10} log₁₀ kob/ml düzeyinde indirgeyen karanfil yağı konsantrasyonu % 0,6, 24. saatte inhibe eden konsantrasyon ise % 0,4 olarak bulunmuştur. % 0,4 konsantrasyonundaki karanfil yağı ile *Lc. lactis* yoğunluğu ilk yarım saatte 1×10^3 log₁₀ kob/ml düzeyine indirgenmiş ve 2. saatten itibaren diğer analiz saatlerinde de üremenin olmadığı görülmüştür.

Karanfil yağının % 0,8 konsantrasyonu *Leu. Mesenteroides* için ilk yarım saatte, 2., 4., ve 24. saatlerde etkili olarak bulunmuştur. $3,9 \times 10^9$ log10 kob/ml düzeyindeki *Leu. mesenteroides*'in % 0,5 oranında karanfil yağı ile inhibisyonunda ilk deneme saatlerinde tam bir inhibisyon sağlanmadığı fakat 24. saatte tamamen temizlendiği görülmüştür. Karanfil yağının *Leu. mesenteroides*'e karşı MIC değeri % 0,5 olarak tespit edilmiştir.

Y. enterocolitica O3 ve *Y. enterocolitica O9*'un karanfil yağına karşı oldukça hassas bakteriler oldukları tespit edilmiştir. $6,4 \times 10^8$ log10 kob/ml düzeyindeki *Y. enterocolitica O3* % 0,14 oranındaki, $7,5 \times 10^8$ log10 kob/ml düzeyindeki *Y. enterocolitica O9* ise % 0,16 oranındaki karanfil yağı ile ilk yarım saatte 2., 4. ve 24. saatte inhibe edilebilmişlerdir. *Y. enterocolitica O3* ve *Y. enterocolitica O9*'a karşı karanfil yağının MIC değeri % 0,14 olarak belirlenmiştir.

P. aeruginosa karanfil yağına karşı test edilen bakteriler arasında en dirençli bakteri olarak bulunmuştur. Testte, $1,4 \times 10^{10}$ log10 kob/ml düzeyinde bulunan *P. aeruginosa*'ya karşı % 5 karanfil yağı ilk yarım saatte 3×10^2 log10 kob/ml düzeyine kadar bir indirgeme sağlasa da 2. saatte bu oranın $3,7 \times 10^3$ log10 kob/ml'e çıktığı görülmüştür. Karanfil yağı konsantrasyonu artırıldığında da benzer sonuçlar alınmıştır. % 30 düzeyinde kullanılan karanfil yağı 24. saat sonunda etkili bir inhibisyon sağlayamamıştır. % 30 üzerindeki konsantrasyonlar organoleptik olarak olumsuz değerlendirildiği ve ekonomik bulunmadığı için denenmemiştir. *P. aeruginosa*'ya karşı MIC belirlenememiştir.

Tablo 18'de karanfil yağının referans suşlar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmasında elde edilen bulgular verilmektedir.

Tablo 18: Karanfil Yağının Referans Suşlar Üzerindeki MIC Değerleri.

Bakteri	Denemede Kullanılan Bakteri Yoğunluğu (log10 kob/ml)	Etkili Karanfil Yağı Konsantrasyonu
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	2,6x10 ⁷	% 0,1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3	6,4x10 ⁸	% 0,14
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9	7,5x10 ⁸	% 0,14
<i>Shigella dysantheriae</i>	7,8x10 ⁷	% 0,2
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,6x10 ⁷	% 0,2
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4,3x10 ⁸	% 0,2
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5x10 ⁷	% 0,2
<i>Escherichia coli</i>	1,3x10 ⁹	% 0,2
<i>Lactococcus lactis</i>	1x10 ¹⁰	% 0,4
<i>Micrococcus luteus</i>	1,4x10 ¹⁰	% 0,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3,9x10 ⁹	% 0,5
<i>Lactobacillus casei</i>	1,8x10 ⁹	% 0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,9x10 ⁸	% 0,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,2x10 ¹¹	% 0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,4x10 ¹⁰	% 30 etkisiz

3.3. Nisinin Referans Suşlar Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

Nisinin denemede kullanılan Gram negatif referans suşlar (*E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. dysantheriae*, *Y. enterocolitica* O3 ve O9, *P. aeruginosa*) üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu suşlar üzerinde etkili olabilen nisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu 500.000- 800.000 IU gibi ekonomik olmayan, oldukça yüksek oranlarda kullanılmasını gerektirmiştir. Çalışmada denenen Gram pozitif suşlar üzerinde nisinin MIC'i *M. luteus* için 5.000 IU, *L. monocytogenes* için 7.500 IU, *B. subtilis* için 50.000 IU, *S. aureus* için 75.000 IU ve *B. thermosphacta* için 50.000 IU olarak belirlenmiştir. Kırmızı et üzerinde kullanılan

düşük konsantrasyon olan 3.000 IU nisin *Lb. casei*, *Lc. lactis* ve *Leu. mesenteroides* üzerinde ilk yarım saatte, 6. saatte ve 24. saatte tam bir inhibisyon sağlamıştır. Bununla birlikte, diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde MIC olarak belirlenen düzeylerde ilk yarım saatte büyük bir indirgeme görülse de tamamen yıkımlanma 6. saatte gerçekleşmiştir. MIC düzeylerinin altındaki konsantrasyonlarda ise 6. saatte görülen indirgeme düzeylerinin 24. saatte azaldığı, nisinin etkisini kaybettiği ortaya çıkmıştır.

Araştırmada nisinin çözünmesi için kullanılan 0,02 N HCl çözeltisi de kontrol amacı ile tek başına ekimlerde kullanılmış ve referans suşlar üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

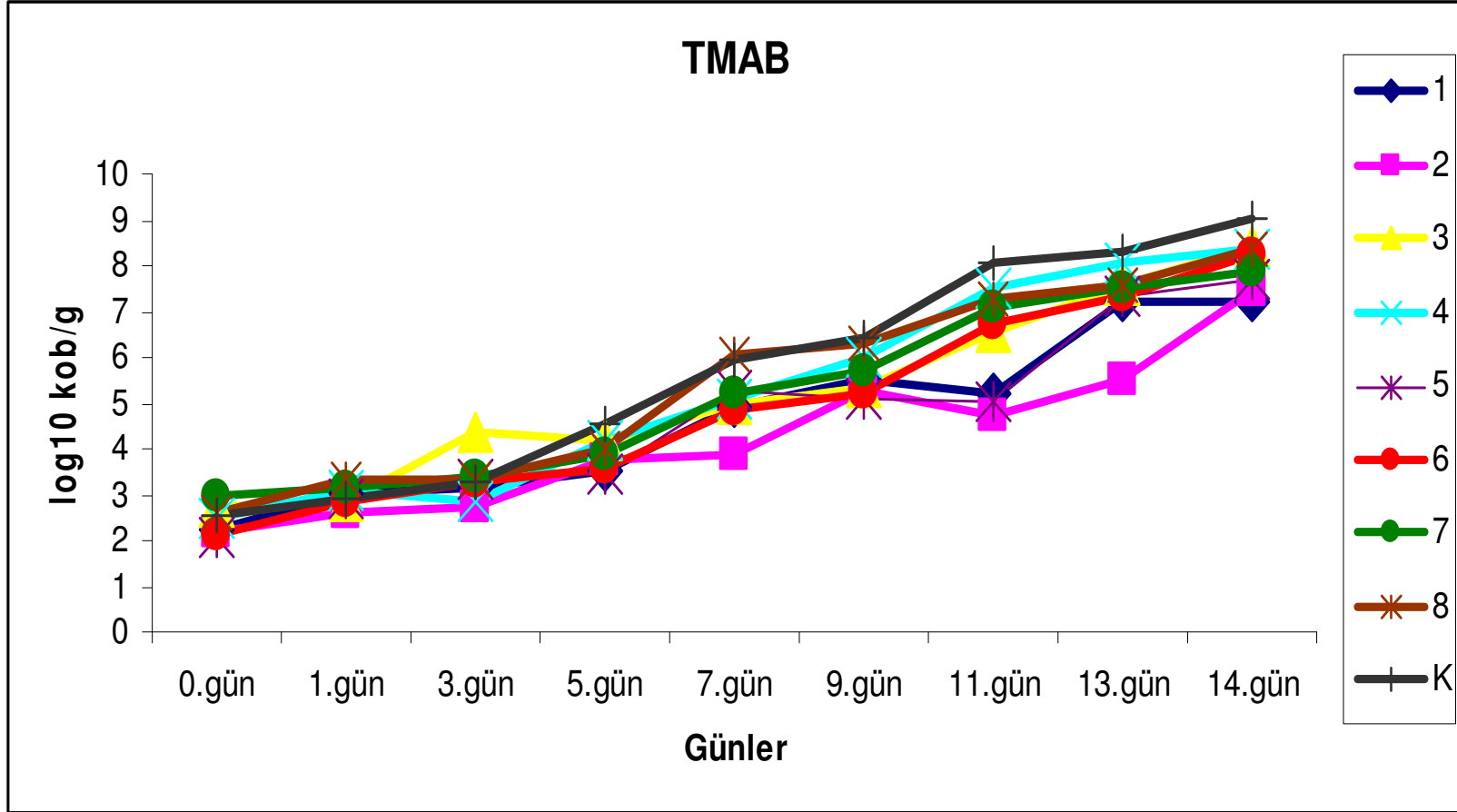
3.4. Karanfil Yağı ve Nisinin Soğuk Muhafazada Kırmızı Et Raf Ömrü Üzerindeki Etkilerine Ait Mikrobiyolojik Analiz Bulguları

Çalışmanın bu aşamasında, karanfil yağı ve nisin ile bunların kombinasyonları kullanılarak soğuk muhafaza sırasında kırmızı et üzerinde antimikrobiyal etkinlikleri araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan deneme gruplarının toplam mezofil bakteri, toplam psikrotrof bakteri, muhtemel koliform ve muhtemel fekal koliform, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Brochotrix spp.*, LAB, sülfid indirgeyen bakteri grubu ve *S. aureus* sayıları üzerine etkileri belirlenmiştir.

Toplam mezofil aerob bakteri (TMAB) sayılarının değerlendirildiği çalışmada, emici pedlere hazırlanan maddelerin emdirildiği ve et örneklerinin paketlenildiği ilk gün olan 0. günde 1., 2., 5. ve 6. deneme gruplarının diğer gruplara ve kontrol grubuna göre başlangıç sayıları açısından daha düşük değerlere sahip oldukları görülmüştür. Ancak 1. ve 3. analiz günlerinde sadece 2. grup diğer gruplara göre daha düşük düzeyde kalabilmiştir. Analizin 5. gününde yine 1., 2., 5. ve 6. deneme grupları kontrole göre yaklaşık 1 logaritmik indirgeme sağlayabilmişlerdir. Analizin 7. gününde kontrole göre 8. grup hariç diğer deneme grupları 1'er logaritmik, 2. grup 3,87 log₁₀ kob/g üreme sayısı ile 2 logaritmik bir fark yaratmıştır. 8. grup (6,05 log₁₀ kob/g) kontrole yakın (5,96 log₁₀ kob/g) bir değer ile üremenin en fazla olduğu deneme grubu olmuştur. Benzer bir tablonun 9. günde de

görülmesine karşın 11. günden itibaren kontrol ile deneme grupları arasında en az 1 logaritmalık fark devam etmiştir. 2. grup, kontrol ile arasında 11. günde yaklaşık 4 logaritmalık, 13. günde 3 logaritmalık ve 14. günde de yaklaşık 2 logaritmalık bir fark yaratmıştır.

Her analiz gününde birbirinden bağımsız örneklerin incelendiği çalışmada genel olarak karanfil yağının yüksek konsantrasyonunu içeren grubun (2. Grup) kendisine ait düşük konsantrasyon grubuna (1. Grup) göre daha fazla indirgeme sağladığı görülmüştür. Bu gruplar ve karanfil yağının düşük konsantrasyonuyla nisinin kombine edildiği grupların (5. ve 6. Grup) kontrol ile karşılaştırıldığında diğer deneme gruplarına göre daha yüksek bir indirgeme gösterdikleri bulunmuştur. Diğer kombinasyon grupları (7. ve 8. Grup) ve nisinin iki farklı konsantrasyonunu içeren deneme gruplarının (3 ve 4. Grup) kontrol grubuna yakın sonuçlar ile etkisiz kaldıkları görülmüştür. Ancak, yapılan istatistiksel analizler sonucunda tüm deneme grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır ($p > 0,05$). TMAB, Tablo 19 ve Grafik 1’de verilmiştir.



Grafik 1: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Mezofilik Aerob Bakteri (TMAB) Sayıları (log10 kob/g).

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

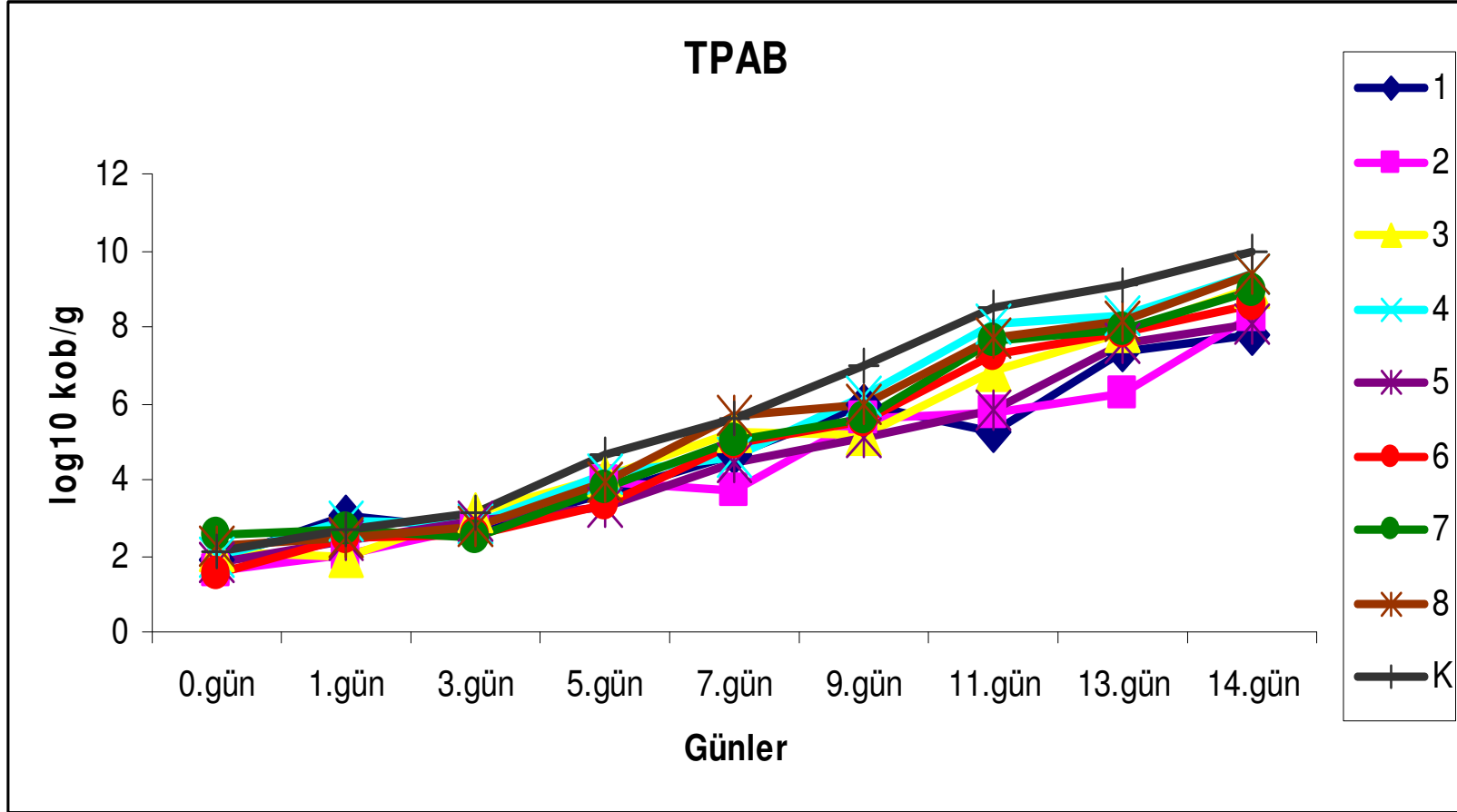
Tablo 19: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Mezofil Aerob Bakteri (TMAB) Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	2,27±0,52	3,05±0,43	3,18±0,81	3,54±0,54	4,89±1,66	5,50±1,60	5,24±1,28	7,24±0,83	7,19±1,16
2	2,17±0,68	2,58±0,66	2,74±0,67	3,73±0,42	3,87±1,05	5,26±1,71	4,70±1,37	5,53±1,96	7,46±0,62
3	2,73±0,32	2,86±0,54	4,34±1,03	4,17±0,93	4,98±1,35	5,34±1,77	6,57±1,27	7,57±0,64	8,45±1,28
4	2,47±0,48	3,09±0,23	2,86±0,81	4,16±0,47	5,07±1,34	6,03±0,94	7,53±0,32	8,07±0,20	8,38±0,76
5	2,08±0,64	2,90±0,50	3,31±0,93	3,43±1,09	5,27±1,00	5,11±1,30	5,01±1,14	7,32±0,68	7,70±0,30
6	2,11±0,70	2,86±0,38	3,27±0,66	3,57±0,92	4,87±1,94	5,23±1,46	6,74±0,91	7,35±0,34	8,25±0,76
7	2,97±0,32	3,18±0,66	3,38±1,01	3,86±0,75	5,21±1,58	5,68±0,89	7,11±0,19	7,49±0,24	7,85±0,74
8	2,62±0,42	3,31±0,65	3,31±0,36	4,00±1,16	6,05±0,88	6,29±0,38	7,28±0,59	7,55±0,29	8,36±0,46
K	2,54±0,40	2,88±0,38	3,28±0,86	4,53±0,64	5,96±0,94	6,42±1,01	8,04±0,47	8,33±0,48	9,03±0,76

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Toplam psikrotrof aerob bakteri (TPAB) sayıları değerlendirilmeye alındığında analizin 0. gününde 2. ve 6. gruplar sırayla 1,61 log₁₀ kob/g ve 1,56 log₁₀ kob/g üreme sayıları ile kontrole göre (2,11 log₁₀ kob/g) yaklaşık 0,5 logaritmalık bir farkla etkili bulunmuşlardır. 5. ve 1. grup da sırasıyla 1,85 log₁₀ kob/g ve 1,91 log₁₀ kob/g'lık üreme sayıları ile bu grupları takip etmişlerdir. Analizin 1. gününde ise 2. grup 2,05 log₁₀ kob/g ve 3. grup 1,98 log₁₀ kob/g ile diğer gruplara göre daha düşük üreme sayısına sahip olmuşlardır. Analizin 3. gününde 7., 6. ve 1. gruplar, 5. gününde ise 5., 6. ve 1. gruplar daha fazla indirgeme yapabilmişlerdir. Kontrolle karşılaştırıldığında 2. grup, analizin 7. ve 9. günlerinde 2 logaritma, 11. ve 13. günlerinde 3 logaritma ve 14. günde 2 logaritma farklı bulunmuştur. 5. ve 6. grup ise 2. gruptan sonra en yüksek indirgemeyi sağlayan gruplar olmuşlardır. Karanfil yağının düşük konsantrasyon içeren grubu 1. grup ise analizin son günlerindeki daha yüksek indirgeme düzeyleri ile nisin grupları ve yüksek karanfil konsantrasyonu içeren kombinasyon gruplarına göre daha başarılı olmuştur. Kontrol grubu, 8. grup kendisine en yakın üreme değerleri olan grup olmakla birlikte, diğer deneme gruplarından daha yüksek üreme düzeylerine sahip olmuştur.

Genel olarak %10 karanfil yağı içeren 2. grup en başarılı grup olmuşken % 7 karanfil yağı ile 3.000 IU ve 6.000 IU nisinin kombine edildiği gruplar (5. ve 6. grup), % 10 karanfil yağı içeren kombinasyon gruplarına göre daha fazla indirgeme sağlamıştır. Nisin içeren gruplar genel olarak başarılı olamazken, yine karanfil yağı ve nisinin yüksek konsantrasyonunu içeren 8. grup da kontrole yakın sonuçlarla etkisiz bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda bu veriler elde edilse de toplam psikrotrof aerob bakteri sayılarını içeren istatistik analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p > 0,05). TPAB sayıları Tablo 20 ve Grafik 2'de verilmiştir.



Grafik 2: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB) Sayıları (log₁₀ kob/g).

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

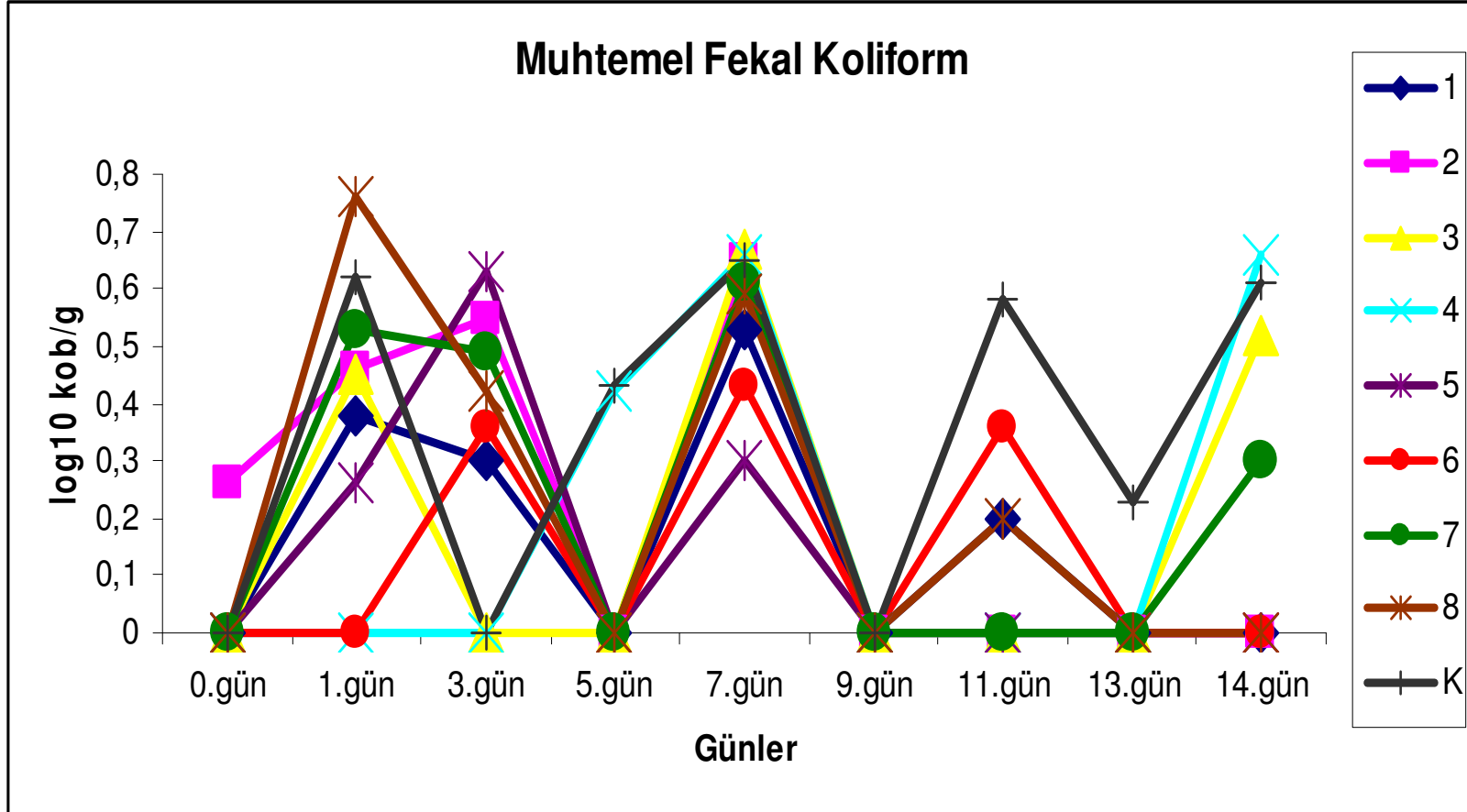
Tablo 20: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Toplam Psikrotrof Aerob Bakteri (TPAB) Sayıları (\log_{10} kob/g \pm standart hata), ($n= 3$).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	1,91 \pm 0,40	3,07 \pm 0,40	2,69 \pm 0,88	3,65 \pm 0,43	4,64 \pm 1,24	5,94 \pm 0,80	5,21 \pm 1,07	7,35 \pm 0,89	7,80 \pm 1,75
2	1,61 \pm 0,66	2,05 \pm 0,68	2,78 \pm 0,34	3,91 \pm 0,33	3,73 \pm 0,76	5,58 \pm 1,24	5,74 \pm 1,21	6,29 \pm 1,32	8,28 \pm 0,74
3	2,13 \pm 0,25	1,98 \pm 1,03	3,12 \pm 0,56	4,09 \pm 1,10	5,25 \pm 1,08	5,14 \pm 1,54	6,81 \pm 1,19	7,88 \pm 0,35	9,03 \pm 1,04
4	1,98 \pm 0,29	2,89 \pm 0,17	2,83 \pm 0,37	4,17 \pm 0,29	4,57 \pm 0,32	6,18 \pm 0,53	8,06 \pm 0,55	8,26 \pm 0,35	9,38 \pm 0,55
5	1,85 \pm 0,73	2,43 \pm 0,48	2,92 \pm 0,44	3,27 \pm 1,17	4,43 \pm 0,43	5,12 \pm 1,25	5,79 \pm 1,32	7,60 \pm 0,80	8,06 \pm 0,43
6	1,56 \pm 0,60	2,47 \pm 0,56	2,54 \pm 0,80	3,32 \pm 1,01	4,95 \pm 1,39	5,51 \pm 1,35	7,25 \pm 1,13	7,83 \pm 0,60	8,60 \pm 0,82
7	2,51 \pm 0,33	2,72 \pm 0,68	2,46 \pm 0,39	3,77 \pm 0,43	5,05 \pm 0,40	5,62 \pm 0,79	7,63 \pm 0,36	7,96 \pm 0,17	8,93 \pm 0,63
8	2,27 \pm 0,52	2,45 \pm 0,85	2,80 \pm 0,26	3,95 \pm 1,07	5,65 \pm 0,74	5,95 \pm 0,68	7,70 \pm 0,53	8,11 \pm 0,17	9,35 \pm 0,64
K	2,11 \pm 0,74	2,66 \pm 0,63	3,13 \pm 0,33	4,65 \pm 0,65	5,57 \pm 0,44	7,00 \pm 0,61	8,53 \pm 0,80	9,10 \pm 0,28	9,97 \pm 0,36

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Analizin 0. gün bulgularına göre 2. grup dışında hiçbir grupta muhtemel fekal koliforma rastlanmamıştır. Sonraki analizlerde 1. günde 4. ve 6. grupta, 3. günde 3., 4. ve kontrol grubunda, 5. günde ise 4. ve kontrol grubu haricindeki diğer gruplarda hiçbir üreme görülmemiştir. Bununla birlikte, 7. grupta bütün deneme gruplarında üreme olmasına karşın 9. günde ise hiçbir grupta fekal koliforma rastlanmamıştır. Yine 13. günde kontrol hariç diğer gruplarda üreme olmamasına karşın 11. ve 14. günlerde bazı gruplarda üreme olması sonucu bir kontaminasyonun olabileceği düşünülmüştür. Muhtemel fekal koliform sayılarının izlendiği bu çalışmada muhafaza periyodu boyunca günlere göre ve deneme gruplarına göre dalgalanma olsa da önemli bir farklılık bulunamamıştır. İstatistik analiz sonuçlarında da önemli bir farklılık olmadığı ortaya çıkmıştır ($p > 0,05$). Muhtemel fekal koliform grubu bakteri sayıları Tablo 21 ve Grafik 3’de verilmiştir.

Muhtemel koliform grubu bakteri açısından değerlendirildiğinde 0. günde başlangıç sayıları olarak en düşük değere sahip grup 1,04 log₁₀ kob/g ile nisin içeren 4. grup olmuştur. 1,20 log₁₀ kob/g ile yine nisin içeren 3. grup ve düşük karanfil yağı içeren 1. grup bu grubu takip etmişlerdir. Ancak, 1. günde ise sırasıyla 5. grup 0,95 log₁₀ kob/g, 6. grup 1,15 log₁₀ kob/g ve 1. grup 1,19 log₁₀ kob/g ile diğer gruplara göre daha fazla indirgeme yapmışlardır. Analizin 3. gününde 3. grupla birlikte 7. günde ise 1. grupla birlikte diğer deneme gruplarından daha yüksek üreme değerlerine sahip olan kontrol grubu 9. günde yaklaşık 1 logaritma, 11. ve 13. günde 2 logaritma farkla daha yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, analizin son günlerinde nisin içeren deneme grupları, karanfil yağı ve kombinasyon gruplarından daha az düzeyde indirgeme sağlamışlardır. Genel olarak 3. günden itibaren diğer gruplara göre daha yüksek indirgeme düzeyine sahip olan % 10 karanfil yağı içeren 2. grup, en iyi indirgemeyi sağlayan grup olmuştur. % 7 karanfil içeren kombinasyon grupları 5 ve 6 ise başlangıçtaki düşük üreme değerleri ile kombinasyonlar arasında daha iyi indirgeme düzeyine sahip olan gruplar olmuşlardır. Bu sonuçlar elde edilmesine rağmen muhtemel koliform grubu bakteriler üzerinde kontrol ve diğer gruplar arasında günlere göre farklılık yaratan istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkmamıştır ($p > 0,05$). Muhtemel koliform grubu bakteri sayılarını içeren veriler Tablo 22 ve Grafik 4’de verilmiştir.



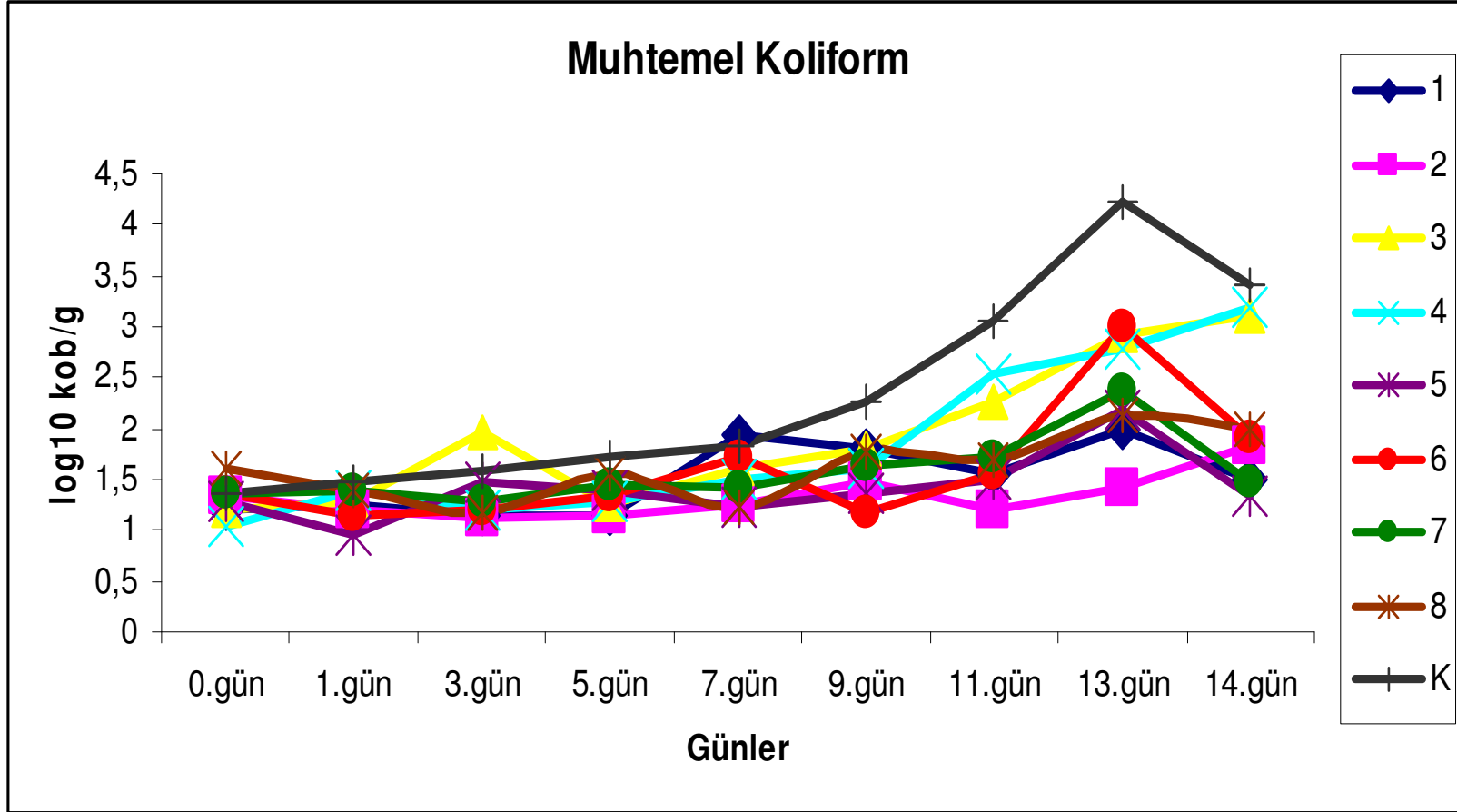
Grafik 3: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Fekal Koliform Grubu Bakteri Sayıları (log10 kob/g).

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 21: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Fekal Koliform Grubu Bakteri Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	<0,10±0,00	0,38±0,38	0,30±0,30	<0,10±0,00	0,53±0,53	<0,10±0,00	0,20±0,20	<0,10±0,00	<0,10±0,00
2	0,26±0,26	0,46±0,46	0,55±0,55	<0,10±0,00	0,65±0,65	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00
3	<0,10±0,00	0,45±0,45	<0,10±0,00	<0,10±0,00	0,67±0,67	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00	0,52±0,52
4	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00	0,42±0,42	0,66±0,66	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00	0,66±0,66
5	<0,10±0,00	0,26±0,26	0,63±0,63	<0,10±0,00	0,30±0,30	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00
6	<0,10±0,00	<0,10±0,00	0,36±0,36	<0,10±0,00	0,43±0,43	<0,10±0,00	0,36±0,36	<0,10±0,00	<0,10±0,00
7	<0,10±0,00	0,53±0,53	0,49±0,49	<0,10±0,00	0,61±0,61	<0,10±0,00	<0,10±0,00	<0,10±0,00	0,30±0,30
8	<0,10±0,00	0,76±0,76	0,42±0,42	<0,10±0,00	0,59±0,59	<0,10±0,00	0,20±0,20	<0,10±0,00	<0,10±0,00
K	<0,10±0,00	0,62±0,62	<0,10±0,00	0,43±0,43	0,65±0,65	<0,10±0,00	0,58±0,58	0,23±0,23	0,61±0,61

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.



Grafik 4: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Koliform Grubu Bakteri Sayıları (log10 kob/g).

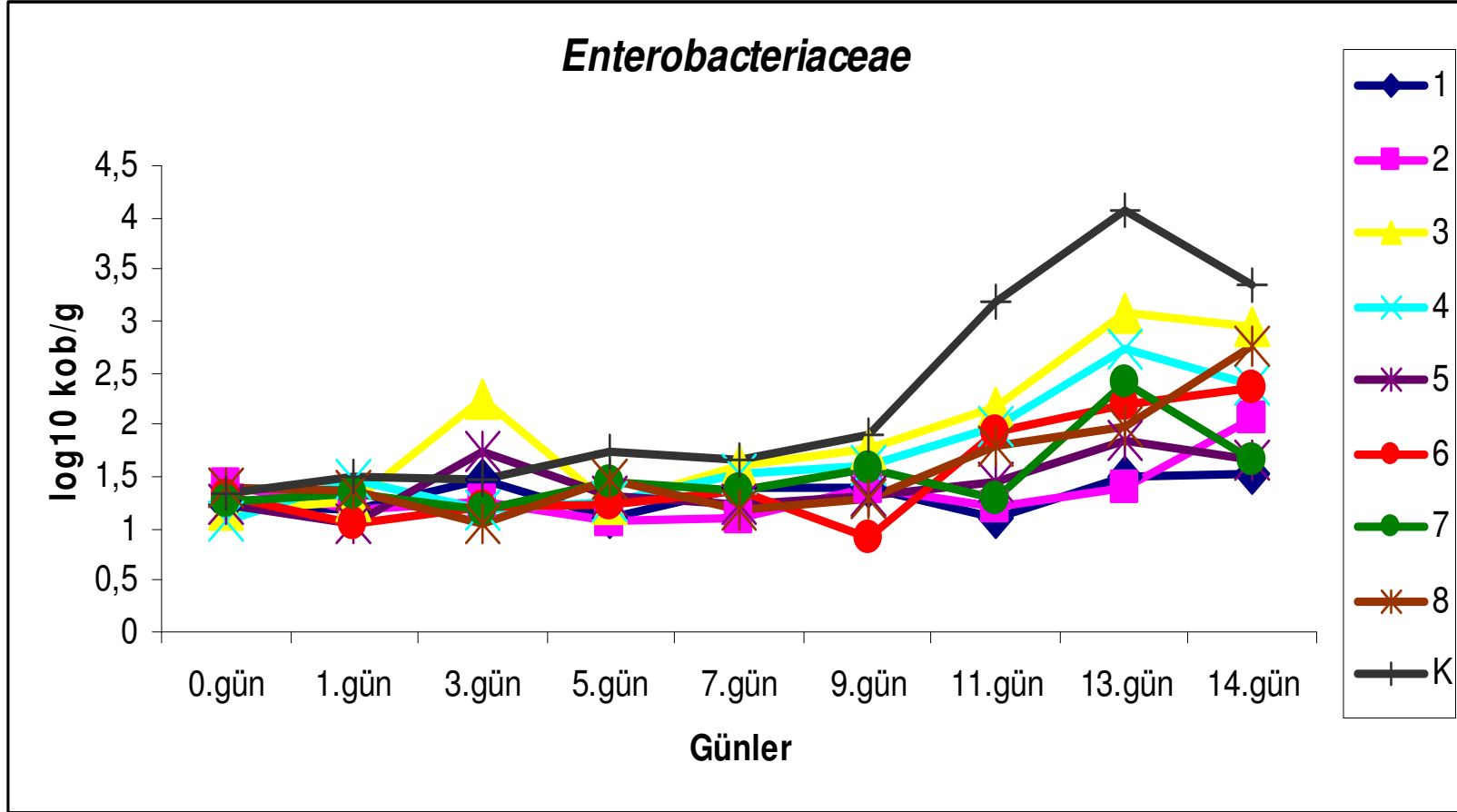
1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 22: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel Koliform Grubu Bakteri Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	1,20±0,72	1,25±0,78	1,15±0,68	1,15±0,68	1,93±0,85	1,81±1,33	1,55±1,07	2,00±1,01	1,49±1,01
2	1,34±0,87	1,19±0,71	1,13±0,66	1,15±0,68	1,26±0,78	1,47±0,99	1,19±0,71	1,42±0,94	1,82±0,85
3	1,20±0,72	1,27±0,79	1,96±0,88	1,25±0,78	1,61±0,88	1,80±1,32	2,27±1,80	2,91±1,70	3,12±1,81
4	1,04±0,57	1,39±0,55	1,21±0,74	1,29±0,81	1,51±1,03	1,61±1,13	2,54±0,63	2,79±0,61	3,20±1,42
5	1,28±0,80	0,95±0,48	1,46±0,98	1,38±0,90	1,23±0,75	1,37±0,89	1,50±1,02	2,18±1,18	1,34±0,87
6	1,36±0,88	1,15±0,68	1,19±0,71	1,34±0,87	1,72±0,75	1,16±0,69	1,55±1,07	3,00±0,28	1,92±0,79
7	1,37±0,89	1,40±0,93	1,27±0,79	1,45±0,97	1,43±0,96	1,63±1,15	1,72±0,75	2,38±1,01	1,47±0,99
8	1,62±0,77	1,39±0,91	1,17±0,69	1,55±1,07	1,24±0,77	1,76±0,65	1,68±0,71	2,13±0,83	2,00±0,77
K	1,37±0,89	1,46±0,99	1,57±1,09	1,71±0,98	1,83±1,10	2,26±1,26	3,05±0,60	4,24±0,62	3,41±1,48

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Çalışmanın *Enterobacteriaceae* sayılarını ortaya koyan sonuçlarına göre 0. günde 4. grup 1,06 log₁₀ kob/g ve 3. grubun 1,19 log₁₀ kob/g ile en düşük üreme sayısına sahip oldukları görülmüştür. 1. günde ise 1,05 log₁₀ kob/g'a sahip 5. ve 6. gruplar 1,17 log₁₀ kob/g'a sahip 1. grup ve 1,19 log₁₀ kob/g'a sahip 2. grup tarafından takip edilmiştir. Analizin 3. gününde ise 7. ve 8 gruplar en fazla indirgemeyi yapan gruplar olarak görülmektedir. Deneme gruplarından yüksek karanfil yağı içeren 2. grup, düşük karanfil yağı içeren 1. gruba göre genel olarak 0. ve 14. günler dışında daha yüksek bir indirgeme düzeyine sahiptir. Yine yüksek nisin içeren 4. grup da düşük nisin içeren 3. gruba göre 1. ve 5. günler dışında daha yüksek bir indirgeme düzeyine sahip olarak görülmüştür. Kombinasyon gruplarından 5. grubun diğer kombinasyon gruplarına göre kısmen daha fazla indirgeme yaptığı söylenebilmektedir. Kontrol grubunun ise 0. gün hariç diğer analiz günlerinde bütün deneme gruplarından daha yüksek üreme sayılarına sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, bu indirgeme düzeyleri ile, deneme grupları çalışmanın analiz günlerindeki değerlendirme sonuçlarına göre kontrolle aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratamamışlardır ($p > 0,05$). Muhtemel *Enterobacteriaceae* sayılarını içeren veriler Tablo 23 ve Grafik 5'de çıkarılmıştır.



Grafik 5: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel *Enterobacteriaceae* Sayıları (log10 kob/g).

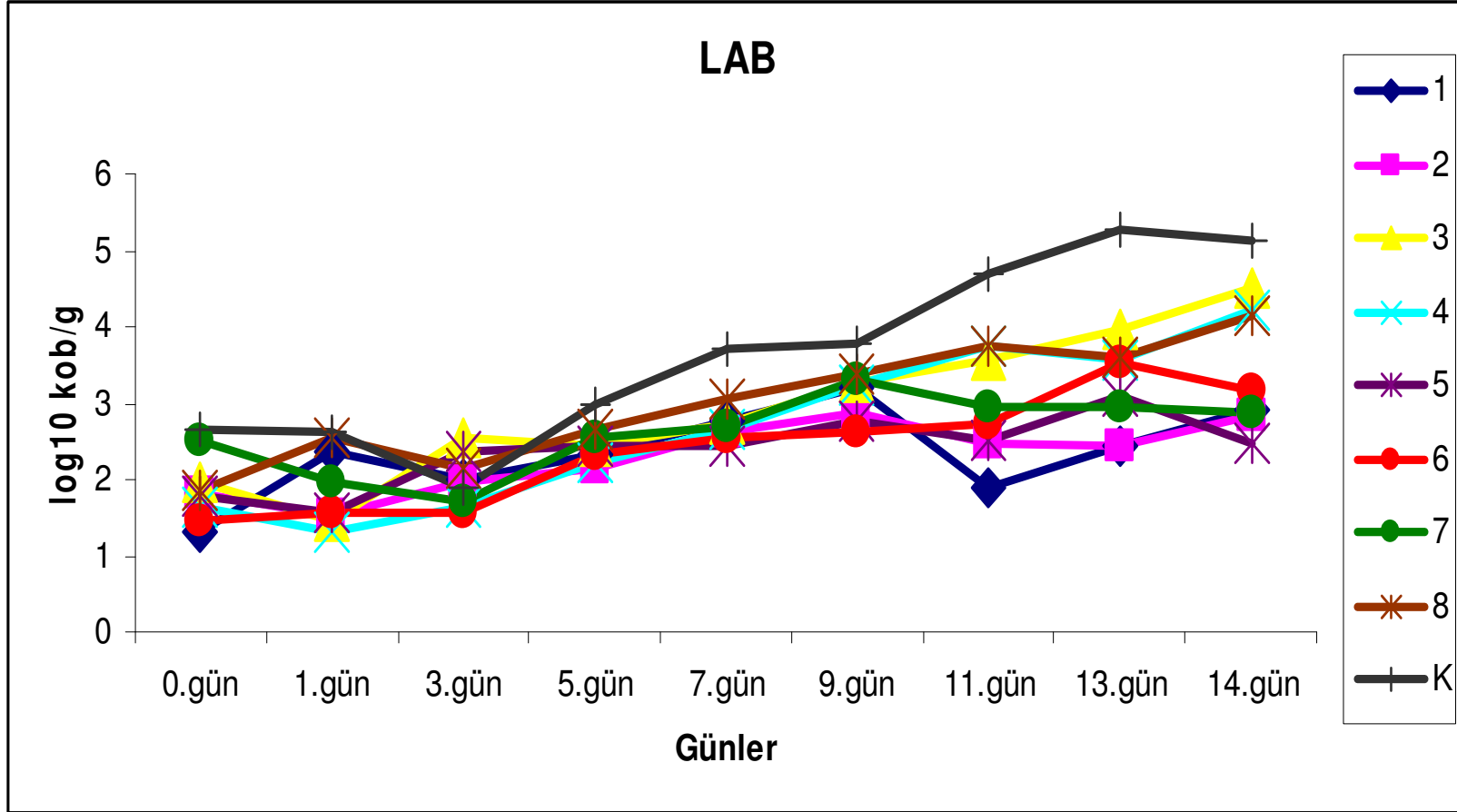
1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 23: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Muhtemel *Enterobacteriaceae* Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	1,22±0,74	1,17±0,69	1,47±0,99	1,09±0,61	1,40±0,93	1,38±0,90	1,09±0,61	1,49±1,01	1,52±1,04
2	1,41±0,93	1,19±0,71	1,27±0,79	1,07±0,59	1,09±0,61	1,40±0,93	1,21±0,74	1,40±0,93	2,05±0,90
3	1,19±0,71	1,25±0,78	2,25±0,95	1,22±0,75	1,61±0,88	1,77±1,29	2,17±1,69	3,08±1,62	2,94±1,53
4	1,06±0,58	1,47±0,63	1,19±0,71	1,25±0,77	1,52±1,04	1,62±1,14	1,99±0,90	2,72±0,33	2,38±1,15
5	1,22±0,74	1,05±0,58	1,73±0,88	1,31±0,84	1,24±0,77	1,32±0,84	1,45±0,97	1,86±1,38	1,65±1,17
6	1,32±0,84	1,05±0,58	1,21±0,74	1,24±0,76	1,37±0,89	0,91±0,43	1,93±0,84	2,20±0,88	2,35±1,00
7	1,26±0,78	1,34±0,87	1,17±0,69	1,44±0,96	1,36±0,64	1,59±1,11	1,29±0,81	2,41±1,06	1,65±1,17
8	1,38±0,90	1,37±0,89	1,05±0,58	1,48±1,00	1,19±0,71	1,29±0,81	1,79±0,73	1,98±0,75	2,76±0,68
K	1,34±0,87	1,50±1,03	1,47±0,99	1,75±0,90	1,65±1,17	1,89±0,91	3,19±0,43	4,06±0,74	3,35±1,57

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Deneme gruplarının kırmızı etteki laktik asit bakterilerinin mikrobiyal yükü üzerindeki etkilerine ait bulgular değerlendirildiğinde 0. günde en düşük başlangıç değerinin 1,30 log₁₀ kob/g ile 1. gruba ait olduğu görülmektedir. 1. gün sonuçlarında 3. ve 4. gruplar, 1,44 log₁₀ kob/g ve 1,31 log₁₀ kob/g ile en fazla indirgeme yapan gruplar olarak ortaya çıkmaktadırlar. Yine 4. grup 11. gün dışında 3. gruba göre daha fazla indirgeme sağlamıştır. Tek başına karanfil yağı içeren gruplarda da 2. grubun 0. ve 11. gün dışındaki analiz günlerinde 1. gruba göre daha fazla indirgeme sağladığı görülmüştür. Karanfil yağının her iki konsantrasyonu ile düşük nisin içeren kombine grupların (5. ve 7. gruplar) analizin son günlerinde yüksek nisin içeren kombinasyon gruplarına göre daha fazla indirgeme oranına sahip oldukları görülmüştür. Genel olarak karanfil yağı grupları kontrole göre 7. ve 9. günde 1 logaritma, 11. ve 13. günde 2,5 logaritma 14. günde de 2 logaritma indirgeme sağlamışlardır. 9. günden itibaren nisin grupları ile her iki maddenin de yüksek oranlarının kullanıldığı 8. grup, kontrole yakın değerlerle en az indirgeme seviyesine sahip olmuşlardır. Bununla birlikte, özellikle son 3 analiz gününde indirgeme düzeylerine göre bütün deneme grupları ile arasında en az 1 logaritmalık fark olan kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p > 0,05). Tablo 24 ve Grafik 6'da laktik asit bakterisi sayılarına ait veriler gösterilmiştir.



Grafik 6: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Laktik Asit Bakterisi (LAB) Sayıları (log10 kob/g).

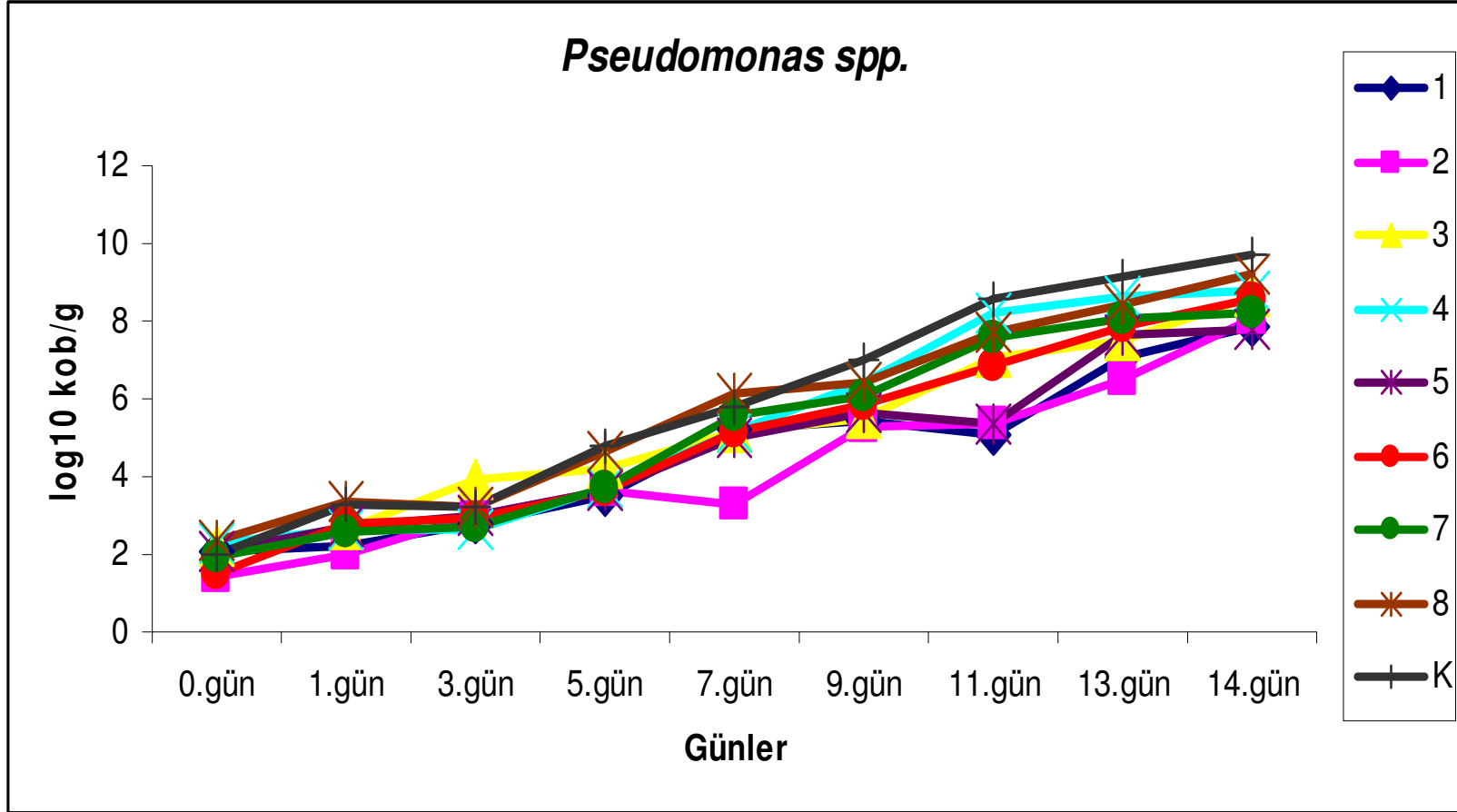
1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 24: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Laktik Asit Bakterisi (LAB) Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	1,30±0,83	2,37±0,97	1,99±0,82	2,33±0,96	2,75±1,23	3,21±0,97	1,89±0,71	2,44±1,00	2,92±1,23
2	1,83±0,86	1,53±1,06	1,97±0,92	2,13±0,91	2,62±1,25	2,87±0,55	2,49±1,14	2,43±0,99	2,83±1,18
3	1,97±0,83	1,44±0,96	2,53±1,10	2,44±0,99	2,73±1,21	3,26±0,87	3,55±0,76	3,98±0,66	4,50±0,71
4	1,62±0,77	1,31±0,84	1,65±1,17	2,21±0,92	2,65±1,18	3,24±0,66	3,73±0,59	3,57±0,27	4,22±0,94
5	1,79±0,82	1,57±1,09	2,38±1,15	2,42±1,07	2,42±1,01	2,77±0,45	2,51±1,10	3,10±0,82	2,46±1,04
6	1,46±0,98	1,55±0,83	1,56±1,08	2,32±1,00	2,54±1,10	2,62±1,11	2,73±0,61	3,53±0,85	3,16±1,37
7	2,52±0,53	1,97±1,11	1,70±1,22	2,55±1,25	2,70±1,21	3,32±0,75	2,94±0,45	2,93±0,64	2,89±1,21
8	1,86±0,88	2,53±1,23	2,14±0,86	2,64±1,22	3,06±1,39	3,37±0,56	3,75±0,81	3,59±0,35	4,14±0,34
K	2,66±0,53	2,63±1,04	1,89±1,41	2,99±0,61	3,71±0,89	3,78±0,71	4,70±0,30	5,27±0,17	5,12±0,54

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Pseudomonas spp. sayılarında indirgenme düzeylerini belirlemek için yapılan çalışmada, istatistiksel olarak deneme grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$). Bununla birlikte, karanfil yağının yüksek konsantrasyonunu içeren 2. grup kontrole göre analizin 0. gününde 0,5 logaritmalık, 1. gününde de 1. logaritmalık bir fark yaratabilmiştir. Son 3 gün analiz sonuçlarına bakıldığında, 1. grubun da kontrole göre indirgemedede 2- 2,5 logaritma arasında bir fark yarattığı görülmüştür. Nisin içeren 3 ve 4. gruplar, analiz günleri sonuçlarında farklılıklar olsa da daha az indirgeme düzeyleri ile kontrole göre en fazla 1 logaritmalık indirgeme sağlayabilmişlerdir. Düşük konsantrasyonları içeren 5. grup, kontrole göre 5., 9., ve 13. günlerde 1,5 logaritma 7. günde yaklaşık 1 logaritma, 11. günde 3 logaritma ve 14. günde 2 logaritma değerinde indirgeme sağlamıştır. Analizin 0. gününde kontrolden daha yüksek bir üreme sayısına sahip olan 8. grup bütün analiz günlerinde kontrole en yakın değerleri vererek en az indirgeme düzeyine sahip kombinasyon grubu olmuştur. Karanfil yağının yüksek konsantrasyonunu içeren 2. grup 1. gruba göre daha etkili iken, % 7 karanfil yağının nisinle kombinasyonlarına ait deneme gruplarının (5. ve 6. grup) % 10 karanfil içeren kombinasyon gruplarına (7. ve 8. grup) göre daha iyi bir indirgeme düzeyine sahip oldukları görülmektedir. *Pseudomonas spp.* sayıları Tablo 25 ve Grafik 7'de verilmiştir.



Grafik 7: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki *Pseudomonas spp.* Sayıları (log10 kob/g).

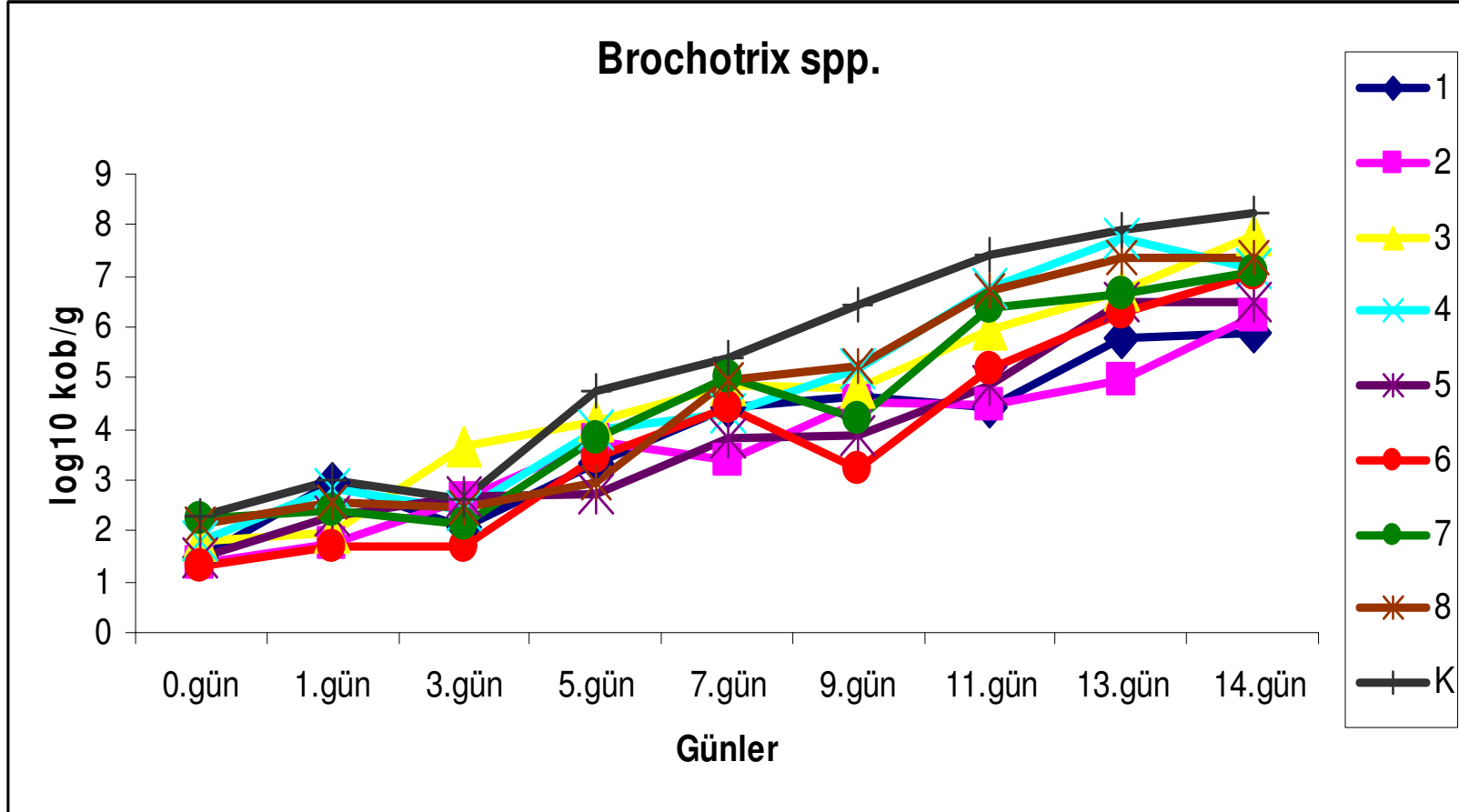
1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 25: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki *Pseudomonas spp.* Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	2,04±0,59	2,21±0,91	2,76±1,16	3,51±0,70	5,24±1,43	5,40±1,60	5,04±1,20	7,06±0,74	7,83±1,35
2	1,45±0,97	2,01±0,87	3,00±0,77	3,61±1,15	3,32±1,56	5,27±1,42	5,38±1,28	6,50±1,45	8,08±0,60
3	2,23±0,57	2,61±0,71	3,95±1,37	4,20±0,86	5,17±1,63	5,52±1,97	7,06±1,40	7,51±0,84	8,64±1,42
4	2,29±0,53	2,61±0,52	2,63±1,20	3,70±0,72	5,16±1,17	6,40±0,90	8,22±0,48	8,63±0,13	8,79±0,67
5	2,04±0,74	2,68±0,50	2,99±0,62	3,65±1,59	5,01±1,06	5,61±1,43	5,35±1,10	7,66±0,72	7,82±0,32
6	1,53±1,06	2,80±0,40	2,93±1,27	3,64±1,58	5,14±1,78	5,89±1,54	6,84±1,33	7,89±0,47	8,57±0,82
7	1,94±0,89	2,55±1,12	2,69±1,18	3,68±1,04	5,60±1,32	6,06±1,04	7,54±0,30	8,08±0,19	8,21±0,80
8	2,34±0,66	3,37±0,81	3,24±0,33	4,63±1,21	6,12±0,78	6,42±0,41	7,73±0,45	8,43±0,30	9,24±0,57
K	2,03±0,88	3,27±0,78	3,25±0,94	4,79±1,16	5,76±0,79	6,99±0,96	8,54±0,55	9,12±0,16	9,68±0,79

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Brochotrix spp.'nin değerlendirildiği çalışmada 2. grup ve 6. grup 0. günde 1,34 log₁₀ kob/g ve 1,31 log₁₀ kob/g düzeyi ile, 1. günde 1,72 log₁₀ kob/g ve 1,69 log₁₀ kob/g düzeyi ile en düşük üreme sayılarına sahip gruplar olmuşlardır. Analizin 3. gününde 1,67 log₁₀ kob/g ile 6. grup, 2,10 log₁₀ kob/g ile 1. grup ve 2,13 log₁₀ kob/g ile 7. grup en fazla indirgeme gösteren gruplar olarak görülmüştür. Analizin 5. gününde ise 5. grup ve 8. grup, kontrole göre 2 logaritmalık bir indirgeme ile en fazla indirgemenin olduğu gruplar olmuşlardır. Ancak, 8. grup analizin sonraki günlerinde bu indirgeme düzeyini gösterememiş ve kontrole yakın değerlerde kalmıştır. 5. grup ise karanfil yağı gruplarının ardından diğer kombinasyon gruplarına göre nispeten daha başarılı bir indirgeme düzeyine sahip olmuştur. İlk analiz gününde başarılı bir indirgeme gösteren nisin grupları daha sonraki günlerde aynı başarılı koruyamamış ve 8. gruba benzer kontrole yakın sonuçlar vermişlerdir. Karanfil yağı grupları ise analiz günlerine göre farklılıklar gösterseler de en fazla indirgeme yapan gruplar olmuşlardır. Nitekim 2. grup, 13. günde, 4. grup ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir indirgeme düzeyine ulaşmıştır ($p < 0,05$). Bununla birlikte, diğer analiz günlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p > 0,05$). Tablo 26 ve Grafik 8'de *Brochotrix spp.*'ye ait sonuçlar verilmiştir.



Grafik 8: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki *Brochotrix spp.* Sayıları (log₁₀ kob/g).

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

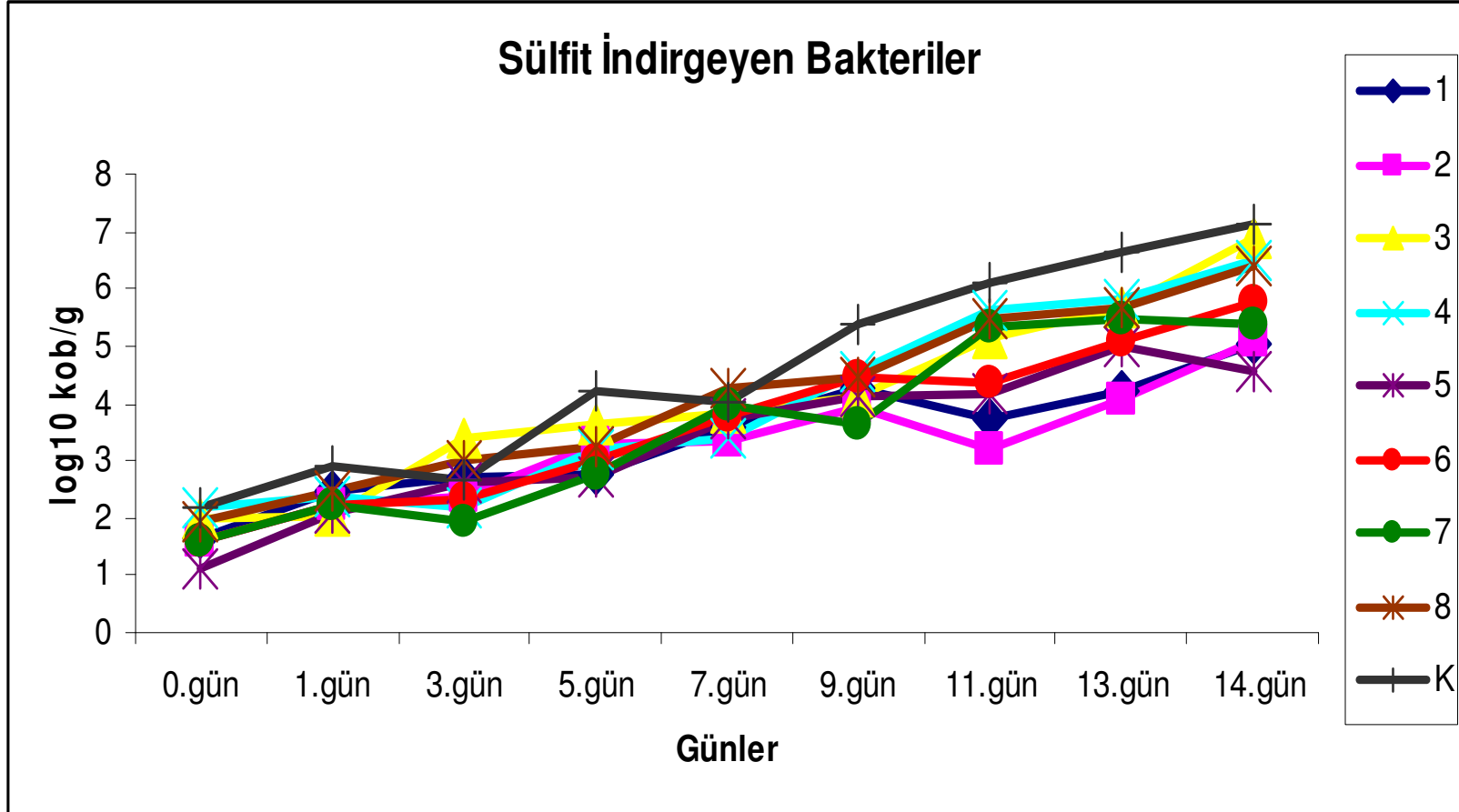
Tablo 26: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki *Brochotrix spp.* Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	1,45±0,61	2,92±0,52	2,10±0,56	3,34±0,51	4,40±1,36	4,62±1,25	4,40±0,80	5,79±0,67 ^{ab}	5,91±1,16
2	1,34±0,87	1,72±0,75	2,60±0,49	3,74±0,40	3,36±0,83	4,52±0,66	4,49±0,78	4,94±0,93 ^a	6,24±0,29
3	1,82±0,38	1,94±0,81	3,67±0,88	4,12±1,01	4,86±0,95	4,81±1,28	5,96±1,02	6,70±0,36 ^{ab}	7,79±0,36
4	1,78±0,45	2,83±0,33	2,38±1,17	4,00±0,20	4,33±0,89	5,20±0,70	6,77±0,22	7,75±0,51 ^b	7,15±0,79
5	1,48±0,76	2,29±0,60	2,67±1,11	2,75±1,15	3,81±0,28	3,88±0,66	4,86±1,52	6,49±0,32 ^{ab}	6,47±0,42
6	1,31±0,83	1,69±0,67	1,67±0,75	3,45±0,84	4,43±0,91	3,21±1,37	5,19±1,37	6,25±0,65 ^{ab}	7,05±0,67
7	2,25±0,50	2,41±0,66	2,13±1,10	3,82±0,59	5,03±0,62	4,22±1,33	6,40±0,16	6,67±0,39 ^{ab}	7,09±0,03
8	2,13±0,44	2,57±0,59	2,45±0,21	2,97±1,27	4,95±0,42	5,22±0,47	6,73±0,31	7,35±0,33 ^{ab}	7,35±0,32
K	2,30±0,58	2,98±0,75	2,60±1,10	4,72±0,52	5,41±0,52	6,46±0,34	7,40±0,21	7,91±0,15 ^b	8,24±0,25

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

^aAynı sütunda farklı üssel ifadeye sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P < 0,05).

Deneme gruplarının Sülfite indirgeyen bakteri sayılarına ait indirgenme düzeyleri değerlendirildiğinde 0. günde en fazla indirgemeyi 5. grubun (1,13 log₁₀ kob/g) yaptığı görülmektedir. Analizin 1. gününde ise yine 5. grup (2,09 log₁₀ kob/g), 3. grup (2,03 log₁₀ kob/g), 2. ve 7. gruplar (2,21 log₁₀ kob/g) daha düşük üreme seviyesine sahip olarak ortaya çıkmışlardır. 3. gün verilerinde kontrol grubundan daha fazla üreme sayısı ile 3. grup en yüksek değere sahip olmuştur. Deneme gruplarından 1., 5. ve 7. grup, 5. günde kontrol ile aralarında yaklaşık 1,5 logaritmalık fark yaratan gruplar olmuşlardır. 7. günden itibaren sonraki analiz günlerinde 2. grup kontrolle arasında 1,5 ile 2,5 logaritma arasında fark yaratmıştır. Aynı indirgeme düzeyi 2. gruba göre biraz daha az olmakla birlikte 1. grupta da görülmektedir. Nisin içeren gruplarda kontrole göre 0,5 ile 1 logaritma arasında bir indirgeme farkı görülmektedir. Kombinasyon gruplarında da genel olarak en iyi indirgeme seviyesine sahip olarak 5. grup, en az indirgeme düzeyine sahip olarak da 8. grup görülmektedir. Ancak, bütün deneme grupları analiz günlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratamamışlardır (p > 0,05). Sülfite indirgeyen bakteri grubu sayılarına ait veriler Tablo 27 ve Grafik 9'da verilmiştir.



Grafik 9: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Sülfite İndirgeyen Bakteri Sayıları (log10 kob/g).

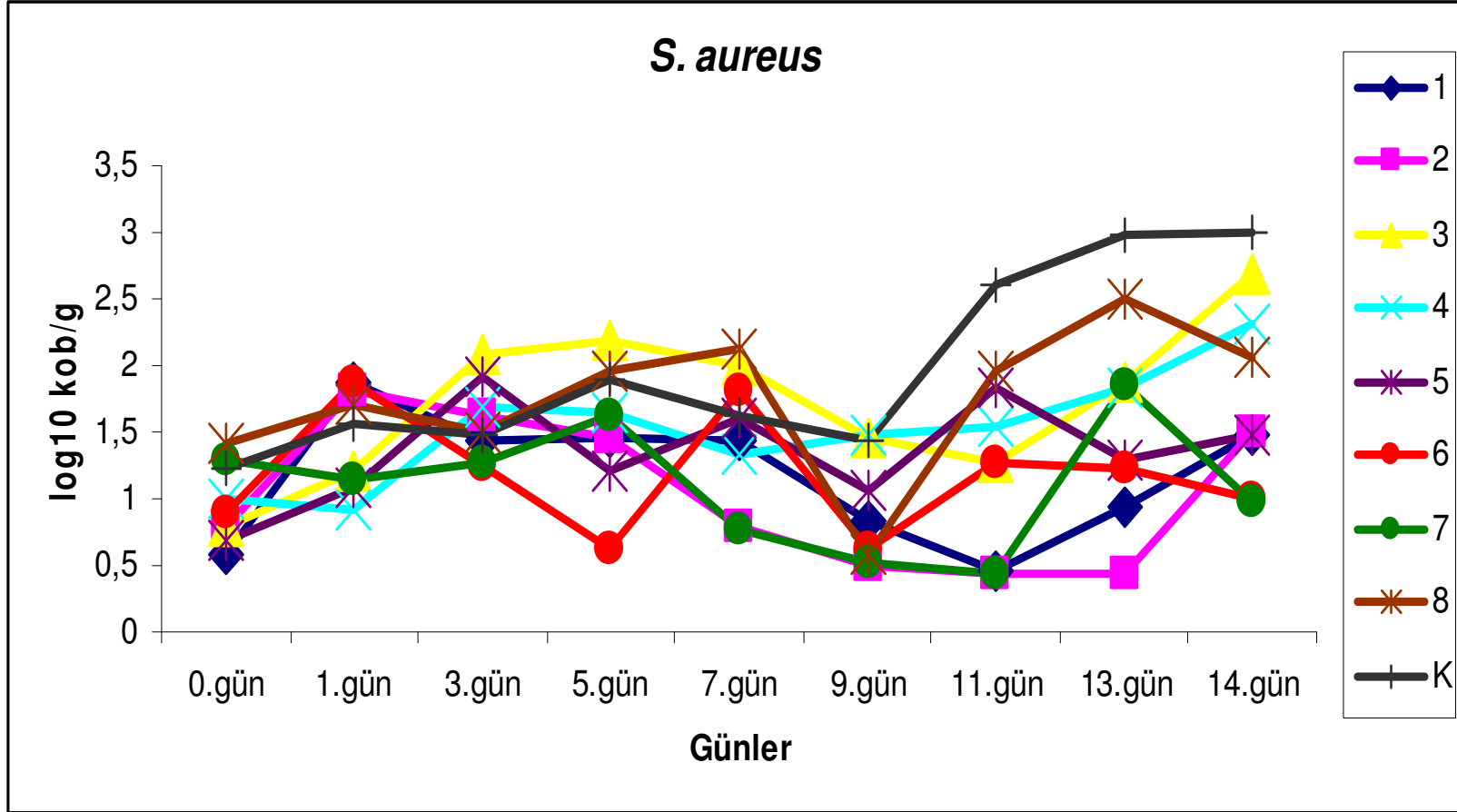
1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 27: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki Sülfite İndirgeyen Bakteri Sayıları (log₁₀ kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	1,63±0,78	2,49±0,77	2,71±0,56	2,78±0,74	3,60±1,67	4,28±1,46	3,71±1,63	4,23±1,65	5,02±2,15
2	1,59±0,74	2,21±1,10	2,37±0,71	3,30±0,79	3,36±0,90	3,91±1,81	3,18±1,42	4,07±1,66	5,09±1,09
3	1,97±0,45	2,03±0,81	3,37±1,03	3,62±1,05	3,84±1,22	4,12±1,85	5,15±1,49	5,67±1,14	6,89±1,61
4	2,19±0,35	2,36±0,41	2,18±0,98	3,21±0,73	3,41±1,47	4,57±0,43	5,64±0,88	5,81±1,10	6,51±0,81
5	1,13±0,66	2,09±0,90	2,60±1,17	2,72±1,14	3,73±0,97	4,14±1,30	4,17±1,63	5,00±1,60	4,56±1,42
6	1,58±0,59	2,25±0,51	2,32±0,95	2,99±1,27	3,76±1,86	4,46±1,57	4,35±2,26	5,09±1,57	5,79±1,66
7	1,59±0,64	2,21±0,51	1,95±0,97	2,74±0,72	3,98±1,21	3,66±1,60	5,33±1,22	5,47±1,16	5,38±1,60
8	1,95±0,50	2,45±0,71	2,99±0,31	3,24±1,44	4,28±1,60	4,48±1,45	5,46±1,49	5,65±1,20	6,40±1,56
K	2,18±0,88	2,93±0,92	2,69±1,00	4,20±1,05	4,03±1,86	5,37±0,99	6,09±1,03	6,62±1,07	7,12±1,49

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

S. aureus sayılarına ait bulgularda 0,59 log₁₀ kob/g ve 0,69 log₁₀ kob/g başlangıç değerleri ile sırasıyla 1. ve 5. gruplar en düşük değerleri göstermişlerdir. 1. gün sonuçlarında ise 0,9 log₁₀ kob/g ile 4. grup ve 1,09 log₁₀ kob/g ile 5. grup en düşük üreme seviyesine sahip olmuşlardır. % 7 Karanfil yağı ile 6.000 IU nisinin kombine edildiği grup (6. grup) ile % 10 karanfil yağı 3.000 IU nisinin kombine edildiği grup (7. grup) 3. analiz gününde en düşük seviyede kalmışlardır. 6. grup yine 5. günde kontrole 1 logaritmalık bir fark yaratmıştır. Analizin 7., 9. ve 11. günlerinde 2. ve 7. grup yaklaşık aynı üreme sayılarını gösterebilirler. 13. günde 2. grup, 14. günde ise 7. grup daha düşük seviyede kalmışlardır. Analizin ilk günlerinde 1., 2. ve 7. grup nispeten yüksek üreme sayılarına sahip olsalar da özellikle 9., 11. ve 13. günlerde kontrole göre 1- 2 logaritma arasında daha yüksek indirgeme düzeyleri ile *S. aureus* sayılarında bir azalma sağlayabilmişlerdir. 5. grup ise 13. ve 14. günlerde kontrol ile arasında 1,5 logaritmalık bir fark yaratabilmiştir. Başlangıçtan beri kontrolden yüksek değerlere sahip olan 8. grup, 9. günde kontrolden daha düşük seviyeye ulaşabilmiştir. Nisin grupları başlangıçtaki düşük üreme seviyesini koruyamamışlar ve sonraki günlerde belirgin bir fark yaratamamışlardır. Mikroorganizma yükünde azalma sağlamalarına rağmen, deneme gruplarının kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratamadıkları görülmüştür (p > 0,05). *S. aureus* sayılarına ait veriler Tablo 28 ve Grafik 10'da gösterilmiştir.



Grafik 10: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki *S. aureus* Sayıları (log10 kob/g).

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 28: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki *S. aureus* Sayıları (log10 kob/g± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	0,59±0,30	1,87±0,16	1,43±0,73	1,46±0,74	1,44±0,79	0,84±0,84	0,46±0,46	0,94±0,48	1,48±0,82
2	0,79±0,52	1,81±0,12	1,63±0,82	1,45±0,72	0,79±0,79	0,51±0,51	0,43±0,43	0,43±0,43	1,49±0,83
3	0,79±0,52	1,20±0,63	2,08±0,19	2,18±0,30	2,01±0,41	1,45±0,74	1,27±0,66	1,88±0,97	2,68±0,40
4	0,99±0,72	0,92±0,92	1,68±0,84	1,64±0,84	1,34±0,71	1,47±0,74	1,55±0,78	1,84±1,00	2,31±1,16
5	0,69±0,38	1,09±0,58	1,92±0,96	1,20±0,61	1,60±0,00	1,07±0,53	1,84±0,23	1,30±0,68	1,47±0,76
6	0,89±0,62	1,87±0,27	1,25±0,64	0,63±0,63	1,82±0,22	0,63±0,63	1,27±0,75	1,23±0,63	1,01±1,01
7	1,29±0,74	1,15±0,61	1,28±0,73	1,62±0,81	0,78±0,78	0,53±0,53	0,43±0,43	1,86±0,32	0,98±0,98
8	1,41±0,79	1,70±0,85	1,49±0,74	1,95±0,27	2,13±0,39	0,59±0,59	1,96±0,20	2,51±0,51	2,07±1,04
K	1,23±0,62	1,56±0,78	1,47±0,77	1,89±0,95	1,63±0,83	1,43±0,78	2,60±0,35	2,97±0,33	3,00±0,60

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

3.5. Kimyasal Analizlere Ait Bulgular

3.5.1. pH Değeri

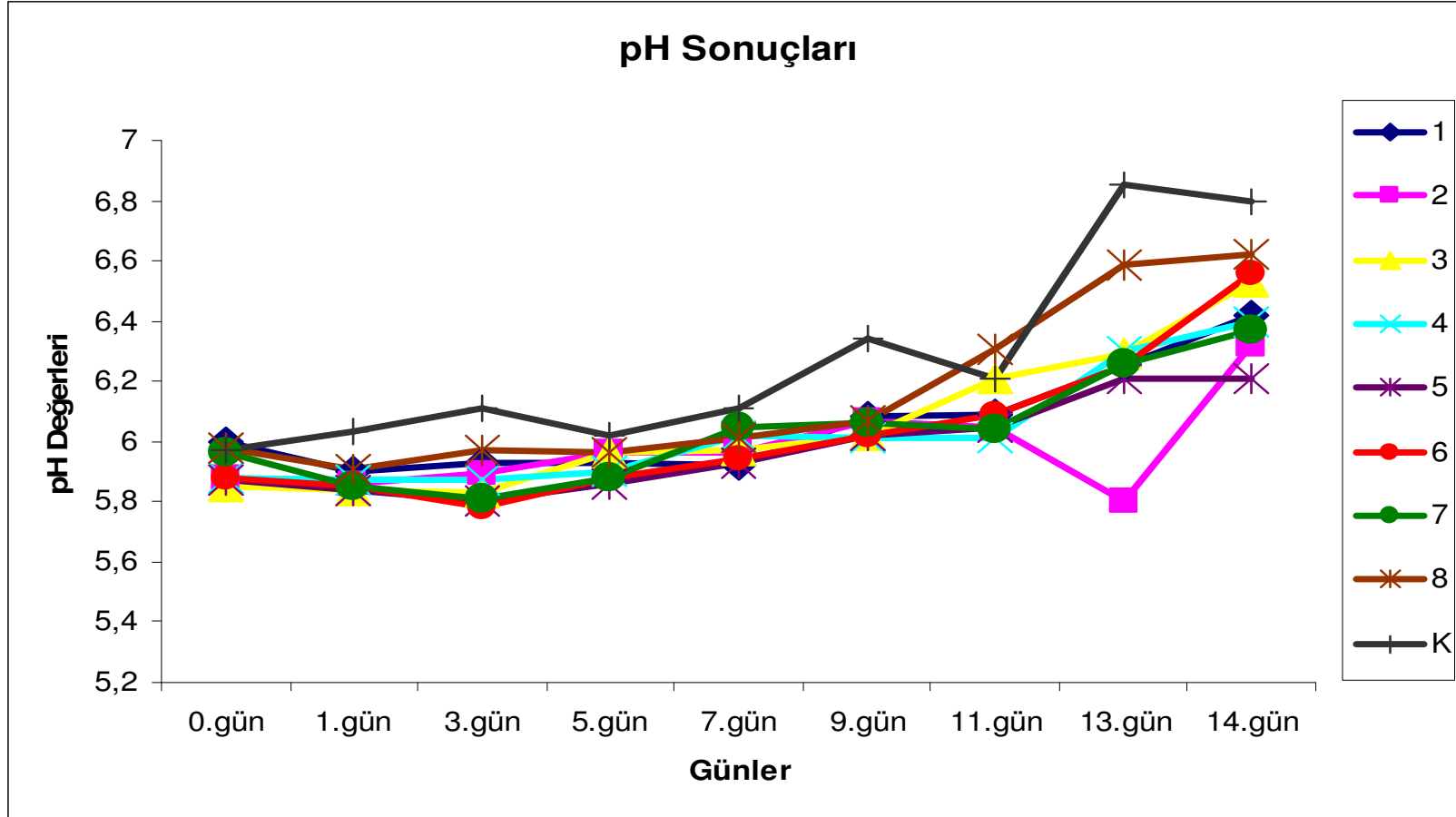
Öncelikle, çalışmada kullanılan deneme gruplarına ait kuru petlere emdirilen püskürtme sıvıları ve bunların kombinasyonlarının pH'ları ölçülmüştür. Bu gruplara ait pH sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. Kuru pedlere emdirilmek üzere hazırlanan karanfil yağı içeren püskürtme sıvısının pH'sı nisinle hazırlanan püskürtme sıvılarına ait pH değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Karanfil + nisin kombinasyonlarının kullanıldığı deneme grupları için hazırlanan konsantrasyonlara ait sıvılar değerlendirildiğinde, nisin yüksek oranlarda kullanıldığı sıvılarda, düşük nisin oranıyla hazırlanan sıvılara göre pH'nın daha düşük değerde olduğu görülmüştür.

Tablo 29: Deneme Gruplarında Kuru Pedlere Emdirilen Solüsyonların pH Değerleri.

Denemelerde Kullanılan solüsyonlar	pH değerleri
(1- 2) Karanfil Yağı	3,00
(3) 3.000 IU Nisin solusyonu	2,62
(4) 6.000 IU Nisin solusyonu	2,50
(5) % 7 Karanfil Yağı + 3.000 IU Nisin	2,88
(6) % 7 Karanfil Yağı + 6.000 IU Nisin	2,72
(7) % 10 Karanfil Yağı + 3.000 IU Nisin	2,81
(8) % 10 Karanfil Yağı + 6.000 IU Nisin	2,64

Deneme gruplarının her analiz gününde ölçülen pH sonuçlarına göre örneklerin 0. gün pH değerlerinin, kontrol grubu dışında, 1. gün ve 3. gün pH değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, karanfil yağı içeren deneme gruplarına ait pH değerleri yüksek konsantrasyonlarda (2. grup) düşük konsantrasyonlara (1. grup) göre daha düşük değerlere sahip olmuşlardır. Bununla birlikte nisin içeren deneme gruplarında 6.000

IU nisin içeren grup 3.000 IU nisin içeren gruptan genel olarak daha yüksek bir pH değerine sahip olarak görülmektedir. Karanfil yağı ve nisinin düşük oranlarını içeren deneme grubu (5. grup) diğer kombinasyon gruplarından daha düşük pH sonucuna ulaşmışken bu maddelerin yüksek oranlarını içeren deneme grubu (8. grup), kontrol grubuna yakın bir pH değeri ile diğer deneme gruplarından ayrılmıştır. Genel olarak % 7 karanfil içeren nisinle kombine deneme gruplarının pH düzeyi % 10 karanfil içeren nisin kombinasyon gruplarından daha düşük değerlerde kalmışlardır. Yine bu kombinasyon gruplarının kendi aralarında 5. grubun 6. gruptan ve 7. grubun 8. gruptan daha düşük bir pH seviyesine sahip olduğu görülmektedir. 5. grubun tek başına karanfil içeren gruplardan da (2. grupta 13. gün hariç) daha düşük pH değerlerinde kaldığı görülmektedir. Muhafaza periyodu boyunca her analiz gününde birbirinden bağımsız örneklerden ölçülen sonuçlara göre kontrol grubu ile deneme grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Deneme gruplarının pH düzeylerine ait veriler Tablo 30 ve Grafik 11’de verilmiştir.



Grafik 11: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki pH Değerleri.

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 30: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki pH Düzeylerine Ait Karşılaştırma Tablosu (\pm standart hata), ($n= 3$).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	6,00 \pm 0,23	5,90 \pm 0,06	5,93 \pm 0,16	5,93 \pm 0,08	5,92 \pm 0,06	6,08 \pm 0,12	6,09 \pm 0,13	6,25 \pm 0,29	6,42 \pm 0,38
2	5,88 \pm 0,13	5,86 \pm 0,07	5,89 \pm 0,14	5,96 \pm 0,12	5,96 \pm 0,12	6,07 \pm 0,14	6,05 \pm 0,16	5,80 \pm 0,14	6,32 \pm 0,32
3	5,85 \pm 0,10	5,84 \pm 0,09	5,83 \pm 0,10	5,96 \pm 0,03	5,97 \pm 0,09	6,02 \pm 0,15	6,21 \pm 0,34	6,29 \pm 0,32	6,53 \pm 0,41
4	5,88 \pm 0,11	5,87 \pm 0,10	5,87 \pm 0,14	5,90 \pm 0,10	6,02 \pm 0,15	6,01 \pm 0,18	6,01 \pm 0,11	6,30 \pm 0,26	6,40 \pm 0,45
5	5,87 \pm 0,10	5,84 \pm 0,10	5,80 \pm 0,12	5,86 \pm 0,06	5,93 \pm 0,12	6,02 \pm 0,14	6,05 \pm 0,17	6,21 \pm 0,27	6,21 \pm 0,39
6	5,88 \pm 0,06	5,85 \pm 0,09	5,78 \pm 0,15	5,88 \pm 0,08	5,94 \pm 0,13	6,02 \pm 0,09	6,09 \pm 0,10	6,25 \pm 0,20	6,56 \pm 0,39
7	5,96 \pm 0,01	5,85 \pm 0,09	5,81 \pm 0,16	5,88 \pm 0,08	6,05 \pm 0,16	6,06 \pm 0,23	6,04 \pm 0,17	6,26 \pm 0,26	6,37 \pm 0,33
8	5,98 \pm 0,03	5,91 \pm 0,06	5,97 \pm 0,03	5,96 \pm 0,08	6,01 \pm 0,09	6,07 \pm 0,05	6,31 \pm 0,11	6,59 \pm 0,14	6,62 \pm 0,28
K	5,97 \pm 0,05	6,03 \pm 0,05	6,11 \pm 0,18	6,02 \pm 0,04	6,11 \pm 0,05	6,34 \pm 0,25	6,21 \pm 0,22	6,85 \pm 0,23	6,80 \pm 0,39

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

3.5.2. Kokuşma Testi

Soğuk muhafaza sürecinde örneklerin her birinde kokuşma olup olmadığını belirlemek amacıyla Eber deneyi ile kokuşma testleri yapılmıştır. Kokuşma olan örneklerin '+', olmayan örneklerin '-' ile ifade edildiği analizin ilk üç günde hiçbir deneme grubunda kokuşma belirtisi tespit edilmemiştir. 5. günden itibaren kontrol, 6. ve 8. deneme grubunda, sadece 1 tekrar örneklerinde, kokuşma belirtileri başlamış ve devam eden analiz günlerinde diğer örneklerde de kokuşma belirtileri gözlenmiştir. % 7 karanfil yağı kullanılan 1. deneme grubu ve karanfil yağı + nisin kombinasyonunun düşük düzeylerini içeren 5. deneme grubu 9. günde negatif sonuç ile kokuşmanın en geç başladığı gruplar olmuşlardır. Çalışma 3 tekrar halinde yapılmış ve örneklerin ortalama kokuşma bulguları Tablo 31'de gösterilmiştir.

Tablo 31: Kokuşma Test Sonuçlarına Ait Bulgular ($n=3$). (Eber Yöntemi ile).

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1. Gün	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3. Gün	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5. Gün	+--	---	---	---	---	---	+--	---	+--
7. Gün	++-	---	---	---	+--	---	+--	+--	+--
9. Gün	++-	---	+--	+--	+--	---	+--	++-	++-
11. Gün	+++	+--	+--	++-	++-	+--	++-	++-	+++
13. Gün	+++	++-	++-	+++	+++	++-	+++	+++	+++
14. Gün	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: Kokuşma var, -: Kokuşma yok.

3.6. Duyusal Analiz Bulguları

Muhafaza süresi boyunca belirtilen analiz günlerinde örneklerin duyusal analizleri Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında görev yapan 5 akademik personel tarafından değerlendirilmiştir.

Denemelerde kullanılan karanfil yağı ve karanfil yağı ile nisin kombinasyon gruplarına ait örneklerde 1. günden itibaren kuru pedle temas eden et yüzeyinde et renginde açılma ve beyazlaşma şeklinde renk değişimi görülmüştür. Renk değişimi karanfil yağı konsantrasyonuna göre belirgin bir farklılık yaratmamıştır. Sadece nisin kullanılan deneme gruplarında başlangıçta bir renk değişimi görülmemekle birlikte karanfil yağı ve nisin kombine kullanıldığı deneme gruplarında da 1. analiz gününden itibaren temas eden yüzeyde renk açılması gözlenmiştir. Panelistler % 7 ve % 10 karanfil yağı içeren gruplarda ve nisinle kombine kullanılan gruplarda renkteki açılmanın aynı düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Muhafaza periyodunun sonraki günlerinde de et rengindeki açılma aynı kalmakla birlikte bozulmaya bağlı olarak son günlerde belirginleşmiştir. Renkte görülen bu değişime FTS kullanılan kontrol grubu ile sadece nisin kullanılan 3. ve 4. gruplarda rastlanmamıştır. Bu bulgular Tablo 32'de gösterilmiştir.

Tablo 32: Pedle Temas Eden Alt Yüzeyde Et Rengindeki Değişim Bulguları*.

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
3. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
5. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
7. Gün	0	1	2	1	0	1	1	1	1
9. Gün	0	2	2	1	1	2	2	2	2
11. Gün	0	2	2	1	1	1	2	2	2
13. Gün	1	2	2	1	1	2	2	2	2
14. Gün	1	2	2	1	1	2	2	2	2

*5: Et yüzeyinde renk açılması, beyazlama en çok, 0: Et yüzeyinde renk açılması, beyazlama en az.

Çalışmada kullanılan karanfil yağı, nisin ve bunların kombinasyonlarını içeren karışımlar sadece kuru pede püskürtüldükleri için bütün deneme gruplarında pedle temas etmeyen etin üst yüzeyinde renkte ve görünüşte herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak muhafaza periyodunun 5. gününden itibaren karanfil yağının her iki grubu (1. ve 2. Grup) ve 5. grup hariç diğer kombinasyon gruplarında (6., 7. ve 8. gruplar), nisin gruplarında (3. ve 4 grup) ve kontrol grubunda paketin üst yüzeyinde renk değişimleri başlamıştır. Daha sonraki günlerde yine aynı gruplarda daha belirgin olmak üzere bütün gruplarda etin bozulma belirtilerinin de başlamasıyla birlikte renklerde matlaşma, koyulaşma gözlenmiştir. Et örneklerinin üst yüzeyindeki değişimlere ait bulgular Tablo 33'de verilmiştir.

Tablo 33: Pedle Temas Etmeyen Üst Yüzeyde Et Rengindeki Değişim Bulguları*.

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5. Gün	1	0	0	1	1	0	1	1	1
7. Gün	2	1	1	1	2	1	1	2	1
9. Gün	2	1	1	2	2	1	1	1	1
11. Gün	3	1	1	3	3	1	2	2	2
13. Gün	4	3	3	4	3	3	3	3	3
14. Gün	5	3	3	4	4	3	4	3	5

*5: Etin üst yüzeyinde renk değişimi en çok, 0: Etin üst yüzeyinde renk değişimi en az.

Paketlenen et örneklerinde muhafaza periyodunun ilk 3 gününde deneme gruplarının hiçbirinde et bozulma belirtileri görülmemiştir. Ancak, 5. gün örneklerinden kontrol ve nisine ait gruplarda etin genel görünümünde değişimlerin başladığı gözlenmiştir. Sonraki günlerde yine kontrol ve nisin gruplarındaki bozulma daha belirgin olmakla birlikte bütün deneme gruplarında kokuşma, yapışkanlık, renkte koyulaşma ve yüzeyde kuruma gibi bozulma belirtileri tespit edilmiştir. 13. ve

14. gün örnekleri, gruplar arasında belirgin bir fark oluşturmayan, en fazla bozulma belirtileri ile görünüş açısından en kötü örnekler olmuşlardır. Genel et görünümündeki değişimlere ait bulgular Tablo 34’de verilmiştir.

Tablo 34: Etin Genel Görünümündeki Değişim Bulguları*

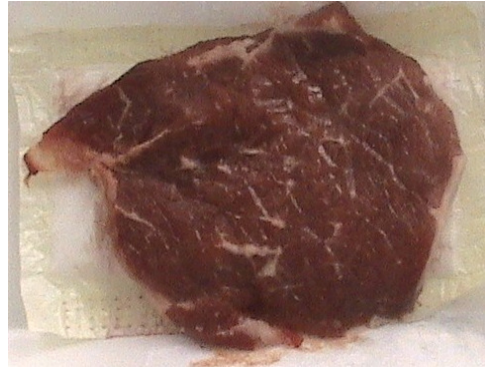
	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5. Gün	1	0	0	1	1	0	0	0	0
7. Gün	2	1	0	1	1	1	1	1	1
9. Gün	3	3	2	2	2	1	2	2	2
11. Gün	3	2	2	3	3	2	3	3	3
13. Gün	4	3	2	3	3	3	3	3	3
14. Gün	5	4	4	4	4	3	4	4	4

*5:Etin genel görünümünde bozulma en çok, 0: Etin genel görünümünde bozulma en az,

Çalışmanın 11. gününde örneklerin paket açılmadan önceki görünüşlerine ait resimler Resim 2’de verilmiştir.



G 1



G 2



G 3



G 4



G 5



G 6



G 7



G 8



K

Resim 2: Çalışmanın 11. Gününe Ait Gruplarının Paket Açılmadan Önceki Görünüşlerinden Örnekler.

(G 1; 1. grup, G 2; 2. grup, G 3; 3. grup, G 4; 4. grup, G 5; 5. grup, G 6; 6. grup, G 7; 7. grup, G 8; 8. grup, K; Kontrol grubu).

Muhafaza periyodunun ilk günlerinde rastlanmayan bozulma kokusu et örneklerindeki bozulma belirtileriyle paralel olarak sonraki günlerde algılanmıştır. Kontrol, nisin ve karanfil yağı ile nisin yüksek konsantrasyonlarını içeren deneme gruplarında bozulma kokusu diğer gruplara göre daha erken başlamış ve periyodun sonuna kadar artarak devam etmiştir. Tablo 35’de örneklerdeki bozulma kokularına ait bulgular verilmiştir.

Tablo 35: Bozulma Kokusuna Ait Bulgular*.

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1. Gün	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Gün	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5. Gün	1	0	0	1	1	0	1	0	1
7. Gün	2	1	0	1	2	0	1	1	1
9. Gün	3	1	1	3	3	1	2	2	2
11. Gün	3	1	1	4	3	2	2	2	2
13. Gün	5	2	3	5	4	3	3	3	3
14. Gün	5	3	5	5	5	4	5	5	5

*5: Bozulma kokusu en çok, 0: Bozulma kokusu en az.

Karanfil kuvvetli koku ve aroması olan bir baharat olarak bilinmektedir. Paketlerin ilk açıldığı anda keskin olmayan fakat hissedilebilir bir karanfil yağı kokusu alınmıştır. Karanfil kokusunun genel olarak hoş giden bir koku olmasından dolayı panelistler tarafından bu kokunun rahatsız edecek düzeyde olmadığı bildirilmiştir. Tek başına ve nisinle kombine olarak % 7 karanfil yağı içeren deneme grupları (1, 5 ve 6) ile tek başına ve nisinle kombine olarak % 10 karanfil yağı içeren deneme grupları (2, 7 ve 8) arasında karanfil kokusunun yoğunluğu açısından bariz bir fark belirlenmemiştir. Paketler açıldıktan 1 saat sonra da karanfil yağı içeren bütün deneme gruplarında koku değişimi açısından önemli bir fark gözlenmemiştir. Genel olarak örneklerin et yağındaki karanfil kokusunun, etin karanfil kokusundan daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Muhtemelen bu durum karanfilin et yağına daha fazla sinmesinden kaynaklanmaktadır. Tablo 36'da paket ilk açıldığında deneme gruplarının kokularına ait bulgular verilmiştir.

Tablo 36: Paket İlk Açıldığında Karanfil Yağının Tipik Kokusuna Ait Bulgular*.

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
1. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
3. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
5. Gün	0	2	2	0	0	2	2	2	2
7. Gün	0	1	1	0	0	2	2	2	2
9. Gün	0	3	2	0	0	2	3	2	2
11. Gün	0	2	2	0	0	3	3	3	3
13. Gün	0	3	2	0	0	3	3	3	3
14. Gün	0	4**	4**	0	0	4**	4**	4**	4**

*5: Karanfil yağına ait tipik koku en fazla, 0: Karanfil yağına ait tipik koku en az.

**Karanfil yağı ile birlikte acılaşmadan kaynaklanan kötü bozulma kokusu.

Panelistler tarafından genel olarak karanfil kokusu hoş ve aromatik bulunarak çok itici ve kabul edilemez olarak değerlendirilmemiştir. Bununla birlikte, karanfil içeren deneme grupları, uygulamanın ilk günü ve örneklerin aynı gün değerlendirildiği 0. gün deneme gruplarında da geçerli olmak üzere, kontrol ve nisin deneme gruplarına göre daha düşük bir kabul edilebilirlik puanı almışlardır. Çalışmanın son günlerindeki karanfil yağına ait kabul edilebilirlik düzeyi bozulmadan kaynaklanan kötü koku ve acılaşma kokusu ile birlikte oldukça düşmüştür. Karanfil yağı, çalışmadaki bütün gruplarda depolama periyodunun sonuna doğru acılaşma ve bozulmayla birlikte artan istenmeyen kötü kokuları baskılamamıştır. Karanfil yağına ait tipik kokunun kabul edilebilirlik düzeyine ait değerlendirmeler Tablo 37’de verilmiştir.

Tablo 37: Karanfil Yağına Ait Tipik Kokunun Kabul Edilebilirlik Düzeyi*.

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	1	1	0	0	1	1	1	1
1. Gün	0	2	2	0	0	2	2	2	2
3. Gün	0	2	2	0	0	2	2	2	2
5. Gün	0	2	2	0	0	2	2	2	2
7. Gün	0	2	2	0	0	2	2	2	2
9. Gün	0	2	3	0	0	2	3	2	2
11. Gün	0	2	2	0	0	3	3	3	3
13. Gün	0	2	2	0	0	3	3	3	3
14. Gün	0	4	4	0	0	4	4	4	4

* 5: Koku kabul edilemez, 0: Koku kabul edilebilir.

Deneme gruplarında kaynatma- kızartma deneylerinde % 7 karanfil yağı içeren deneme gruplarında (1, 5 ve 6) tencere kapağı açıldığında karanfil kokusu çiğ kırmızı ette hissedilen kokudan daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Tadıldığında, yutakta karanfil aroması ve kokusu belirginleşmiştir. % 10 karanfil yağı içeren deneme gruplarında (2, 7 ve 8) kaynatma- kızartma durumunda tencere kapağı açıldığında karanfil yağına ait kokunun daha keskin olduğu bildirilmiştir. Ağızdaki karanfil aromasının daha belirginleştiği ve kabul edilebilirliğinin düşük olduğu değerlendirilmiştir. Karanfile karşı hassas ve kokusunu tercih etmeyen tüketiciler tarafından kabul görmeyebileceği konusunda fikir bildirilmiştir.

Kontrol grubu ile 3.000 IU ve 6.000 IU nisin kullanılan deneme gruplarında kaynatma ve kızartma durumlarında etin tadını ve kokusunu değiştiren herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu gruplardaki et örneklerinin tadının hoş, rahatlıkla tüketilebildiği ve ağızda farklı aroma oluşturmadığı bildirilmiştir. Nisinin, etin tadını ve kokusunu değiştirmedeği, örneklerin tipik et kokusu ve lezzetini muhafaza ettiği görülmüştür. Ayrıca panelistlerden biri tarafından, nisinle kombine kullanılan karanfil gruplarına ait örneklerin sadece karanfil kullanılan örneklerden daha kolay yutulabildiği bildirilmiştir. Bu durum, nisinin karanfil yağının baskın aromasını hafiflettiği şeklinde yorumlanabilse de bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç

vardır. Ette bozulma belirtilerinin bariz olarak görülmesi ve kokuşma bulgularına dayanarak analizin 9. gününden itibaren kaynatma ve kızartma deneyleri uygulanmamış ve etlerin tadındaki değişim bulgularıyla ilgili değerlendirme yapılmamıştır. Kaynatma- kızartma ve tat deneylerine ait bulgular Tablo 38'de verilmiştir.

Tablo 38: Kaynatma- Kızartma ve Tat Deneylerine Ait Bulgular*

	K	1	2	3	4	5	6	7	8
0. Gün	0	2	3	0	0	2	2	2	3
1. Gün	0	2	3	0	0	2	2	2	3
3. Gün	0	2	3	0	0	2	2	2	3
5. Gün	0	2	3	0	0	2	2	3	3
7. Gün	0	2	3	0	0	2	2	3	3
9. Gün	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**
11. Gün	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**
13. Gün	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**
14. Gün	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**	._**

* 5: Aromanın ağızda bıraktığı rahatsız edici etki en fazla, 0: Aromanın ağızda bıraktığı istenen etki en fazla.

._** : Değerlendirme yapılmamıştır.

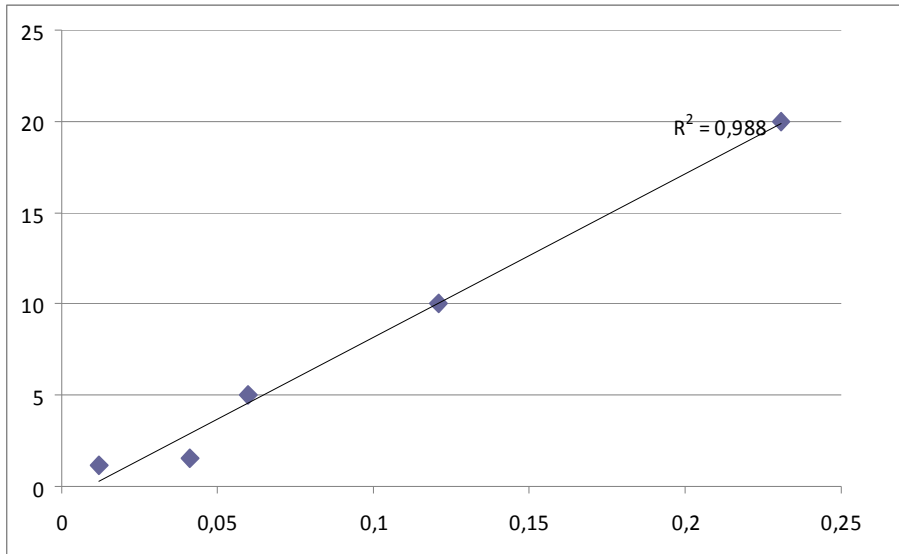
Kuru pedlere karanfil yağı, nisin ve bunların kombinasyonlarının emdirilerek kırmızı etin raf ömrüne etkisinin incelendiği denemelerde antimikrobiyal etkinlik açısından karanfil yağının, nisin ve karanfil yağı + nisin kombinasyonlarına göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Çalışmalarda karanfil yağının kırmızı etin mikroflorası üzerinde etki sağladığı görülmüştür. Nisinin tek başına kullanıldığı deneme gruplarında tüm örneklerde muhafaza sürecinin başlangıç dönemlerinde 1 logaritmaya yakın indirgeme sağlansa da sürecin sonlarına doğru bu fark kapanmış ve kontrol grubuna yakın değerler alınmıştır. Genel olarak nisin ve karanfil yağının kombine olarak kullanıldığı deneme gruplarında karanfil ve nisinin düşük oranda kullanıldığı grubun (5. grup) diğer kombinasyonlara göre daha başarılı olduğu fakat karanfil yağının tek başına kullanıldığı örneklere göre daha az indirgeme sağladığı

görülmüştür. En yüksek karanfil yağı ve nisin oranının kullanıldığı deneme gruplarının (7. ve 8. grup) antibakteriyel etkinliğinin düşük olduğu ve kontrol grubuna yakın sonuçlar alınarak genelde etkisiz kaldıkları görülmüştür. Bu duruma göre, kırmızı ette uygulanan karanfil yağı ile nisin arasında konsantrasyonlarına bağlı olarak antibakteriyel etkinlik göstermelerini engelleyen, birbirlerinin etkilerini azaltan veya ortadan kaldıran bir etkileşim olabileceği düşünülmektedir.

3.7. Antioksidan Etkinlik

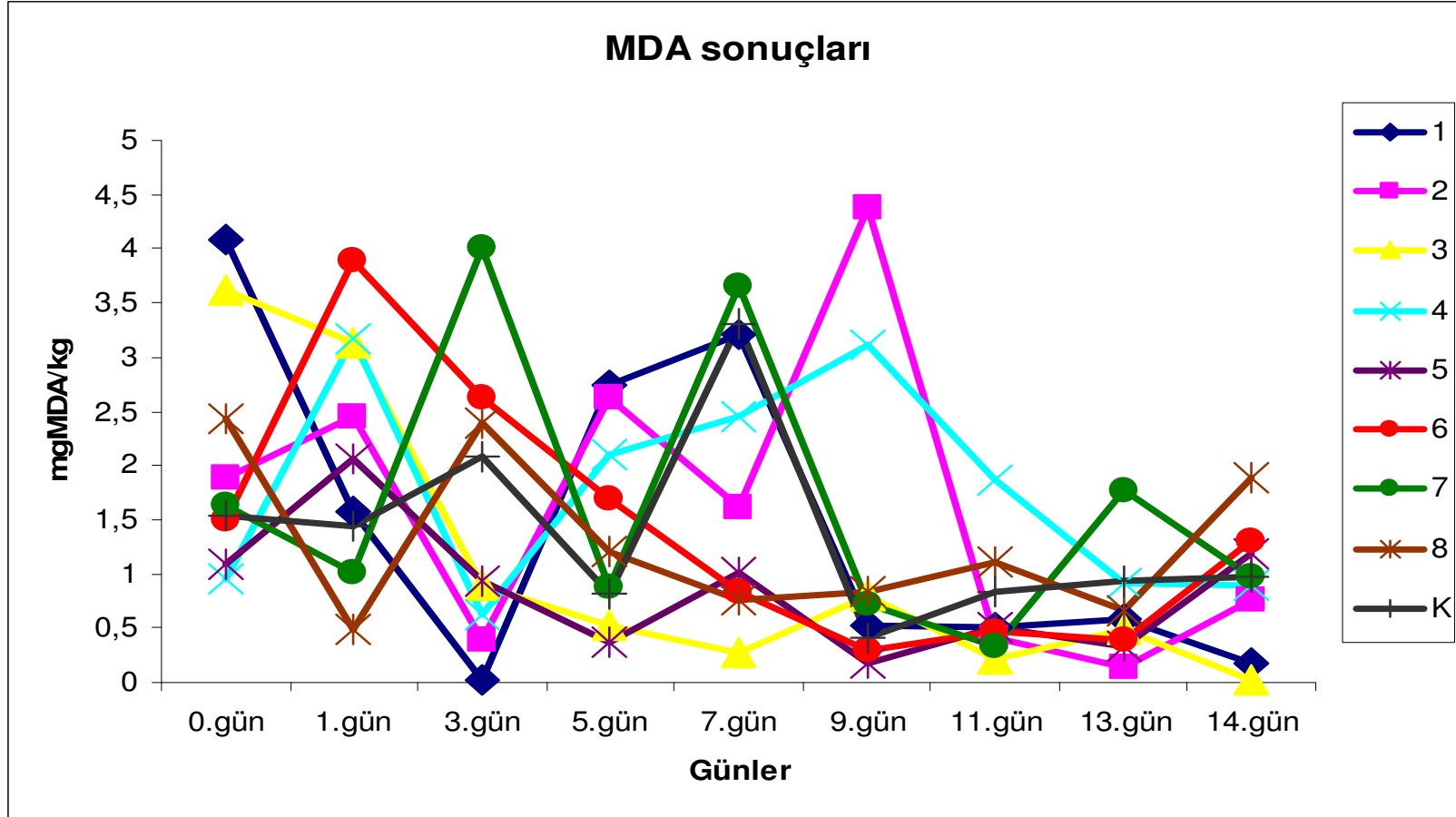
3.7.1. MDA Analizi

Lipit oksidasyonu potansiyeli TBARS belirleme ile değerlendirilmektedir ve MDA konsantrasyonu 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)'in solusyonu kullanılarak elde edilen bir standart eğriden hesaplanmıştır. 2-thiobarbitürik asit (TBA) değeri etin mg'ında MDA/ kg olarak ifade edilmiştir (164). Antioksidan etkinliği belirlemek için kullanılan standart çözeltisinin dilüsyonları 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okunarak (Grafik 12) kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar standart eğri yardımıyla mgMDA/ kg olarak değerlendirilmiştir.



Grafik 12: MDA Analizi İçin Standart Çözeltiye Ait Kalibrasyon Eğrisi.

Yürütülen bu çalışmada karanfil yağı ve karanfil yağı nisin kombinasyonları direkt olarak ete uygulanmamış, polystren tabakların üzerine serilen kuru pedlere emdirilerek etkisi araştırılmıştır. Karanfil yağı, nisin ve bunların kombinasyonlarının antioksidan etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada, deneme grupları arasında etkinlik açısından ayırıcı bir özellik tespit edilememiştir. Bununla birlikte, bir bakteriyosin olan nisin antioksidan etkinliğe sahip olduğuna dair bir veriye ulaşılamamıştır. Analizin 0. gününde 1. ve 3. grupların oksidatif stabilitesinin (sırasıyla 4,08 mgMDA/ kg ve 3,68 mgMDA/ kg) yüksek olduğu görülmektedir. Analizin 1. gününde 3., 4. ve 6. grubun, 3. gününde 7. grubun, 7. günde 1., 7. ve kontrol grubunun, 9. günde ise 2. ve 4. grubun oksidatif stabilitesinin 3 mgMDA/ kg'ın üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, analizin 11. gününden itibaren bütün deneme gruplarının antioksidan etkinliğine ait sonuçları, oksidatif stabilitenin beklenen sınırlar arasında olduğunu göstermektedir. Ancak, çalışmanın sonucunda deneme grupları arasında karanfil yağı içeren tek ve kombine grupların antioksidan etkinliğine dair diğer gruplardan ayrıldığını gösteren bir sonuca ulaşılamamıştır. Yapılan istatistik analizlerde de grupları birbirinden ayıran anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p > 0,05$). Tablo 39 ve Grafik 13'de deneme gruplarının antioksidan etkinliklerine ait sonuçlar verilmiştir.



Grafik 13: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki MDA Değerleri. (mgMDA/ kg)

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

Tablo 39: Muhafaza Süresi Boyunca Gruplardaki MDA Sonuçları, (mgMDA/ kg± standart hata), (n= 3).

Grup	0.gün	1.gün	3.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün	14.gün
1	4,08±2,34	1,57±0,74	0,01±0,47	2,75±1,01	3,21±1,82	0,52±0,54	0,50±0,67	0,58±0,30	0,18±0,22
2	1,88±1,23	2,46±1,84	0,39±0,07	2,63±0,97	1,61±0,88	4,38±4,09	0,40±0,32	0,14±0,53	0,76±0,25
3	3,61±2,19	3,13±1,99	0,89±0,53	0,52±0,56	0,28±0,07	0,80±0,27	0,21±0,10	0,49±0,23	0,01±0,30
4	0,96±0,69	3,17±3,39	0,63±0,35	2,11±1,37	2,46±0,83	3,12±2,95	1,86±0,69	0,92±0,61	0,89±0,46
5	1,08±1,18	2,06±1,39	0,94±0,32	0,36±0,20	1,01±0,93	0,17±0,21	0,50±0,27	0,33±0,17	1,18±0,36
6	1,49±1,28	3,89±3,68	2,62±1,27	1,69±0,98	0,83±0,32	0,29±0,40	0,46±0,50	0,38±0,49	1,30±0,36
7	1,64±0,69	1,02±0,60	4,00±1,89	0,87±0,57	3,66±2,75	0,72±0,29	0,34±0,21	1,77±1,64	0,98±0,37
8	2,43±0,46	0,48±0,66	2,40±0,82	1,21±0,45	0,75±0,13	0,83±0,27	1,11±0,33	0,67±0,55	1,88±1,22
K	1,54±0,67	1,43±0,50	2,09±1,31	0,81±0,19	3,31±2,41	0,40±0,19	0,83±0,60	0,94±0,58	0,98±0,58

1: % 7 Karanfil, 2: % 10 Karanfil, 3: 3.000 IU Nisin, 4: 6.000 IU Nisin, 5: % 7 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 6: % 7 Karanfil + 6.000 IU Nisin, 7: % 10 Karanfil + 3.000 IU Nisin, 8: % 10 Karanfil + 6.000 IU Nisin, K: Kontrol.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüketici ve halk sağlığını ciddi şekilde tehdit eden *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* ve *C. perfringens* gibi önemli gıda patojenlerini elimine etmek için, günümüzde çeşitli antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır (95). Bazı doğal uçucu yağlar patojen *E. coli* gibi bakteriler için yüksek inhibitördürler ve gıdalarda geleneksel antimikrobiyal katkıları için alternatif teknolojiler sağlayabilirler (146). Yenilebilir şifalı bitki ve baharatlar Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin birçoğuna karşı antimikrobiyal ajan olarak veya gıda maddeleri raf ömrünü uzatmak için direkt veya indirekt etkiler sergilerler (90, 99). Antibakteriyel ve antioksidan özelliklerini değerlendirmek ve gıdanın raf ömrünü uzatmak için üzerinde çalışılan birçok bitki ve baharattan biri de bu araştırmada kullanılan karanfildir.

Karanfil tomurcuklarının distilasyonu sonucu elde edilen ana bileşenin eugenol olduğu birçok kaynakta ortaya konmuştur (25, 83, 114, 151). Bitkisel materyal ve ekstraksiyon metoduna bağlı olarak eugenol oranı % 68 ve % 94,4 arasında değişebilmektedir (83). Karanfil'in kuru çiçek tomurcuklarının buhar distilasyonu ile % 7 oranında açık sarı renkli yağ elde edildiği ve eugenol, eugenol acetate, caryophyllene ve α -humulene'i içerdiği bildirilmiştir (25). Karanfil tomurcuklarının GC-MS kullanarak n-hexane ekstraktından 16 uçucu bileşik tanımlanmıştır. Temel bileşenler eugenol (% 71,56) ve eugenol acetate (% 8,99) olmakla birlikte caryophyllene oxide (% 1,67), p-cymene (% 0,9), nootkatin (% 1,05), guaiol (% 0,90) ve thymol (% 0,87) gibi bileşikler de belirlenmiştir (151). Bahsedilen bu araştırma ve benzer çalışmalarda ortaya konduğu gibi bu çalışmada da GC-MS ile analizi sonucu kullanılan karanfilin yağında ana bileşen olarak % 87 oranında eugenol içerdiği görülmüştür. Karanfil yağının yapısında bulunan diğer bileşikler ise % 8 α -Humulene, % 2,1 (E,E)- α -farnesene, % 1,4 Δ -Amorphene, % 0,2 Caryophyllene oxide olarak tespit edilmiştir.

Gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılacak antimikrobiyal etkili maddelerin belirlenmesinde farklı birçok yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerin hiç biri

standart olmadığı gibi sonuçlar da çok sayıda faktöre bağlı olarak değişebilmektedir. Hem yöntemlerin farklılığı hem de antimikrobiyal maddelerin farklılığı yapılan araştırma sonuçlarının karşılaştırılmasında sorunlar çıkarabilmektedir. Her antimikrobiyal maddenin aktivite spektrumunun farklı olması, etki tarzının değişkenliği, kullanılan patojenlerin veya hedef mikroorganizmaların farklı olması gibi birçok etken bu standart yöntemin bulunmasında büyük engel oluşturmaktadır (61). Örneğin, bir çalışmada bakterilerin, uçucu yağların buhar fazlarına maruz kalmaları ile oluşan inhibitör etkilerin direkt temasla bulunanlardan belirgin olarak farklı oldukları sonucu çıkarılmıştır. Bu farklılıklar antimikrobiyal ajanların ve kültür ortamının fiziko kimyasal özellikleri ile mikroorganizma ve ajan arasında temasın bulunmasıyla açıklanabilmektedir. Doğrudan temas deneylerinde antimikrobiyal etki çoğunlukla daha fazla hidrofilik aktivite ve daha az uçucu maddeler nedeniyle olmaktadır (85). Bu yüzden, metodolojinin derinlemesine düşünmeyi gerektiren bir konu olduğu belirtilmektedir. Araştırma için standart bir metodun kullanımı önemlidir. Aynı şekilde, kullanılan konsantrasyonlar ve dilüsyonların uygun olması, bu alandaki araştırma, aktiviteden sorumlu ajan belirlenene kadar veya en aktif fraksiyon veya ekstrakt keşfedilene kadar devam edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Bitki ekstraktları veya polar olmayan bileşikleri çalışma için katı difüzyon tekniklerinin kullanımı önerilmektedir. Küçük miktarda örnek olduğunda difüzyon tekniklerinin kullanımının daha uygun olacağı bildirilmektedir (182).

Bu çalışma antibakteriyel etkili karanfil ve nisini emici pedlere uygulamayla yürütülen ve izlenen bir araştırmadır. Etkisi araştırılan maddeler direkt olarak ete uygulanmayıp emici pedlerin üzerine püskürtülmüştür. Yürütülen bu çalışmada antimikrobiyal maddelerin etkin kimyasal yapısı ile etkileşimini engellemek ve bu maddelerin ette neden olabileceği kimyasal ve organoleptik değişikliklerin önüne geçmek ve aynı zamanda emici pedden depolama periyodu boyunca etkinliğinin devamlılığı sağlanmak amaçlanmıştır. Appendini ve Hotchkiss (17)'de, antimikrobiyal paketlemenin; paketlerin içine uçucu antimikrobiyal ajanlar içeren poşetler veya pedlerin ilavesi, uçucu veya uçucu olmayan antimikrobiyal ajanların bileşiminin doğrudan polimerin içine konması, polimer yüzeylerin üstüne antimikrobiyalların kaplanması veya emdirilmesi, iyon veya kovalent bağlarla polimerler için antimikrobiyalların immobilizasyonu ya da doğal antimikrobiyalların

kullanımını içeren formlarda olabileceğini söylemektedir. Uçucu antimikrobiyallerle paketleme teorik olarak, gıdanın yüzeyine nüfuz edebilme ve direkt ürün teması gerektirmemesi gibi avantajlara sahiptir.

Antimikrobiyal etki testlerinde sonuçları etkileyen birçok faktör olması nedeniyle gıda ortamında yapılan çalışmalar ile laboratuvar şartlarında yapılan araştırmalar arasında büyük farklılıklar göze çarpmaktadır (61). Aynı şekilde, uçucu yağların aktivitelerinin in vitro çalışmalarda daha yüksek olmasına karşın gıdalardaki uygulamalarında daha düşük düzeyde olduğu ortaya konmuştur (43, 45). Canlı sistemlerde antimikrobiyal maddenin etkisini sınırlayan birçok etken mevcuttur ve bu faktörleri aynı anda kontrol etmek oldukça zordur. Laboratuvar ortamında ise kullanılan besiyerlerinin bileşimi ve pH değerleri, inkübasyon ısıları, inoküle edilen miktar, seçilecek patojen gibi ortam şartları çok daha kolay kontrol edilebilmektedir. Daha doğru sonuçlar elde etmek için yapılacak denemelerde mutlaka tüm etkenlerin belirlenip kontrol altına alınması gerekmektedir (61). Bitkisel orjinli antimikrobiyallerin etkinliği ise bitki materyalinden uçucu yağların ekstraksiyon metodu, inokulum miktarı, büyüme fazı, kullanılan kültür ortamı ve pH, yağ, protein, su içeriği, antioksidanlar, koruyucular, inkübasyon zamanı/ sıcaklığı, paketleme prosedürü, gıdanın fiziksel yapısı gibi gıdanın içsel ve dışsal özelliklerini içeren birçok faktöre bağlıdır (39).

Bunun yanında, antimikrobiyal aktivite, test edilecek mikroorganizmanın cinsi, türü ve suşu; test yönteminde kullanılacak olan besiyeri veya gıda ortamına; antimikrobiyal maddeye uygulanabilecek sterilizasyon, membran filtrasyon, ısı vb., kullanılacak çözücü maddelere ve antimikrobiyal maddenin saflık derecesine, atmosfer şartlarına (anaerobik- aerobik), ortamın pH değerlerine bağlı olarak değişmektedir (61). Nitekim, çözücü ve ekstraksiyon sistemi baharatın kendisiyle ekstraktları arasındaki sonuçları değiştirebilmektedir (182). Fenolik maddeler içeren birçok bileşiğin sulu ortamlarda çözünürlüğü ve dağılımının zayıf olmasından dolayı (99) uçucu yağın çözünmesi veya su bazlı kültür ortamında stabilize edilmesinde etanol, methanol, tween-20, tween- 80, aseton, polietilen glikol, propilen glikol, n-heksan, dimetil sülfoksit veya agar gibi bazı maddelerin kullanılabilirdiği bildirilmiştir (45). Buna rağmen, Gutierrez ve ark. (89), bunlardan bazılarının kullanıldığında uçucu yağ etkinliğinde hiçbir düzelme bulunamadığını savunmuşlardır. Ancak,

laboratuvarda metanol veya etanol ekstraktların kullanımı çok yaygın olarak uygulanmaktadır (182). Kuru pedlere belirlenen maddelerin emdirilmesi ile yürütülen bu çalışmada her püskürtmede aynı oranda etkili maddenin pede bırakılabilmesini sağlamak üzere karanfil yağı içeren deneme gruplarının örnek sıvılarına tween- 80 eklenmiştir. Sadece BHI broth ve tween- 80 içeren kontrol tüpü ile antibakteriyel aktiviteye bir etkisinin olmadığı teyit edilen tween- 80, karanfil yağının pedlere nispeten eşit dağılımını sağlayabilmiştir.

Gıdalarda doğal koruyucuların teknolojik olarak uygulamalarda başarılı olabilmelerini sağlamak için organoleptik kaliteyi etkilemeden patojenik bakterilerin üremesini inhibe etmek üzere gerekli olan uçucu yağların minimum konsantrasyonu belirlemek önemlidir. Test edilen mikroorganizmanın gelişmesini tamamen inhibe etmek için gereken uçucu yağın en düşük konsantrasyonu MIC olarak tasarlanmıştır (89, 146, 166). Zayıf dilüsyonlar veya oldukça yüksek konsantrasyonlar için pozitif aktivite iddia etmek gerçekçi olmayacağından, örneğin ekstrakt için 1 mg/ml'den veya izole bileşikler için 0,1 mg/ml'den yüksek miktarlar için deneylerden kaçınılması gerektiği vurgulanmaktadır. Aktivitenin varlığından bahsedebilmek için ekstraktta 100 µl/ml ve izole bileşikte 10 µl/ml'den daha aşağı konsantrasyon kullanılabilirdiği durumlarında ilginç olarak değerlendirilmiştir (182). Uçucu yağların düşük konsantrasyonları doğal yükü ile kontamine ürünler için yeterli olabilir, fakat yetersiz konsantrasyonlar kullanıldığında bakteriyel iyileşme ile yeniden eski seviyesine ulaşmasına izin verilebilir. Yapılan bir çalışmada az yağlı peynir örneğinde, süre 14 günden fazla uzadığında bakteriyel iyileşmenin görülebildiği bildirilmiştir. Bu durumun letal doz altında hasarlı hücrelerin yeniden harekete geçebilmesiyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (200). Bu nedenle, karanfilin kırmızı et raf ömrüne etkisini belirlemeden önce ilk adım olarak, belirlenen bakteriler üzerindeki MIC düzeyleri tespit edilmiştir.

Gıda sanayinde ve halk sağlığında büyük sorunlar çıkaran patojenik ve bozulma yapıcı bakterilere karşı, birçok bitki ve baharat ile minimum etkili olabilecek inhibisyon konsantrasyonunu belirlemek üzere birçok çalışma yapılmıştır. *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 2812 1/2a, *S. Typhimurium* SL 1344 ve *S. aureus*'a karşı 28 uçucu yağın MIC ve MTC aktiviteleri değerlendirilmiştir. Karanfilin *E. coli* O157:H7'ye karşı % 0,1 MIC ve % 0,013 MTC, *S. Typhimurium*'a

karşı % 0,1 MIC ve % 0,025 MTC, *S. aureus*'a karşı % 0,05 MIC ve % 0,025 MTC, *L. monocytogenes*'e karşı % 0,2 MIC ve % 0,006 MTC aktivitesi sergilediği gözlenmiştir. Bu yağa karşı *L. monocytogenes*'in en dirençli, *S. aureus*'un ise en hassas bakteri olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar Gram negatif olan *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium*'un Gram pozitif olan *S. aureus*'a göre daha az hassas olmasına karşı yine Gram pozitif olan *L. monocytogenes*'in diğer bakterilere göre daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur (166). Dört Gram negatif bakteri, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* ile iki Gram pozitif bakteri *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı 1:1, 1:5, 1:10 ve 1:20 konsantrasyonlarda disk difüzyon metodu ile 21 bitki uçucu yağının aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada en düşük konsantrasyonda bile aktivite sergileyen tarçınla birlikte karanfil, sardunya, limon, misket limonu, portakal ve biberiye yağlarının hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı belirgin inhibitör etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur. Karanfil yağının MIC değerleri *S. aureus* için > 6,4 mg/ml, *K. pneumoniae* > 6,4 mg/ml, *B. subtilis* için > 3,2 mg/ml, *P. vulgaris* için > 3,2 mg/ml, *P. aeruginosa* için > 1,6 mg/ml, *E. coli* için > 1,6 mg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmada genel olarak kullanılan uçucu yağlara karşı *B. subtilis*'in en hassas, *K. pneumoniae*'nın ise en dirençli bakteri olduğu bildirilmiştir (175).

Bozulmuş gıda ürünlerinden izole edilen *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Klebsiella spp.*'ye karşı yerel bir marketten temin edilen 10 uçucu yağın aktivitesi izlenmiş, Gram negatif test bakterileri, tarçın ve karanfil hariç uçucu yağların çoğunluğuna karşı dirençli bulunmuştur. Karanfil MIC değeri % 2,5 ile % 5 arasında gözlenmiştir. Karanfil için en duyarlı bakterinin *B. cereus* (24 mm inhibisyon zonu ile), en dirençli bakterinin ise *P. aeruginosa* (0,0 mm inhibisyon zonu ile) olduğu görülmüştür (87).

Devi ve ark. (65) çalışmalarında eugenol'ün *Salmonella typhi* için MIC değerini % 0,0125 ve MBC değerini ise % 0,25 olarak belirlemişler ve 60 dakika maruz kalma ile inaktive olduğunu bildirmişlerdir. MIC ve MBC düzeyleri ile *S. typhi*'ye karşı eugenol'ün sırasıyla bakteriostatik ve bakterisit ajan olarak rol aldığı açıklanmıştır. Karanfil ve tarçının güçlü antibakteriyel etkisi eugenol ve cinnamaldehyde'in baskın özelliğinden kaynaklanabileceği bildirilen bir çalışmada,

karanfil ve tarçın % 0,5 ve % 1 konsantrasyonlarda *S. aureus*'a karşı göreceli olarak daha az etkili olsa da, *E. coli* ve *B. cereus*'a karşı güçlü aktivite göstermişlerdir (201). Başka bir çalışmada MIC değerlerine göre test edilen mikroorganizmalar arasında *B. cereus* ve *S. aureus* tarafından takip edilen *Y. enterocolitica* en hassas mikroorganizma olarak belirlenmiştir. *P. aeruginosa* en az etkilenen suş olarak ayrılmıştır (85).

Söz konusu araştırmalara paralel olarak, bu çalışmada denenen bakteriler üzerinde elde ettiğimiz sonuçlara göre *P. aeruginosa* karanfil yağına karşı en dirençli bakteri olarak ortaya çıkmıştır. Oussalah ve ark. (166)'nın buldukları sonuçla uyumlu olarak, % 0,7 ile en yüksek MIC değerini göstererek Gram pozitif bakteriler arasında en dirençli bakteri *L. monocytogenes* olarak belirlenmiştir. Laktik asit bakterileri % 0,4- 0,5 MIC düzeyleri ile orta düzeyde etkilenme göstermişlerdir. Gram pozitif bakteriler arasında en hassas bakteri ise *B. thermosphacta* olarak ortaya çıkmıştır. Birçok literatürde Gram pozitif bakteriler arasında en hassas olarak *S. aureus* verilse de Sofia ve ark. (201)'nin elde ettiği sonuca benzer olarak bu bakteri, bu araştırmada da % 0,5 MIC düzeyi ile birçok Gram negatif bakteriden daha yüksek bir direnç göstermiştir. *S. aureus* % 0,5 MIC düzeyi ile *B. cereus*'dan daha (% 0,2) dirençli olarak bulunmuştur. Goni ve ark. (85)'nin verilerine benzer olarak *Y. enterocolitica* bu çalışmada da % 0,14 MIC düzeyi ile hassas bakterilerden birisi olarak belirlenmiştir. Gram negatif bakteriler arasında *S. dysenteriae*, *Y. enterocolitica*'yı yakından takip eden bir MIC düzeyine sahiptir. *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* % 0,2 MIC düzeyi ile Oussalah ve ark. (166) belirlediği duruma benzer yine *L. monocytogenes*'den daha düşük MIC düzeyine ulaşmışlardır. Başka bir araştırmada da, bu çalışmada elde edilen sonuçla (*E. coli* için MIC % 0,2) paralel olarak, karanfilin etkisine karşı *E. coli*'nin *Listeria*'dan daha hassas olduğu sonucuna varılmıştır (146).

Yapılan çalışmalar genellikle Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere nazaran uçucu yağlara daha hassas olduğunu bildirmektedir. Bu durum, Gram negatif bakterilerin hidrofobik bileşiklerin hücre içine girişini engelleyen, difüzyonunu kısıtlayan lipopolisakarit dış membrana sahip olmaları dolayısıyla antimikrobilyallara daha az hassas olmalarıyla açıklanabilmektedir (155, 200). Yine, antibiyotiklerle doğal antimikrobiyal kombinasyonlarının aktivitesine karşı da Gram

pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere göre daha hassas oldukları belirlenmiştir (170).

Gram pozitif bakteriler hücre duvarına sahip olmadıkları için antibakteriyel maddelerce bakteriyel hücre duvarı ve stoplazmik membran kolayca yıkımlanır, koagülasyon ve stoplazmanın akışıyla sonuçlanır (115). Gıda kaynaklı beş bakteri; *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, ve *Salmonella anatum*'a karşı 46 baharat ve şifalı bitkinin agar- kuyu difüzyon yöntemi ile in vitro antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi sonucu genel olarak Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere oranla daha hassas oldukları onaylanmıştır. Kullanılan bitki ve baharatların antibakteriyel aktiviteleri ile yüksek fenolik içerikleri arasında paralel bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *E. coli*'nin en dirençli *S. aureus*'un en duyarlı bakteri oldukları görülmüştür. *S. anatum*'a karşı *Eugenia caryophyllata* (karanfil) *Prunella vulgaris*, *Terminalia bellirica* gibi bazı ekstraktların inhibitör aktivitesinin *B. cereus* ve *L. monocytogenes*'den daha büyük olması bu ekstraktlarda bazı özel anti- Gram negatif maddeler olabileceğini düşündürmüştür (196).

Bununla birlikte, kesin olarak Gram pozitif bakterilerin daima daha etkilenebilir oldukları anlamı çıkarılamaz (45). Uçucu yağların biofilm üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada Gram pozitif suşların etkilenebilirliğinde farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin *Staphylococcus succinuc* yıkımlanmazken *Staphylococcus equorum*'un yıkımlanması hassasiyetin türlere bağlı olduğunu göstermiştir (129). Bozulmuş gıda ürünlerinden izole edilen *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Bacillus spp.*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Klebsiella spp.* üzerinde çalışılan bir araştırmada da yine tarçın ve karanfilin geniş bir antibakteriyel aktivite sergilediği görülmüştür (87). Buhar fazda tarçın ve karanfil yağlarının inhibisyon zonunun büyüklüğü genel olarak tarçın yağında *S. choleraesuis* < *E. faecalis* < *L. monocytogenes* ≈ *E. coli* ≈ *S. aureus* ≈ *B. cereus* < *Y. enterocolitica*; karanfil yağında: *S. choleraesuis* ≈ *L. monocytogenes* ≈ *E. faecalis* < *S. aureus* ≈ *B. cereus* < *E. coli* < *Y. enterocolitica* şeklindeki bir etkinlik sırasıyla gözlenmiştir (85). Karanfil yağının Gram negatif bakteriler (*E. coli* ATCC 35218, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. paratyphi*, *Citrobacter spp.* ve *Enterobacter cloacae*) bir Gram pozitif bakteri (*S. aureus* ATCC 25923) ve bir maya (*C. albicans*)'a karşı geniş bir spektrumda etkinlik gösterdiği, MIC

düzeylerinin *S. aureus* ATTC 25923, *E. cloacae*, *S. paratyphi*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ATTC 35218, *E. coli*, *Citrobacter* spp. ve *C. albicans* için sırasıyla 2.4, 1.6, 0.27, 0.016, 0.23, 1.63, 0.73 ve 0.067 mg/ml olduğu belirlenmiştir (25). Dört Gram pozitif ve dört Gram negatif bakterinin buhar fazda çalışıldığı bir çalışmada da, *P. aeruginosa* dışında uçucu yağın aktivitesi ile Gram pozitif veya Gram negatif yapı arasında bir ilişki gözlenmemiştir (85). Lopez ve ark. (137), çalışmalarında *P. aeruginosa* hariç Gram negatif ve Gram pozitif suşlar arasında belirgin farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada genel olarak MIC (mantar) << MIC (bakteri) sonucunu çıkarmışlardır. Karanfilin in vitro olarak değerlendirildiği ve bildirilen bakterilere karşı MIC düzeylerinin belirlendiği çalışmada *P. aeruginosa* hariç düşük oranlardaki yağ konsantrasyonlarının başarılı olması ile Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olarak, geniş bir antibakteriyel etkinlik sergilediği görülmüştür. Goni ve ark. (85) ile Lopez ve ark. (137) tarafından ortaya konan sonuçlar gibi *P. aeruginosa* için bir MIC düzeyinin belirlenememesiyle benzerlik gösteren bir şekilde bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *P. aeruginosa* dışında, karanfilin Gram pozitif bakteriler kadar Gram negatif bakteriler üzerinde de oldukça etkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmada karanfil ile kombine edilerek gıda ortamında antibakteriyel etkinliği çalışılan diğer madde, bir bakteriyosin olan nisindir. Bakteriyosinlerin büyük bir çoğunluğunun başta Gram pozitif mikroorganizmalar olmak üzere birçok patojene karşı bakteriyosidal ve bakterisit etki gösterdiği bildirilmektedir (2, 102). Ancak, Gram negatif bakteriler üzerinde etkisiz oldukları görülmektedir (2). Bakteriyosinlerin gıdalarda uygulamalarını sınırlayan en büyük engel, genellikle Gram negatif bakterilere karşı aktif olmamalarından dolayı sınırlı aktivite spektrumları ve antibakteriyel etkilerinin az olmasıdır. Bakteriyosinlerin hedefi sitoplazmik membrandır. Gram negatif bakterilerin dış membranlarındaki lipopolisakkaritin koruyucu bariyerinden dolayı bakteriyosinler genellikle Gram pozitif hücrelere karşı etkilidirler (48). Yukarıdaki literatür bilgilerine paralel olarak, aynı sonuçlar elde edilmiş ve in vitro aktivitesini test ettiğimiz nisin, çalışmada kullanılan Gram negatif bakteriler üzerinde bir aktivite göstermemiştir. Bunun yanında test edilen Gram pozitif bakteriler üzerinde *M. luteus* için 5.000 IU, *L. monocytogenes* için 7.500 IU, *B. subtilis* için 50.000 IU, *S. aureus* için 75.000 IU ve

B. thermosphacta için 50.000 IU olarak belirlenen MIC düzeyleri ile etkili olabilmektedir.

Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda bakteriyosinler hedef mikroorganizmalara karşı etkili olsalar da gıda ortamında etkilerinin çok farklılık gösterdiği, etkisiz kalabildikleri bildirilmektedir. Gıdalardaki birçok faktör bakteriyosinlerin aktivitelerini azaltmakta veya tamamen yıkımlamaktadır. Bu yüzden gıda uygulamalarında aynı başarı söz konusu olmamaktadır (102, 209). Duyarlı hücrelere bakteriyostatik veya bakteriyosidal şekilde etki eden bakteriyosinlerin saflık derecesi, bakteriyosinjenik suşun fizyolojik durumu ve deneysel şartlar (pH, ısı, diğer antimikrobiyal bileşikler vs) gibi birçok faktör etki tarzlarını ve etki kapasitelerini değiştirebilmektedir (53). Sınıf I ve sınıf II bakteriyosinler genellikle ısıya dayanıklıdır, fakat gıdalarda bulunan proteolitik enzimlerle inaktive olmaktadır. Çoğu bakteriyosin hidrofobik karakterli olup gıdadaki yağlar ve fosfolipitler tarafından tutulmaktadır (209).

Süt ürünlerinde etkili sonuçlar veren nisin et ürünlerinde başarılı bir koruyucu değildir (102). Etlerde yüksek dozda nisin kullanımı ile *C. botulinum*'un kontrol edilebileceği bildirilse de et sistemlerindeki çözünürlüğünün az olması, et partiküllerine bağlanması, fosfolipitler ile interferens etki oluşturmaya bağlı olarak, nisinin et ürünlerindeki etkisi zayıftır (167). Ette nisinin çözünürlüğünün azalması ve stabilitesini koruyamaması başta gelen etkenlerden biridir. Başarılı bir koruyucu olarak değerlendirilmemesinin bir diğer nedeni ise, bazı laktik asit bakterileri üreme döneminin başında bakteriyosin üretirken bazıları bu dönemin sonunda bakteriyosin üretmektedir. Ayrıca etkili olabilen konsantrasyon için kullanılan bakteriyosin miktarının yüksek olması ekonomik bulunmamaktadır (102). Bununla birlikte, yapay olarak kontamine edilmiş geleneksel Türk sucuğunda 0, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/gr konsantrasyonlarda nisin ile *L. monocytogenes*'in inhibisyonu denenmiş, sırasıyla 100 µg/gr ve 50 µg/gr nisinin 20. ve 25. günlerde tamamen ihhibisyon sağladığı görülmüştür. Nisinin artan konsantrasyonları ile sucukta *L. monocytogenes*'in inhibisyonu da artmıştır (96). Bu gibi sonuçlara rağmen, Hugas (102) ve Ova (167) tarafından verilen bilgileri doğrular nitelikte kırmızı etin nisin emdirilmiş pedlerle paketlenmesi şeklinde yapılan bu çalışmada nisinin başarılı bir sonuç ortaya koymadığı görülmüştür.

Antibakteriyel etkinliklerini değerlendirmek üzere bazı çalışmalarda uçucu yağların, kimyasal maddelerin ve antibakteriyel özellikteki doğal maddelerin kombinasyonları yapılmaktadır (85, 129, 154, 191, 211). Ayrıca, tekniklerin kombinasyonları bazı gıdalarda ve in vitro deneylerde başarıyla uygulanmaktadır. Bununla birlikte, gıdalarda etkileri ile ilgili sınırlı veri, güçlü koku ve yüksek maliyet gibi üç önemli faktör nedeniyle sentetik katkılarla karşılaştırıldığında şifalı otlar, baharatlar ve onların uçucu yağ uygulamaları çok azdır (211). Birçok antimikrobiyal ürünün kombine kullanımı, gıdada bu bileşiklerin dozunu azaltırken iyi bir mikrobiyal emniyet sağlayabilir. Ayrıca, aromatik bileşiklerin suya göre yağda daha iyi çözünebilirliği, patojenlere karşı efektif fırsata sahip olmalarını sağlaması ile gıdanın sulu fazında bu bileşiklerin bulunabilirliğini değerlendirmek açısından da önemli sonuçlar verebilecektir (154). Tıbbi bitki ekstraktlar veya doğal ürünlerin tek başına, kombine veya antibiyotiklerle birlikte kullanımı durumunda, aktiviteyi yükseltmek için başka bileşik ile birlikte zayıf bir antimikrobiyal doğal ürünün potansiyel kullanımını daha fazla destekleyebileceği düşünülmektedir (182). Antimikrobiyal maddenin kimyasal aktivitesi anlamına gelen gıdanın bileşenleri ve gıda katkıları ile reaksiyona girmesi antimikrobiyal aktivitesinde azalmaya neden olabildiği gibi kimyasal reaksiyonlar sonucu gıdada istenmeyen bazı değişimler de oluşabilmektedir. Ayrıca, gıdanın yapısında doğal olarak oluşan bazı bileşikler antimikrobiyal etkiye sahip olabildikleri gibi, gıdada kullanılan antimikrobiyal madde üzerinde sinerjistik veya antagonistik etki gösterebilmektedirler (45, 61, 167).

Bitki ve baharatların ve bunların aktif bileşenlerinin çeşitli kombinasyonlarına ait sinerjik veya antagonistik etkilerini ortaya koyan birçok araştırma mevcuttur. Tarçın ve karanfil uçucu yağlarının kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi buhar fazda, sıvı fazla karşılaştırıldığında daha az aktif konsantrasyon ile daha iyi antimikrobiyal etki gösterdikleri bulunmuştur. Tarçın ve karanfil kombinasyonu bakteriler üzerinde *E. faecalis* < *S. choleraesuis* < *S. aureus* \approx *L. monocytogenes* \approx *E. coli* << *B. cereus* < *Y. enterocolitica* şeklinde bir sıra takip etmiştir (85). Karanfil, biberiye, meyan kökü ve sinameki kabuğunun bireysel ekstraktlarının güçlü antimikrobiyal aktivite sergiledikleri, 14 baharatın incelendiği çalışmada *L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. fluorescens* ve *Lb. sake*'ye karşı en iyi inhibitör aktiviteyi sadece biberiye ve meyan kökü karışımı göstermiştir (242).

Thymol ve carvacrol *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, ve *B. cereus*'a karşı cilantro, kişniş, dere otu ve okaliptus uçucu yağlarının farklı kombinasyonları ile cinnamaldehyde ve eugenol'ün karışımlarında sinerjik ve antagonistik etki göstermişlerdir (45). Anotla elektrolize edilmiş NaCl solusyonu ile muamele edildikten sonra % 0,5 eugenol ve % 0,5 linalool ile kaplanan yarı kızartılmış Tuna balığının raf ömrünü uzatmada sinerjik bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (3). Maksimum inhibisyon konsantrasyonları kullanıldığında karanfil ve tarçın uçucu yağları *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *Y. enterocolitica*'nın inhibisyonunda sinerjik bir etki göstermişlerdir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) yaklaşımını takiben uçucu yağların kombinasyonunda hiçbir sinerjik etki elde edilememiştir. MIC uygulandığında ise *E. coli*'nin üremesinde antagonistik bir etki sergilemişlerdir. Bu durum, konsantrasyona bağlı etkileşimin açık bir göstergesi olarak belirlemiştir (85). Broth kültürde % 1 karanfil ve dağ kekiği kombinasyonu *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etki göstermekle birlikte bazı konsantrasyonların et sulu bulamaçta etkili olmadıkları görülmüştür (135). Beş aromatik bileşik (thymol, carvacrol, citral, eugenol ve geraniol) ve dört asidik bileşik (asetik asit, sitrik asit, malik asit ve piropolifosforik asit) *S. Typhimurium* üremesini inhibe etmek üzere kombine edilmiştir. Thymol veya sitrik asit gibi bazı antimikrobialler daha iyi inhibisyon sağlasalar da denenen bileşikler arasında gerçek bir sinerjistik etki bulunamamıştır (154). İki uçucu yağ bileşeni thymol ve eugenol, *Satureja thymbra* (taş kekiği) uçucu yağ ve iki endüstriyel biosit PE 270- 30 ve Brillo kullanarak patojenik bakterilerin biofilmlerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada thymol ve eugenol solusyonlarının biofilimde hiçbir bakteriyi öldürmediği, bileşiklerin kombininin etkilerini artırmadığı görülmüştür (129). Davranışlardaki bu farklılıkların uçucu yağ içeriğinde bulunan küçük miktardaki bileşiklere atfedilebileceği bildirilmiştir (85). Karanfil ve kişniş uçucu yağları vakum paketli domuz etinde *Aeromonas hydrophila*'ya karşı kullanıldığında sinerjistik etki göstermişlerdir. O₂ düzeyinin azalması ile mikroorganizmaların uçucu yağlara hassasiyeti yükseldiği için uçucu yağ aktiviterinde oksijenin kullanılabilirliği antagonistik bir etki olarak karşımıza çıkmaktadır (45).

Antimikrobiyal etkiyi artırmak için nisin ve diğer antibakteriyel maddelerin kombinasyonları da çeşitli çalışmalarda denenmiştir. *Zataria multiflora*'nın (bir çeşit

kekik) farklı konsantrasyonları ile nisin'in 0,0, 0,25, 0,5, 1,5 ve 2,5 µg/ml konsantrasyonlarda kullanıldığı, farklı pH ve sıcaklık değerlerinde 43 gün muhafaza edilerek vejetatif *B. cereus* sayılarının incelendiği çalışmada, 10 °C depolama sıcaklığı ile nisin'in inhibitör etkisinin yükseldiği bildirilmiştir (145). Koyun kıyması % 0,6 ve % 0,9 kekik yağı ile 500 IU/gr, 1000 IU/gr nisin ve bunların kombinasyonlarının ilavesiyle 4 °C veya 10 °C'de 12 gün boyunca izlenmiş ve *S. Enteritidis*'e karşı % 0,6 kekik yağı ile 500 IU/gr veya 1000 IU/gr nisin kombinasyonu tek başına % 0,6 kekik yağından daha başarılı bulunmuştur. *S. Enteritidis*'e karşı bakterisidal bir etkiyle % 0,9 kekik yağı ile 500 IU/gr veya 1000 IU/gr nisin kombinasyonları en etkili uygulamaları sağlamışlardır. % 0,9 kekik yağı ile muamele edilen örneklerde 4 °C'de depolama boyunca *S. Enteritidis* sayısı 1 log kob/gr altında tutulabilmiştir. 500 IU/gr veya 1000 IU/gr nisin tek başına koyun kıymasına ilavesi *S. Enteritidis*'e karşı hiçbir antibakteriyel etki göstermemiştir (86). Sığır kıymasına uygulanan 500 IU/gr veya 1000 IU/gr nisin ile kombine edilen % 0,6 kekik uçucu yağının *L. monocytogenes*'e karşı sinerjik bir etki ile güçlü bir inhibitör aktivite sergiledikleri bildirilmiştir. Uygulamalar arasında en etkili olan, % 0,6 kekik yağı ile 1000 IU/gr nisin kombinasyonu 4 °C depolama boyunca *L. monocytogenes* popülasyonunu (2 log kob/gr) AB'nin Resmi Limiti altında tutabilmiştir (205). Solomakos ve ark. (204) % 0,3, % 0,6 ve % 0,9 kekik yağı ile 500 IU/gr veya 1000 IU/gr nisin kombine ederek *E. coli* O157:H7'ye karşı aktivitesini sığır kıymasında ve Tryptic soy broth'da (TSB) incelemişlerdir. % 0,3 kekik yağı TSB'de zayıf antibakteriyel etki sergilemişken % 0,9 ise kıymada kabul edilemez organoleptik özellikler göstermiştir. Nisin hiçbir konsantrasyonda tek başına başarılı olamazken % 0,6 kekik yağı ile 500 IU/gr veya 1000 IU/gr nisin kombinasyonları, TSB ve sığır kıymasında 10 °C depolamada 4 °C'de depolamaya göre daha yüksek katkısız etki sergilemişlerdir. Başka bir çalışmada, kekik ve sarımsak yağı (% 2 w/v) içeren peyniraltı suyu proteini izolatu (PPI) filmlerine natamisin veya nisin ilave edilmiş ve bu filmler *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *Penicillium spp.* inoküle edilmiş dilim kaşar peynirleri üzerine uygulanmıştır. 15 gün buzdolabı sıcaklığında depolanan örneklerde *L. monocytogenes* sayısında en fazla azalma nisin ve *E. coli* O157:H7 ile kontamine örneklerde en fazla azalma da kekik yağı içeren film ile ambalajlanmış örneklerde görülmüştür (191). 3:1 oranında

lizozim ve nisin karışımının 6 hafta boyunca doğal mikroflorası ile 2 °C'de vakum paketlenmiş domuz filetoalarının LAB ve *Brochothrix thermosphacta*'nın çoğalmasını kontrol etmede etkili olduğu görülmüştür. *Enterobacteriaceae* sayılarının işlenmiş örneklerde işlenmemiş örneklere göre daha yüksek bir orana sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Laktik asit bakterilerinin gelişimi antibakteriyel uygulama ile inhibe edildiğinde, bu durumun LAB'nin antimikrobiyal aktivitesi sonucu azalan *Enterobacteriaceae* sayısında bir artışa yol açtığı sonucuna varılmıştır. Bu şekilde, populasyondaki artış ve kötü koku özellikleri ile etin erken bozulmasına sebep olabileceği değerlendirilmesi yapılmıştır (152). Soğuk-füme somon balığının yüzeyine düşük ve yüksek düzeylerde *L. monocytogenes*'in nisine dirençli 3 suşu karma şekilde inokule edilmiş ve 2000 IU nisin içeren plastik filmle vakum paketlenmiştir. İndirgeme düzeyleri 4 °C'de ve 10 °C'de takip edildiğinde, nisin buzdolabı sıcaklığında bakteriyostatik etkisi daha belirgin olmasına rağmen, her iki depolama sıcaklığında konsantrasyona bağlı durumda füme somonun mikrobiyolojik yükünün çoğalmasını engellemiştir (156). Vakum paketlenmiş sosislerin yüzeyinde toplam aerobik bakterileri ve *L. monocytogenes*'i kontrol etmek üzere etkili bir antimikrobiyal selüloz filmin üretimi için gerekli olan en düşük nisin miktarı 625 IU ml/l ve en kısa süre de 6 saat olarak belirlenmiştir. Fakat bu şartlar altında üretilen aktif selüloz filmler kontrolle karşılaştırıldığında sosislerdeki *L. monocytogenes* sayısında belirgin bir azalma sağlayamamıştır. 2500 IU ml/l konsantrasyondaki nisin kullanıldığı filmlerde 6 saat maruz bırakma sonucu 14 gün sonra *L. monocytogenes* sayısında belirgin bir azalma görülmüştür (157). Tavuk etinde, 500-1500 IU/gr nisin ve 10- 50 mM EDTA'nın tek başlarına ve kombine kullanıldıklarında, 1500 IU/gr nisin ve nisin- EDTA kombinasyonlarından mezofil bakteriler, *Pseudomonas spp.*, *B. thermosphacta*, LAB ve *Enterobacteriaceae* popülasyonlarının etkilendiği bildirilmiştir. Bu uygulamaların MAP ile kombinasyonu, tavuk etinin raf ömrünü 1- 2 ile 13- 14 gün arasında uzatmışlardır. 1500 IU/gr nisin 10 mM ve 50 mM EDTA kombinasyonları kabuledilebilir koku özelliklerini sürdürmeleri sonucu tavuk etinde en iyi koruyucu olarak ortaya çıkmışlardır (72).

Bu çalışmada karanfil yağı ve nisin kombine edilerek etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan karanfil yağı ile nisin kombinasyonu, yapılan araştırmalardan

elde edilen sonuca göre ilk kez denenmektedir. Denemelerde kullanılan 6.000 IU nisinin LAB sayılarını indirgemedi kontrolle göre belirli bir fark yarattığı çalışmada nisin ve karanfilin yüksek konsantrasyonlarının bulunduğu deneme gruplarında bu etkiyi kaybettikleri görülmüştür. *Brochotrix spp.*'ye ait elde edilen verilerde ise nisin başarılı olamamıştır. Karanfile ait gruplarda *Brochotrix spp.* sayılarında bir indirgenme görülse de kombinasyon grupları, karanfil ile nisinin tek başına kullanıldığı deneme gruplarının arasında bir etki göstermişlerdir. *Enterobacteriaceae* sayılarını indirgemedi 6.000 IU nisinin kontrolle göre çok az bir fark yaratmasına rağmen genelde etkili olamadığı bulunmuştur. Karanfille kombinasyonda nisinin etkisi yükseltilmiş ve *Enterobacteriaceae* sayılarını indirgeyebilmişlerdir. *S. aureus* sayılarında karanfil yağına ait gruplar ile düşük oranlarda karanfil yağı ve nisin içeren kombinasyon grupları nispeten kontrolle göre daha yüksek indirgeme düzeyine ulaşılar da konsantrasyon oranının yüksek olduğu deneme grubunda bu etkinin azaldığı görülmüştür. *Pseudomonas*'ın inhibisyonu üzerinde yapılan birçok çalışmaya paralel bir şekilde, in vitro yürütülen çalışmalarda ve kırmızı et uygulamalarında karanfil yağı, nisin ve bunların kombinasyonlarına ait sonuçlarda antibakteriyel aktivite olarak değerlendirilebilecek herhangi bir bulgu tespit edilememiştir. Yine karanfil yağı ve nisinin kombinasyon gruplarındaki sonuçlara bakarak toplam psikrotrof bakteri ve toplam mezofil bakteri sayıları üzerinde de etkili bir sonuca ulaşamadıklarına karar verilebilmektedir.

Karanfil yağının ve nisinin yukarıda görüldüğü gibi bazı çalışmalarda kombine edildikleri maddelerle sinerjik etkilerinin olduğu bildirilse de bu çalışmada bu iki maddenin kombinasyonunun antibakteriyel aktiviteye bir katkısı olmamıştır. Bunun ötesinde, karanfil yağı ve nisinin yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı deneme gruplarında kontrol grubuna yakın sonuçlar ile birbirlerinin etkisini azalttığı şeklinde bir sonuç çıkarılabilmektedir. Ancak, antagonistik bir etki olarak değerlendirilebilecek bu sonuca giden mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Goni ve ark. (85), antagonizmden sorumlu mekanizmalar hakkında daha az bilgi olduğunu ve daha fazla araştırmaya gereksinim duyulduğunu teyit etmektedirler.

Mikrobiyal kontrol için kullanıldıklarında uçucu yağlar gıdanın kompozisyonundan etkilenmektedirler. Bu açıdan, kompleks gıda sistemlerinde ana gıda bileşenlerinin konsantrasyonları değerlendirilerek uçucu yağların pratik

uygulamaları için yol çizilebileceği bildirilmektedir (90). Protein, yağ, nişasta, pH gibi gıdanın kimyasal ve fiziksel özellikleri doğal bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini değiştirebilmektedirler (66, 90).

Gıdaların yüksek yağ içeriği uçucu yağların uygulamalarında etkilidir. Bunun gıdanın sulu bölümleriyle karşılaştırıldığında uçucu yağların yağda çözünebilirliği nedeniyle olduğu düşünülmektedir (135). Gıdaların kompozisyonu uçucu yağın etkinliğini belirlemede önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Az yağlı peynirde % 1 oranında defne, karanfil, tarçın ve kekik uçucu yağları *L. monocytogenes*'i $\leq 1,0 \log_{10}$ kob/ml indirgemişken tam yağlı peynirde bu düzeydeki indirmeye sadece karanfil yağı ile ulaşılabilmektedir. % 0,1 oranında az yağlı peynir kadar tam yağlı peynirde de inhibisyonu belirgin olarak sağlayabilen tek yağ, karanfil yağı olarak bulunmuştur. Karanfil yağının *S. Enteritidis*'e karşı az yağlı peynire göre tam yağlıda daha etkin olduğu görülmüştür (200). Ramos-Nino ve ark. (178) anti-Listerial etkinin yüksek bir protein ve yağ içeriği olan gıdalara uygulandığında çok zayıf olarak ortaya çıktığını göstermişlerdir. Yağsız, az yağlı ve tam yağlı sosislerde *L. monocytogenes*'e karşı farklı uçucu yağların antibakteriyel etkinliklerinin incelendiği başka bir çalışmada yağsız sosiste 5 ve 10 dakika uygulama zamanlarında 1 ml/l karanfil yağı, kekik yağından daha büyük bir inhibitör etki sergilemiştir. Konsantrasyon 5 ml/l yükseldiğinde bakteriyel popülasyonda azalma daha fazla sağlansa da 10 ml/l konsantrasyonda inhibitör etkide bir artma gözlenmemiştir. Benzer sonuçlar az yağlı sosislerde de ortaya çıkmıştır, fakat tam yağlı sosislerde bakteriyel azalma daha az düzeyde olarak not edilmiştir. Bu durum, yağ ve proteinin koruyucu etkilerinin ve uçucu yağların çeşitli gıda bileşenleri ile etkileşiminin bu sonucu vermesiyle gıda sisteminde etkinlikleri azaldığı şeklinde açıklanmıştır (198).

Gıda ile laboratuvar ortamı karşılaştırıldığında azalmış su içeriği, mikrobiyal hücrede antimikrobiyal ajanların transferini güçleştirebilmektedir. Yağ kompozisyonu ve az yağlı peynirde olduğu gibi gıdanın yoğun protein içeriği uçucu yağın etkinliğinde önemlidir (200). Uçucu yağlar pH 5 ve % 2,32 şekerde daha büyük etkinlik göstermişlerdir, fakat % 5'in üzerinde şeker konsantrasyonu uçucu yağ etkinliğini olumsuz etkilememiştir (89). Basit şekerlerin ortalama düzeyleri kadar asidik pH'da yüksek protein içeren gıdalara uygulandıklarında gıda kaynaklı patojenler ve bozulma yapıcı bakterilere karşı daha etkili oldukları sonucuna

varılmıştır (89, 90). Ek olarak, uçucu yağların polar ortamlarda çözünürlüklerinin düşük olduğu, antioksidan aktivitelerinin de et gibi nispeten yüksek polar ortamlarda daha düşük düzeylerde olabileceği de düşünülmektedir (122).

Ekstraktta fenolik veya karboksilik bileşikler bulunduğunda bazen dilusyonlarda bileşiklerin pH'sının sonuçları değiştirebileceği belirtilmiştir. Sadece iyonize bileşikler aktivite değişikliği yapmaz, pH'ya bağlı olarak nötral uçucu yağların farklı etkileri de bildirilmiştir (182). Düşük pH düzeyi pH'nın direkt etkisi olarak da bakteriyel membranın lipid fazında uçucu yağların etkileri olarak da çalışabileceği bildirilmiştir (3).

Kırmızı et üzerinde karanfil yağı ve nisin'in hem tek başlarına hem de kombine kullanımlarında ilk üç günün pH değerleri, kontrol grubunun 0. gün değerlerine göre düşük olmuştur. Bu sonuç, etin pH değerine göre karanfil yağı ve nisin'in daha düşük pH değerlerine sahip olmasından kaynaklanabilmektedir. Nitekim, kontrol örnekleri başlangıç gününden itibaren düzenli olarak bir artış göstermişlerdir. Çalışmada örneklerin mikrobiyal yüklerinin artmaya başladığı 5. ve 7. günlerden itibaren de pH düzeylerinde bütün örneklerde artış görülmeye başlanmıştır. Bununla birlikte, karanfil yağının yüksek konsantrasyonlarını içeren deneme grupları (2. grup) ile karanfil yağı ve nisin'in düşük oranlarını içeren kombinasyon grupları (5. grup) diğer deneme örneklerine göre daha düşük pH değeri göstermişlerdir. Bir başka çalışmada da pH'sı 10'a ayarlanan soya proteini bazlı film çözeltisinin uygulandığı tüm kıyma örneklerinde pH'da belirgin bir yükselmeye neden olduğu bildirilmektedir. Vakum ambalajlı etlerde, soğuk depolamanın ilerleyen periyotlarında laktik asit bakterilerinin gelişmesi, üründe asiditenin artmasına, dolayısıyla pH değerinin düşmesine neden olmuştur (122). Başka bir çalışmada da depolamanın 2 ve 6. haftasından sonra antimikrobiyal uygulanmış (3:1 lizozim/ nisin (w/w)) örneklerin uygulanmayan örneklerden daha yüksek pH değerlerine sahip oldukları, fakat antimikrobiyal uygulamanın hemen sonrasında böyle bir fark olmadığı belirtilmiştir (152). Düşük pH değerlerinde *Zataria multiflora* yağı (bir çeşit kekik) ve nisin kombinasyonunun sinerjik etkisinin arttığı görülmüştür (145). Devi ve ark. (65) % 10 eugenolle yüklenmiş disklerde pH 9'da en yüksek inhibisyon zonunun gözlenmesi sonucu ortam pH'sının yükselmesi ile eugenol'ün antibakteriyel aktivitesinin yükseldiğini bildirmişlerdir. % 1 eugenol'de de pH 8,5

iken inhibisyon zonu en yüksek olarak bulunmuştur. Buradan elde edilen veriye göre, nisinin daha düşük pH'da daha aktif olarak bildirilmesi (145, 167, 195) ile karanfilin daha yüksek pH'ya sahip ortamlarda aktivitesinin yükselmesi (65), kırmızı et üzerinde yürütülen bu çalışmada, bu iki maddenin kombinasyonunu içeren deneme gruplarındaki antimikrobiyal aktivitenin azalmasına neden olan etkenlerden biri olabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada etin renginde görülen açılma, muhtemelen karanfil yağının asidik yapısından ve/veya yağın bileşimindeki aktif maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu durum, çalışmanın tekrar deneme gruplarından birinde, pH değeri daha düşük olarak ölçülen karanfil yağı ile muamele edilen örneklerde bariz olarak ortaya çıkmıştır (veriler gösterilmemiştir). Bununla birlikte karanfil konsantrasyonunun artmasıyla renk değişimi oranında bir artış gözlenmemiştir. Karanfil yağının kırmızı et üzerinde yaptığı bu etki, muhtemelen temasın ilk anında olduğu için ve etkileşim bu aşamada tamamlandığından, daha sonraki süreçte renk açılmasında bir değişiklik görülmemiştir. Ova (167)'da sürenin, antibakteriyel etki üzerinde önemli bir faktör olduğunu belirtmektedir. Kimyasal maddeler mikroorganizmalarla oldukça hızlı tepkime verebilirler ya da etkilerini bir müddet sonra gösterebilirler. Bununla birlikte, temas süresi uzadıkça koruyucunun mikroorganizmalar üzerinde daha etkili olabildiği belirtilmektedir. Karanfil uygulaması 0. dakikada kontrol grubu örnekle karşılaştırıldığında 1 log azalma sağlamıştır. 15. dakikada kontrole göre 3,5 log azalma sağlanmıştır. Bu sonuca göre karanfil yağı ve patojen arasındaki optimum temas süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. Karanfil, ilk temas ile mikrobiyal sayıda ($P < 0,05$) belirgin bir azalma sağlayarak ve inkübasyonun 20. saatinde de aktif olarak gıda endüstrisinde büyük bir teknolojik uygulama potansiyeli sergilemektedir (146). Benzer olarak, bu çalışmada da karanfil yağının gıda üzerinde antibakteriyel açıdan diğer deneme gruplarından daha fazla indirgeme yapması, uygulamanın 0. gününde değerlendirilen örneklerde görülen hafif renk açılması ve MIC deneme çalışmalarında in vitro olarak ilk yarım saatte oldukça etkili sonuçlar vermesi ani etkili olarak aktivite sergilediğini ortaya koymuştur. Antimikrobiyal aktivitenin başarısı için bunun bir avantaj olduğu söylenebilmektedir.

Uçucu yağların gıdalar ile birlikte kullanımlarındaki en önemli sorunlardan biri kattıkları güçlü kokunun yanı sıra kimi gıda bileşenleri ile reaksiyona girmeleri

nedeniyle gıdadaki organoleptik değişikliklerdir. Bunun yanında, gıdaların kimyasal bileşimi, kullanılan antioksidanlar ve koruyucular, muhafaza şartları ve ambalaj özellikleri uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkilidir (45). Şıfalı ot ve baharatların başlıca aromatik ve lezzet bileşenlerini içeren uçucu yağlar, gıda maddelerine küçük miktarda ilave edilseler de organoleptik özellikler etkilenmeden bakteriyel kontaminasyonu geciktirebilir ve bozulma etkisini azaltabilirler. Uçucu yağ ilavesinin pratik olabilmesi için duyuşal kaliteyi etkilemeksizin verimli antimikrobiyal etkilere sahip en düşük konsantrasyonunu, güvenlik ve toksisite düzeylerini bilmek gereklidir (165). Etkili olacak gerekli konsantrasyonlarda uçucu yağların kullanımı gıdanın organoleptik özelliklerinde değişikliklere karşı endişeleri artırabilir. Bu nedenle, bitki uçucu yağlarının varlığını maskeleyerek için güçlü bir aromaya sahip ürünlerin içine katılabilmektedirler. Başka bir alternatif olarak da bütün bir yağdan daha çok, en etkili aktif bileşenlerinin kullanımınıdır. Bu durumda antimikrobiyal aktivite devam ettirilirken organoleptik özellik değişiklikleri azaltılabilecektir. Bununla birlikte, herhangi bir uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi farklı bileşenler arasındaki etkileşimin bir sonucu da olabilir. Ayrıca, bütün yağa göre tek bir ajan için direnç gelişmesi daha fazla muhtemeldir (200). Bütün bunların yanında, uçucu yağların sadece koruyucu olmadığı aynı zamanda peynirler ve diğer gıda ürünleri için aroma bileşikleri olarak da değerlendirildikleri bildirilmiştir (200). Örneğin, başlangıç gününde belli belirsiz karanfil kokusu hissedilmesine rağmen periyodun devamında kokunun yoğunluğunun azaldığı bildirilen bir çalışmada, Hint mutfağında et ve et ürünlerinde yaygın olarak kullanılan karanfilin kokusu panelistler tarafından beğenilmiştir. Çalışmada karanfil ile sadece laktik asit (LA) kullanımı karanfilin güçlü kokusunu maskeleyebilmiştir (153).

Yapılan bu çalışmada da paketler ilk açıldığında keskin olmayan fakat hissedilebilir bir karanfil yağı kokusu alınmıştır. Karanfilin farklı konsantrasyonlarını içeren deneme grupları arasında koku açısından ayırıcı bir farklılık bulunamamıştır. Bu çalışmada nisinin karanfilin kokusunda artırıcı veya azaltıcı bir etkisi de görülmemiştir. Karanfil kokusunun genel olarak hoş giden bir koku olduğu ve rahatsız edecek düzeyde olmadığı bildirilmiştir. Yine de, karanfil yağı içeren deneme grupları kontrol ve nisin gruplarına göre daha düşük bir kabul edilebilirlik puanı almışlardır. Bir başka çalışmada da lizozim/ nisin kombinasyonu kullanılan

örneklerle bunların kullanılmadığı örnekler arasında duyuşal değerlendirme açısından bir farklılık bulunmamıştır, fakat işlenmiş örneklerdeki kabul edilebilirlik düzeyi işlenmemiş örneklere göre daha düşük olarak ifade edilmiştir (152). Yine, uçucu yağ ile yürütölen başka bir çalışmada, kekik yağı ve nisinin kombinasyonları denenmiş, çalışmada kullanılan kekik yağı oranları organoleptik olarak kabuledilebilir bulunmuşlar, fakat % 0,6 kekik yağı % 0,9 kekik yağına göre daha yüksek skor almıştır (86).

Genel olarak, karvakrol, eugenol ve timol gibi fenolik bileşikleri yüksek oranlarda içeren uçucu yağların gıda kaynaklı patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal özelliklerin yanı sıra yapılarındaki flavanoidler ve fenolik asitler gibi fenolik bileşenlerle ilişkili antioksidan etkilere de sahip oldukları bildirilmektedir (25, 51, 194). 50 mg/ml'den 400 mg/ml'ye kadar bütün konsantrasyonlarda karanfil uçucu ekstraktlarının radikal yakalama aktivitesinin oldukça güçlü olduğu gözlenmiştir (% 42- 83). Hekzan ekstraktının dikkat çekici bu antioksidan aktivitesinin eugenol, eugenol acetate ve thymol gibi fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonunu içermesi nedeniyle olduğu düşünölmektedir (151). Kombinasyon çalışmalarından birinde, bufalo eti dilimleri LA, LA + karanfil yağı, LA + karanfil yağı + vitamin C kombinasyonlarına daldırılarak standart floresans lambada 4 °C de izlendiğinde, kontrol ve sadece LA uygulanan örneklere göre LA + karanfil yağı ve LA + karanfil yağı + vit. C kombinasyonlarının belirgin olarak aerobik canlı, psikrotrof canlı ve koliform sayımında belirgin azalma sağladığı gözlenmiştir. LA + karanfil yağının en düşük TBARS değerleri sergilediği, LA + karanfil yağı + vit. C'nin ise diğer gruplara göre belirgin olarak renk ve kokuda gelişme ile kırmızılık ve sarılık durumlarını devam ettirdikleri belirlenmiştir. LA + karanfil yağı ve LA + karanfil yağı + vit. C'nin raf ömrünü uzatmada bir avantaja sahip olduğu görölmüştür (153).

Karanfil yağının antioksidan etkisi çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (25, 51, 81, 91, 132, 151, 194, 215). DHPP radikal yakalama aktivitesi yöntemiyle antioksidan etkinliği araştırılan bitkiler arasında en güçlü aktiviteye karanfilin sahip olduğu bildirilse de (215) karanfil yağı ve nisinin antioksidan etkinliğinin değerlendirildiği bu çalışmada, ne karanfil yağı, ne nisin ne de bunların kombinasyonları arasında antioksidan etkinlik olarak değerlendirilebilecek bir sonuç elde edilememiştir. Kırmızı et örneklerinin paketlenmesinde kullanılan çalıştığımız

bu yöntemde aktif maddelerin direkt ete temas etmeyip pedlere emdirilmesi şeklinde uygulanması, bu maddelerin veya bunların antioksidan etkili temel bileşiklerinin ette antioksidan olarak etki sergileyebilmesinin önüne geçmiş olabilir. Ancak, Kodal (122)'da model sistemde önemli ölçüde antioksidan etki sergileyen uçucu yağların gıda sistemlerinde oksidatif stabilite üzerinde aynı ölçüde yüksek aktivite göstermeyebildiklerini bildirmektedir.

Günümüzde teknolojik gelişmelerle hızlanan hayat tarzı, hazır gıdaların giderek yaygınlaşması, toplu tüketim yerlerinin çoğalması ve daha kalabalıklaşması sonucunu getirmiştir. Gıdaların patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonu ihtimalini de yükselten bu çağımız tüketim alışkanlıkları, antimikrobiyal koruma sistemlerinde birçok tekniğin çalışılmasını gerektirmektedir. Gıdanın kimyasal yapısı, bileşimi, pH'sı su aktivitesi gibi hem mikroorganizmaların hem de kullanılacak antibakteriyel etkili bileşiklerin aktivitesini etkileyen birçok faktörün aydınlatılmaya ihtiyacı vardır. Gıda sanayinde antibakteriyel etkili bitki ve baharatların kimyasal katkıların yerine teknolojik olarak kullanılabilmesi için daha birçok araştırmanın yapılması gerekmektedir. Moreira ve ark. (146) ile Tajkarimi ve ark. (211)'da çalışmalardan çıkan sonuçlara göre bütün gıda sistemlerinde aroma, kimyasal değişiklikler ve antimikrobiyal etkileri değerlendirmek ve uçucu yağları uygun gıda formülasyonları içine dahil etmek üzere, özellikle uçucu yağların kendilerinin ve bitki ekstraktlarının diğer bölümleriyle, diğer uçucu yağlar ve diğer gıda işleme teknikleri ile kombinasyonlarının gıda uygulamalarını araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu öngörmektedirler. Gıda uygulamaları konusunda hala birçok açıklanamayan ve çalışılmayan etkileşimlerin ve kombinasyonların olması gelecekte bu konuda daha yoğun çabaların harcanması gerektiğini düşündürmektedir. Hayvan veya insan hücrelerine karşı toksisite, etki mekanizmaları, in vivo etkiler, yaygın antibiyotikler vb. ile pozitif ve negatif etkileşimler içeren potansiyel birçok veriyi ortaya çıkarmak için çalışmaların sürdürülmesinin önemi vurgulanmaktadır (182). Gerek gıdada uçucu yağların antimikrobiyal etkinlik düzeyini ve onların organoleptik etkisini teyit etmek üzere (166), gerekse farmasötik alanda da yenilikçi araştırmaların gelişmesi için gelecekteki uygulamaları etkileyebilecek dezavantajları belirlemek üzere daha fazla araştırma yapmak gerektiği belirtilmektedir (18).

İn vitro olarak başarılı sonuçlar ortaya koysa da karanfilin yağının kırmızı etin raf ömrünü uzatmadaki etkinliği sınırlı olmuştur. Karanfil ile birçok madde veya uçucu yağın kombine olarak çalışılmasına rağmen, nisinle kombinasyonunu içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, bu çalışmada kombinasyon gruplarında konsantrasyonların yükselmesi ile etkinliğin azalması şeklinde ortaya çıkan sonuçlar ilginç görünmektedir. Yüzeve uygulandığı takdirde daha etkili sonuçlar verebileceği düşünülen karanfilin farklı yöntemlerle de çalışılması, yine farklı konsantrasyonların denenmesi bu konudaki bilinmeyenleri açıklığa kavuşturabilecektir. İn vitro ortamlarda başarılı olan bileşiklerin gıda sistemlerinde aynı oranda başarı gösterememelerine neden olan etkileşimlerin açıklanabilmesiyle organoleptik özellikleri değiştirmeden ve toksikolojik etkiler göstermeden en uygun oranda kullanılması sağlanabilecektir. Aynı şekilde, laboratuvar ortamında patojenlere karşı etkili olabilen bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak kullanımı üzerine farklı sonuçlar elde edilmesi neticesinde, gıda ortamında etkinliğini azaltan faktörlerin aydınlatılması için farklı gıda sistemleri ve farklı metodlarla güvenilirliğinin ortaya konması gerektiği düşünülmektedir.

5. ÖZET

Bu çalışmada, antimikrobiyal ve antioksidan etkinliğini değerlendirmek üzere karanfil yağı ve nisinin kırmızı etin raf ömrüne etkisi araştırılmıştır.

Karanfil yağının Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir. Gram pozitif bakteriler arasında % 0,7 MIC düzeyi ile *L. monocytogenes* en dirençli bakteri iken % 0,1 MIC düzeyi ile *B. thermosphacta* en hassas bakteri olarak ortaya çıkmıştır. Gram negatif bakteriler arasında *Y. enterocolitica 03-09* % 0,14 MIC düzeyi ile en hassas, *P. aeruginosa* en dirençli bakteri olmuştur. Nisin, Gram negatif bakterilerin hiçbirinde antibakteriyel etki sergilememiştir. Nisinin etkisine karşı Gram pozitif *M. luteus* hassas, *S. aureus* dirençli olarak bulunmuştur.

Kırmızı et üzerinde karanfil yağı ve nisinin tek başlarına ve kombine edilerek emici pedlere püskürtülmesi yoluyla antimikrobiyal etkinlikleri denenmiştir. İn vitro olarak başarılı sonuçlar ortaya koysa da karanfil yağının kırmızı etin raf ömrünü uzatmadaki etkinliği sınırlı olmuştur. Genel olarak, karanfil yağı tek başına istatistiksel bir fark yaratmasa da kombine kullanımlardan ve nisinden daha etkili olmuştur. Karanfil yağının Muhtemel koliform ve *Enterobacteriaceae* sayılarını indirgemedede bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. LAB sayılarında bütün deneme grupları kontrole göre daha yüksek indirgeme düzeyine sahip olmuşlardır. Konsantrasyonların yükselmesi ile etkinliğin azalması şeklinde ortaya çıkan sonuçlar antagonistik bir etkileşime işaret etmektedir.

Çalışmada tek ve kombine karanfil yağı içeren grupların antioksidan etkinliğinin diğer gruplarından daha yüksek olduğunu gösteren bir sonuca ulaşamamıştır. Buna göre, aktif maddeler veya bunların antioksidan etkili temel bileşiklerinin direkt ete temas etmediği için antioksidan etki sergileyemedikleri düşünülmüştür. Karanfil yağı ile birçok maddenin kombinasyonu çalışılmasına rağmen nisinle kombinasyonunu içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Karanfil yağı ve nisin kombinasyonunun farklı yöntemler ve farklı konsantrasyonlarda denenmesi bu konudaki bilinmeyenleri açıklığa kavuşturabilecektir.

Anahtar sözcükler: Karanfil Yağı, Nisin, Kırmızı Et, Antimikrobiyal Etki, Antioksidan Aktivite.

6. SUMMARY

In this study, in order to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of clove and nisin, have been used to determine their effect on the shelf life of red meat.

It has been determined that clove oil can be active on a broad spectrum of Gram positive and negative bacteria. Among the tested Gram positive bacteria, while with a MIC level of 0.7 %, *L. monocytogenes* was the most resistant bacteria, with the MIC level of 0.1 %, *B. thermosphacta* has emerged as the sensitive bacteria. Among the Gram negative bacteria, *Y. enterocolitica 03-09* with the MIC level of 0.14 % was the most sensitive, *P. aeruginosa* was the most resistant bacteria. Nisin hasn't shown any antibacterial effect on the Gram negativ bacteria. It was found to be that Gram positive *M. luteus* was sensitive, *S. aureus* was resistant against the effect nisin.

Antimicrobial effects of clove oil and nisin, alone and in combination were tested by use of spraying them on absorbent pads on the red meat. While in vitro, clove oil has shown success in prolonging the shelf life of red meat, it has only displayed limited efficacy. In general, even though the use of clove oil alone does not make a statistical difference, it was more effective than their combinations or nisin. It has been observed that clove oil has a potential in reducing the number of Possible *Coliform* and *Enterobacteriaceae*. All test groups have a higher level of reduction concerning the number of LAB, than the control group. With the rise of concentrations that has resulted reduction of the activity results indicate an antagonistic interaction.

In the study, no conclusion has been reached, that indicates the antioxidant activity of single and combined groups containing clove oil to be any higher than in other experimental groups. According to this result, it has been considered that the active substances or their antioxidant basic compounds might have not been displayed an antioxidant effect, because they did not directly contact the meat. Even if there have been many studies about clove oil and its combinations with many substances, there hasn't been one with nisin yet. Testing of different methods and

different concentrations of clove oil and nisin combinations have will be explained the mysteries of this issue.

Key Words: Clove Oil, Nisin, Red Meat, Antimicrobial Effect, Antioxidant Activity.

7. KAYNAKLAR

1. **Abdel-Wahhab, M. A., Aly, S. E.:** Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. J. Appl. Toxicol., 25 (3): 218- 223, 2005.
2. **Abee, T., Krockel, L., Hill, C.:** Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int. J. Food Microbiology, 28, 169- 185, 1995.
3. **Abou-taleb, M., Kawai, Y.:** Shelf life of semi fried tuna slices coated with essential oil compounds after treatment with anodic electrolyzed NaCl solution. J. Food Protect., 71(4), 770- 774, 2008.
4. **Adams, R. P.:** Identification of essential oil components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured, Carol Stream, IL, USA. 2004.
5. **Agbaje, E. O.:** Gastrointestinal effects of *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry (Myrtaceae) in animal models. Nigerian Quarterly J. Hospital Medicine, 18, (3), 137- 141, 2008.
6. **Ağaoğlu, S., Dostbil, N., Alemdar, S.:** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. B. Vet. I. Pulawy, 51, 53– 57, 2007.
7. **Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, İ., Doğan, H. B., Gürgün, V., Halkman, A. K., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D. F., Tunail, N., Tükel, Ç:** Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 2000.
8. **Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M.:** Bakteriyosinler: Alternatif gıda koruyucuları. Erciyes Üniv., Fen Bil. Enstitüsü Dergisi, 25, (1- 2), 59- 70, 2009.
9. **Akkuş, İ.:** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Sağlık Dizisi: 5, 13- 46, Mimoza Yayınları 38, Konya, 1995.
10. **Akman, N., Aksoy, F., Kaya, Ç. Y., Şahin, O., Erdoğan, G.:** Türkiye’de hayvansal ürünler üretimi, 15- 22 **Akman, N.:** (Editör) Cumhuriyetimizin 100.

yılında Türkiye'nin hayvansal üretimi. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği yayınları No: 4, 2006.

11. **Aksoy, A.:** Bazı bitki ekstraktlarının kanatlı etlerinin raf ömrü üzerine etkisinin araştırılması. Kafkas Üniv., Sağlık Bil. Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kars, 2010.
12. **Aksu, M. İ., Kaya, M.:** The effect of α -tocopherol and butylated hydroxyanisole on the colour properties and lipid oxidation of kavurma, a cooked meat product. *Meat Science* 71: 277– 283, 2005.
13. **Altınışık, M.:** Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Erişim adresi: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>, Erişim tarihi: 22.11.2010.
14. **Altuğ, T. ve Elmacı, Y.:** Gıdalarda doğal olarak bulunan lezzet bileşenleri, 497- 528, **Saldamlı İ.:** (Editör) Gıda kimyası. Hacettepe Üniv. yayınları, Ankara, 2007.
15. **Altuntaş, M.:** Dünden bugüne Türkiye hayvancılığı ve et sorunu. Erişim adresi: http://mustafa_altuntas.herkez.com, Erişim Tarihi: 30.01.2011.
16. **Antolinos, V., Muñoz, M., Ros-Chumillas, M., Aznar, A., Periago, P. M., Fernández, P. S.:** Combined effect of lysozyme and nisin at different incubation temperature and mild heat treatment on the probability of time to growth of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*, 28, 2, 305- 310, 2011.
17. **Appendini, P., Hotchkiss, J. H.:** Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 113- 126, 2002.
18. **Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., Pena, T. C. V.:** Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci.Tech.*, 20, 146- 154, 2009.
19. **Arora, D. S., Kaur, J.:** Antimicrobial activity of spices. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 12: 257- 262, 1999.
20. **Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., Medina, M.:** Inactivation of gram negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *Eur. Food Res. Technol.*, 227, (1), 77– 82, 2008.
21. **Aslan, A.:** Et muayenesi ve et ürünleri teknolojisi, Medipres matbaacılık yayıncılık medikal veterinerlik hiz. hayvansal ürünler Tic. ve Paz. LTD. ŞTİ. Elazığ, 2002.

22. **Awuah, R. T., Ellis, W. O.:** Effects of some groundnut packaging methods and protection with *Ocimum* and *syzygium* powders on kernel infection by fungi. *Mycopathologia*. 154 (1): 29- 36, 2002.
23. **Ayana, B., Turhan, K. N.:** Gıda ambalajlamasında antimikrobiyal madde içeren yenilebilir filmler/ kaplamalar ve uygulamaları, *Gıda*, 35, (2), 151-158, 2010.
24. **Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M.:** Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114- 129, 2008.
25. **Ayoola, G. A., Lawore, F. M., Adelowotan, T., Aibinu, I. E., Adenipekun, E., Coker, H. A. B., Odugbemi, T. O.:** Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *Afr. J. Microbiol. Res.*, Vol. (2), 162- 166, 2008.
26. **Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., Debevere, J.:** Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J. Food Protect.*, 66, (4), 668- 673, 2003.
27. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.:** Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446- 475, 2008.
28. **Bandoniene, D., Venskutonis, P. R., Gruzdiene, D., Murkovic, M.:** Antioxidative activity of sage (*Salvina officinalis L.*) savory (*Satureja hortensis L.*) and borage (*Borage officinalis L.*) extracts in rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 286- 292, 2002.
29. **Banerjee, M., Sarkar, P. K.:** Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. *Food Microbiology*, 21, 335- 342, 2004.
30. **Banerjee, S., Das, S.:** Anticarcinogenic effects of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer P.*, 6 (3), 304- 308, 2005.
31. **Banerjee, S., Panda, C. K., Das, S.:** Clove (*Syzygium aromaticum L.*), a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis*, 27, (8), 1645- 1654, 2006.
32. **Bartosz, G.:** Oxidative stres in plants. *Acta Physiol. Plant.*, 19, 47- 64. 1997.

33. **Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G.:** Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch. Int. Med.* 161, 2573- 2578, 2001.
34. **Besli, G. E., Ergüven, M.:** Çocuklarda Besin ve Mantar Zehirlenmeleri. *Çocuk Enf. Dergisi*, 3, 126- 131, 2009.
35. **Betoni, J. E., Mantovani, R. P., Barbosa, L. N., Di Stasi, L. C., Fernandes Junior, A.:** Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 101 (4), 387- 390, 2006.
36. **Blaszyk, M. ve Holley, R. A.:** Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Int. J. Food Microbiology*, 39, 175- 183, 1998.
37. **Bluma, R. V., Etcheverry, M. G.:** Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25 (2), 324- 334, 2008.
38. **Bórnez, R., Linares, M. B., Vergara, H.:** Microbial quality and lipid oxidation of Manchega breed suckling lamb meat: Effect of stunning method and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 83, 383- 389, 2009.
39. **Brandi, G., Amagliani, G., Schiavano, G. F., De Santi, M., Sisti, M.:** Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protect.*, 69 (9), 2274- 2279, 2006.
40. **Branen, J. K., Davidson P. M.:** Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by Ethylenediaminetetra acetic acid and lactoferrin. *Int. J. Food Microbiology*, 90, 63- 74, 2004.
41. **Breukink, E., De Kruijff, B.:** The lantibiotic nisin, a special case or not?, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 223- 234, 1999.
42. **Brody, A. L., Strupinsky, E. R., Kline, L. R.:** In active packaging for food application. Lancaster; Pennsylvania: Technomic Publishing Co. 2001.
43. **Brul, S., Coote, P.:** Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiology*, 50, 1- 17, 1999.
44. **Burak, M., Çimen, Y.:** Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 5, 296- 304, 1999.

45. **Burt S.:** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int. J. Food Microbiology*, 94, 223- 253, 2004.
46. **Burt, S. A., Reinders, R. D.:** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiology*, 36 (3), 162-167, 2003.
47. **Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L.:** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Bio. Med.* 22 (5), 749- 760, 1997.
48. **Caplice, E., Fitzgerald, G. F.:** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131- 149, 1999.
49. **Cevger, Y., Yalçın, C., Aral, Y.:** Türkiye’de hayvansal üretimde gıda güvencesi. *Veteriner Hekimler Derneği Derg.*, 77, 2, 6- 11, 2006.
50. **Ceylan, E., Fung, D. Y. C.:** Antimicrobial activity of spices. *J. Rapid Meth. Aut. Mic.*, 12 (1), 1- 55, 2004.
51. **Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A.:** The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Res.*, 21 (6), 501- 506, 2007.
52. **Chen, H., Hoover, D. G.:** Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety.*, 2, 81- 100, 2003.
53. **Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., Hernandez, P. E.:** Review: Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7 (4), 281- 305, 2001.
54. **Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L.:** Bacteriocins: safe, naturel antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiology*, 71, 1- 20, 2001.
55. **Coma, V.:** Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90- 103, 2008.
56. **Coşkun, T.:** Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg.*, 48, 69- 84, 2005.

57. **Crandall, A. D., Montville, T. J.:** Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. Appl. Environ. Microb., 64 (1), 231-237, 1998.
58. **Çakmakçı, S., Çelik, İ.:** Gıda katkı maddeleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notu No: 164, Erzurum, 62, 1995.
59. **Çapraz, İ.:** Kırmızı et sektör profili. İstanbul Ticaret Odası Etüt ve Araştırma Şubesi, 1- 32, 2004.
60. **Çelikel F. G., Penekli, M. Tan, E., Biricik, F., Kılınç, A., Şentürk, B. Göksel, Z., Gültekin, R., Özenir, A., Günşen, U.:** Gıdaların bozulma nedenleri, 27- 34, **Çelikel F. G.:** (Editör), Gıda üretimi ve muhafazası teknolojileri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü yaygın çiftçi eğitimi projesi, Yayçep. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı yayıncı dairesi başkanlığı matbaası, 2006.
61. **Davidson, P. M., Parish, M. E.:** Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Tech., 1, 148- 155, 1989.
62. **Davies, E. A., Bevis, H. E., Delves-Broughton, J.:** The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta type cheeses to control the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol., 24, 343- 346, 1997.
63. **De Vuyst L., Leroy F.:** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification and food applications. J. Mol. Microb. Biotech., 13, 194- 199, 2007.
64. **Delves- Broughton, J.:** Nisin as a food preservative. Food Australia, 57 (12), 525- 527, 2005.
65. **Devi, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., Pandian, S. K.:** Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. J. Ethnopharmacol., 130 (1), 107- 115, 2010.
66. **Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J.:** New preservation technologies: Possibilities and limitations. Int. Dairy J., 14, 273- 285, 2004.
67. **Dicks, L. M. T., Mellett, F. D., Hoffman, L. C.:** Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. Meat Science, 66, 703- 708, 2004.

68. **Dorman, H. J. D., Deans, S. G.:** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J. Appl. Microbiology*, 88, 308- 316, 2000.
69. **Duman Aydın, B.:** Bazı tıbbi bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 14, (1), 83-87, 2008.
70. **Duong, D. Q., Crandall, P. G., Pohlman, F. W., O'Bryan, C. A., Balentine, C. W., Castillo, A.:** Improving ground beef safety and stabilizing color during irradiation using antioxidants, reductants or TSP. *Meat Science*, 78: 359- 368, 2008.
71. **Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., Dobroslava, B.:** Essential oils- their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in Vitro*, 20, 1435- 1445, 2006.
72. **Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., Savvaidis, I. N.:** Nisin- EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chem.*, 114, 147- 1476, 2009.
73. **Edris, A. E.:** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A Review. *Phytother. Res.*, 21 (4), 308-323, 2007.
74. **Ehrich, J., Bauermann, U., Thomann, R.:** Antimicrobial effect of CO₂ spice extracts from summer savory to cinnamon. *Lebensmitteltechnik*, 27 (11), 51-53, 1995.
75. **El-Khateib, T., Ahmed, S. H., Makboul, M. A.:** Trials for increasing keeping quality of Egyptian minced meat "koefte" and "kaebap" by spice extracts. *Proceedings International Congress of Meat Science and Technology* 35 (2), 486-497, 1989.
76. **Elmacı, Y.:** Lezzet maddeleri, 139- 166, **Altuğ T.:** (Editör) Gıda katkı maddeleri. Meta basım matbaacılık, İzmir, 2006.
77. **Ercoşkun, H., Işıksal, S., Kıralan, M.:** Fermente et ürünlerinde lipid reaksiyonları, *Gıda Mühendisliği Derg.*, 18, Erişim adresi: http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/5fc093c0ee742f6_ek.pdf?dergi=18, Erişim tarihi 30.01.2011.

78. **Erol İ.:** Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi. Pozitif matbaacılık, Ankara, 2007.
79. **Fadda, S., López, C., Vignolo, G.:** Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*, 86, 66- 79, 2010.
80. **Fang, T. J., Lin, L. W.:** Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on Cooked Pork in a Modified Atmosphere Packaging/Nisin Combination System. *J. Food Protect*, 57 (6), 479- 485, 1994.
81. **Feredioon, S., Janitha, P. K., Wanasundara P. D.:** Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutritions*. 32 (1), 67- 103, 1992.
82. **Fernández, P. P., Sanz, P. D., Molina-García, A. D., Otero, L., Guignon, B., Vaudagna, S. R.:** Conventional freezing plus high pressure–low temperature treatment: Physical properties, microbial quality and storage stability of beef meat. *Meat Science*, 77, 616- 625, 2007.
83. **Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T.:** Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother. Res.*, 21(10), 989- 994, 2007.
84. **Gill, A. O., Holley, R. A.:** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *Int. J. Food Microbiology*, 80, 251- 259, 2003.
85. **Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., Nerin, C.:** Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.*, 116, 982- 989, 2009.
86. **Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P. S.:** The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiology*, 137, 175- 180, 2010.
87. **Gupta, C., Garg, A. P., Uniyal, R. C. Kumari, A.:** Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2, 258- 261, 2008.
88. **Gurib-Fakim, A.:** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects. Med.*, 27, 1- 93, 2006.

89. **Gutierrez, J., Barry- Ryan, C., Bourke, P.:** Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 142- 150, 2009.
90. **Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P.:** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiology*, 124 (1), 91- 97, 2008.
91. **Gülçin, İ., Şat, İ. G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö. İ.:** Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem*, 87, 3, 393- 400, 2004.
92. **Gür, E. ve Altuğ, T.:** Antioksidanlar, 17- 38, **Altuğ T.:** (Editör) Gıda katkı maddeleri, Meta basım matbaacılık, İzmir, 2006.
93. **Güven, A., Gülmez, M.:** Fonksiyonel gıdalar ve sağlıkla ilişkisi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 12 (1), 91- 96, 2006.
94. **Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V.:** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, 985- 990, 1999.
95. **Hampikyan, H., Çolak. H.:** Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6, (2), 142- 147, 2007.
96. **Hampikyan, H., Uğur, M.:** The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). *Meat Science*, 76, 327- 332, 2007.
97. **Harrigan, W. F.:** Laboratory methods in food microbiology. Third edition, Academic press. California, USA, 1998.
98. **Hemaiswarya, S. Doble, M.:** Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 16, 997- 1005, 2009.
99. **Holley, R. A., Patel, D.:** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.*, 22, 273- 292, 2005.
100. **Holzappel, W. H., Geisen, R., Schillinger, U.:** Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol*, 24, (3), 343- 362, 1995.
101. **Holzappel, W. H.:** Culture media for non-sporulating Gram- positive food spoilage bacteria, 89- 94, **Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., Baird, R. M.:**

- (Editörler) Culture media for food microbiology, progress in industrial microbiology, volume 34, Amsterdam, 1999.
- 102. Hugas, M.:** Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat product. *Meat Science*, 49 (1), 139- 150, 1998.
- 103. İnternet Materyali:** <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/012/k0827e02.pdf> Report of the Independent External Evaluation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2007. Erişim tarihi 30.01.2011.
- 104. İnternet Materyali:** http://www.abgs.gov.tr/files/tarama/screening_files/12/ch_12_tarama_sonu_raporu_tr.pdf Tarama Raporu, Türkiye: 12. Fasıl- Gıda Güvenliği, Hayvan ve Bitki Sağlığı Politikası, 2007, Erişim tarihi 30.11.2011.
- 105. İnternet Materyali:** <http://www.bdb.hacettepe.edu.tr/torehberi.pdf> Türkiye'ye özgü beslenme rehberi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü- Hacettepe Üniv., beslenme ve diyetetik bölümü, Ankara, 2004, Erişim tarihi 30.11.2011.
- 106. İnternet Materyali:** <http://www.ebk.gov.tr/database/attachment/dfb22994.pdf> 2009 yılı sektör değerlendirme raporu EBK, Erişim tarihi 30.11.2011.
- 107. İnternet Materyali:** <http://www.ikv.org.tr/pdfs/403396fb.pdf> Avrupa Birliği müktesebatı ve gıda sektörü raporu İKV No: 209, 2007, Erişim tarihi 30.11.2011.
- 108. İnternet Materyali:** <http://www.tuik.gov.tr/> Erişim tarihi 30.11.2011.
- 109. İnternet Materyali:** http://www.tzob.org.tr/tzob_web/rapor.htm Türkiye Ziraat Odaları Birliği, Türkiye kırmızı et sektör değerlendirmesi 2008 yılı ve sonrası beklentiler, Erişim tarihi 30.11.2011.
- 110. Jamuna, M., Jeevaratnam, K.:** Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50 (2): 79- 90, 2004.
- 111. Jay, J. M.:** *Modern food microbiology*, Sixth Edition, Gaithersburg, Maryland, 2000.
- 112. Jayathilakan, K., Sharma, G. K., Radhakrishna, K., Bawa, A. S.:** Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chem.*, 105, 908- 916, 2007.

113. **Jongjareonrak, A., Benjakul, B., Visessanguan, W., Tanaka, M.:** Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 22, 449- 458, 2008.
114. **Juliani, H. R., Kapteyn, J., Jones, D., Koroch, A. R., Wang, M., Charles, D., Simon, J. E.:** Application of near-infrared spectroscopy in quality control and determination of adulteration of African essential oils. *Phytochem Analysis*, 17 (2), 121- 128, 2006.
115. **Kalemba, D., Kunica A.:** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10 (10), 813- 829, 2003.
116. **Kanatt, S. R., Chander, R., Sharma, A.:** Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.*, 100, 451- 458, 2007.
117. **Kayahan, M.:** Lipidler, 133- 219, **Saldamlı İ.:** (Editör) Gıda kimyası, Hacettepe Üniv. yayınları, Ankara, 2007.
118. **Kerry, J. P., O'Grady, M. N., Hogan, S. A.:** Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74, 113- 130, 2006.
119. **Kılıç, B.:** Current trends in traditional Turkish meat products and cuisine, *Review. LWT - Food Science and Technology*, 42, 1581- 1589, 2009.
120. **Klaenhammer, T. R.:** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337- 349, 1988.
121. **Koçak, S.:** Mayonezde mikrobiyolojik raf ömrü, Ankara Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006.
122. **Kodal, B.:** Antioksidan özellikteki yenilebilir filmlerin sığır kıymasının oksidatif stabilitesine etkileri, Ankara Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2008.
123. **Kolsarıcı, N., Güven, T.:** Sıvı tütsü kullanımının Frankfurter Sosislerin depolama stabilitesine etkisi, *Turk. J. Vet. Anim. Sic.*, 22, 379- 388, 1998.
124. **Kurt, A.:** Süt teknolojisi. Atatürk Üniv. yayınları No: 573, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 257, Ders kitapları Serisi No: 40, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi ofset tesisi, Erzurum, 1996.

125. **Kutlu, H. R., Gül, A., Görgülü, M.:** Türkiye hayvancılığı; hedef 2023-sorunlar, çözüm yolları ve politika arayışları, Çukurova Üniv., Adana, 6- 18, 2003.
126. **Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P.:** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.*, 46, 244- 282, 2007.
127. **Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E.:** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiology*, 91(3), 453- 462, 2001.
128. **Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardin, F.:** Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sc. Tech.*, 15 (3- 4), 201- 208. 2004.
129. **Lebert, I., Leroy, S., Talon, R.:** Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiology*, 24, 281- 287, 2007.
130. **Lee, C. H., An, D. S., Lee, S. C., Park, H. J. Lee, D. S.:** A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *J. Food Eng.*, 62 (4), 323- 329, 2004.
131. **Lee, K-G, Shibamoto, T. (a):** Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem.*, 74, 443- 448, 2001.
132. **Lee, K-G., Shibamoto, T. (b):** Inhibition of malonaldehyde formation from lipid plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. *Food Chem. Toxicol.* 39 (12), 1199- 1204, 2001.
133. **Li, A., Zhu, Y., He, X., Tian, X., Xu, L., Ni, W.:** Evaluation of antimicrobial activity of certain Chinese plants used in folkloric medicine. *World J. Microbiol. Biotech.*, 24, (4), 569- 572, 2008.
134. **Lightfoot, N. F., Maier, E. A.:** Microbiological analysis of food and water: guidelines for quality assurance. Third impression, The Netherlands, 2003.

135. **Lis-Balchin, M., Steyrl, H., Krenn, E.:** The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. *Phytother. Res.*, 17, 60- 65, 2003.
136. **Lopaczynski, W., Zeisel, S. H.:** Antioxidants, programmed cell death and cancer. *Nutr. Res.*, 21, 295- 307, 2001.
137. **López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C.:** Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem.* 24;53 (17), 6939-6946, 2005.
138. **Lund, M. N., Hviid, M. S., Skibsted, L. H.:**The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, 76, 226- 233, 2007.
139. **Mahmutoğlu, T.:** Gıda endüstrisinde ‘güvenli gıda üretmek’. ODTÜ geliştirme vakfı yayıncılık ve iletişim A.Ş. yayınları, ODTÜ Yayıncılık, 2007.
140. **Mangalassary, S., Han, I., Rieck, J., Acton, J., Dawson, P.:** Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization for control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna during refrigerated storage. *Food Microbiol.*, 25, 866- 870, 2008.
141. **Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M.:** Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiology*, 107, 180–185, 2006.
142. **Mc Carthy, T., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., Buckley, D. J.:** Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, 57, 177- 184, 2001.
143. **Mielnik, M. B., Aaby, K., Skrede, G.:** Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*, 65, 1147- 1155, 2003.
144. **Miladi, H., Chaieb, C., Ammar, E., Bakhrouf, A.:** Inhibitory effect of clove oil (*Syzyium aromaticum*) against *Listeria monocytogenes* cells incubated in fresh-cut salmon. *J. Food Safety*, 30, 432- 442, 2010.
145. **Misaghi, A., Basti, A. A.:** Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control*, 18, 1043- 1049, 2007.

146. **Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E. Roura, S. I.:** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 38, 565-570, 2005.
147. **Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., Parajo, J. C.:** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 72, 145- 171, 2001.
148. **Mytle, N., Anderson, G. L., Doyle, M. P. Smith, M. A.:** Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control*, 17, 102- 107, 2006.
149. **Namiki, M.:** Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, 29, 273- 300, 1990.
150. **Namlı, A.:** Kahramanmaraş ilinde tüketime sunulan kıymalarda hareketli *Aeromonas* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu. T.C. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2007.
151. **Nassar, M. I., Gaara, A. H., El-Ghorab, A. H., Farrag, A. H., Shen, H., Huq, E., Mabry, T. J.:** Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum*, fam. myrtaceae) and their antioxidant activity. *Rev. Latinoamer. Quím.* 35/3, 2007.
152. **Nattress, F. M., Baker, L. P.:** Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork, *Int. J. Food Microbiology*, 85, 259- 267, 2003.
153. **Naveena, B. M., Muthukumar, M., Sen, A. R., Babji, Y., Murthy, T. R. K.:** Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *Meat Science*, 74, 409- 415, 2006.
154. **Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L., Dubois-Brissonnet, F.:** Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect?. *Food Microbiol.*, 22, 391-398, 2005.
155. **Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J.:** Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20, 157- 160, 2009.

156. **Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joerger, R. D., Hicks, D. T., Hoover, D. G.:** Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold- smoked salmon, *Int. J. Food Microbiology*, 122, 8- 15, 2008.
157. **Nguyen, V. T., Gidley, M. J. Dykes, G. A.:** Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiol.*, 25, 471- 478, 2008.
158. **Ninfali, P.; Mea, G.; Giorgini, S.; Rocchi, M.; Bacchiocca, M.:** Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressing relevant to nutrition. *Brit. J. Nutr.*, 93, 257- 266, 2005.
159. **Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Germano, M. P., Alonzo, V.:** Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 17, 517- 520, 2001.
160. **Oiye, S. O. ve Muroki, N. M.:** Use of Spices in Foods. *The Journal of Food Technology in Africa*, 7, 2, 39- 44, 2002.
161. **Oral, N., Vatansever, L., Güven, A., Gülmez, M.:** Antibacterial activity of some Turkish plant hydrosols. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 14 (2), 205- 209, 2008.
162. **Oral, N., Vatansever, L., Sezer, Ç., Aydın, B., Güven, A., Gülmez, M., Başer, K. H. C., Kürkcüoğlu, M.:** Effect of absorbent pads containing oregano essential oil on the shelf life extension of overwrap packed chicken drumsticks stored at four degrees celsius. *Poultry Sci.* 85, 1466- 1471, 2009.
163. **Ouattara, B. R., Simard, E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., Bègin, A.:** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiology*, 37, 155- 162, 1997.
164. **Ouattara, B., Giroux, M., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Borsa, J., Lacroix, M.:** Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by gamma irradiation, food additives and edible coating film. *Radiat. Phys. Chem.*, 63, 299- 304, 2002.
165. **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M.:** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73, 236- 244, 2006.

166. **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M.:** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18 (5), 414- 420, 2007.
167. **Ova, G.:** Koruyucular, 105- 134, **Altuğ T.:** (Editör) Gıda katkı maddeleri, Meta basım matbaacılık, İzmir, 2006.
168. **Özaslan, A.:** Adana içme suyunda fekal koliform düzeyinin belirlenmesi ve antibiyotik dirençlilik frekansı, Çukurova Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2009.
169. **Özen, N., Şayan, Y., Ak, İ., Yurtman, İ. Y., Polat, M.:** Hayvansal üretim-çevre ilişkileri ve organik hayvancılık. <http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/> Erişim Tarihi: 30.01.2011).
170. **Palaniappan, K., Holley, R. A.:** Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria, *Int. J. Food Microbiology*, 140, 164- 168, 2010.
171. **Pawar, V. C., Thaker, V. S.:** In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*. 49 (4), 316- 323, 2006.
172. **Periago, P. M., Moezelaar, R.:** Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*, *Int. J. Food Microbiology*, 68, 141- 148, 2001.
173. **Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L.:** Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species, *J. Med. Microbiol.* 58 (11), 1454- 1462, 2009.
174. **Ponce, A. G., Roura, S. I., Del Valle, C. E., Moreira, M. R.:** Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biol. Tech.*, 49 (2), 294- 300, 2008.
175. **Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S.:** *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complem. Altern. Medicine*, 6, 39- 47, 2006.

176. Prasad, R. C., Herzog, B., Boone, B., Sims, L., Waltner-Law, M.: An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 4, 96(1- 2), 295- 301, 2005.
177. Prashar, A., Locke, I. C., Evans, C. S.: Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferat.* 39 (4), 241- 248, 2006.
178. Ramos-Nino, M. E., Clifford, M. N., Adams, M. R.: Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 303- 310, 1996.
179. Rayman, M. K., Aris, B., Hurst, A.: Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 (2), 375- 80, 1981.
180. Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R.: Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an Overview. *Forsch Komplementmed*, 16, 79- 90, 2009.
181. Riley M. A., Wertz J. E.: Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117- 137, 2002.
182. Rios, J. L., Recio, M. C.: Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology* , 100, 80- 84, 2005.
183. Rodríguez, A., Batlle, R., Nerín, C.: The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Prog. Org. Coat.*, 60, 33- 38, 2007.
184. Rossi L. M., Rangasamy P., Zhang J., Qiu X. Q., Wu G. Y.: Research advances in the development of peptide antibiotics. *J. Pharm. Sciences*, 97 (3), 1060- 1070, 2008.
185. Ruiz, J. A., Guerreo, L., Arnau, J., Guardia, M. D., Esteve-Garcia, E.: Descriptive sensory analysis of meat from broilers fed diets containing vitamin E or β - carotene as antioxidants and different supplemental fats. *Poultry Sci.* 80, 976- 982, 2001.
186. Saeed, S., Tariq, P.: *In vitro* antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. *Pakistan J. Bot.*, 40 (5), 2157- 2160, 2008.

187. **Saito, K., Kohno, M., Yoshizaki, F., Niwano, Y.:** Extensive screening for edible herbal extracts with potent scavenging activity against superoxide anions. *Plant Foods Hum Nutr.*, 63 (2), 65- 70, 2008.
188. **Saldamlı, İ., Uygun, Ü.:** Gıda katkı maddeleri, 533- 576, **Saldamlı İ.:** (Editör) Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi yayınları, Ankara, 2007.
189. **Sallam, K. I., Ishioroshi, M., Samejima, K.:** Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 37, 849- 855, 2004.
190. **Sanchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltran, J.A., Roncales, P.:** The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58, 421- 429, 2001.
191. **Sarıkuş, G.:** Farklı antimikrobiyal maddeler içeren yenilebilir Film üretimi ve kaşar peynirinin muhafazasında mikrobiyal inaktivasyona etkisi, Süleyman Demirel Üniv., Fen Bil. Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2006.
192. **Sebranek, J. G., Bacus, J. N.:** Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. *Meat Science* 77, 136- 147, 2007.
193. **Severina, E., Severin, A., Tomasz, A.:** Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41, 341–347, 1998.
194. **Seydim, A. C., Sarıkuş, G.:** Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. Int.*, 39 (5), 639- 644, 2006.
195. **Sezer, Ç.:** Gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerinin araştırılması. Kafkas Üniv., Sağlık Bil. Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kars, 2007.
196. **Shan, B., Cai, Y-Z., Brooks, J. D., Corke, H.:** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiology*, 117, 112- 119, 2007.
197. **Shelef, L. A.:** Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety*, 6, 29- 44, 1983.

198. **Singh, A., Singh, R. K., Bhunia A. K., Singh, N.:** Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 36, 787- 794, 2003.
199. **Sit, C. S., Vederas, J. C.:** Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bactericins. *Biochem. .Cell Biol.*, 86, 116- 123, 2008.
200. **Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L.:** The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.*, 18, 463- 470, 2001.
201. **Sofia, P. K., Prasad, R., Vijay, V. K., Srivastava, A. K.:** Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common food borne pathogens. *Int. J. Food Science and Technology*, 42, 910- 915, 2007.
202. **Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P. M., Johnson, E. A.:** Naturally occurring antimicrobials in food, Interpretive Summary. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 28, 71- 72, 1998.
203. **Sofos, J. N., Geornaras, I.:** Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86, 2- 14, 2010.
204. **Solomakos, N., Govaris, A. Koidis, P., Botsoglou, N. (a):** The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80, 159- 166, 2008.
205. **Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. (b):** The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol.*, 25, 120- 127, 2008.
206. **Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T.:** Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Res.*, 579, 200- 213, 2005.
207. **Srinivasan, K.:** Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. *Food Rev. Int.*, 21, 167- 188, 2005.

- 208. Srivastava, K. C.:** Antiplatelet principles from a food spice clove (*Syzygium aromaticum* L.) Prostag. Leukotr. Ess., 48 (5), 363- 372, 1993.
- 209. Stiles, M. E.:** Biopreservation by lactic acid bacteria. Review. Antonie Van Leeuwenhoek., 70, (2- 4), 331- 345, 1996.
- 210. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı:** Ulusal gıda ve beslenme stratejisi çalışma grubu raporu, (Ulusal gıda ve beslenme eylem planı, I. aşama çalışması eki ile). İktisadi Sektörler ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü, DPT Yayın No: 2670, 2003, Erişim tarihi 30.01.2011.
- 211. Tajkarimi., M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O.:** Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21, 1199- 1218, 2010.
- 212. Tanko, Y., Mohammed, A., Okasha, M. A., Umar, A. H., Magaji, R. A.:** Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol extract of *syzygium aromaticum* flower bud in Wistar rats and mice. Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med., 22, 5 (2), 209- 212, 2008.
- 213. Temiz, A.:** Enzimler, 287- 294, **Saldamlı İ.:** (Editör) Gıda kimyası. Hacettepe Üniv.yayımları, Ankara, 2007.
- 214. Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C.:** Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus subtilis*. J. Food Protect., 52 (6), 399- 403, 1989.
- 215. Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., Saija, A.:** Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. Food Chem., 89, 549- 554, 2005.
- 216. Topal R. Ş.:** Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji. Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul, 2006.
- 217. Torlak, E.:** Doğal antimikrobiyal maddeler ile hazırlanan yenilebilir ve kaplanmış plastik filmlerin gıda kaynaklı bazı patojenlere etkileri. Selcuk Üniv., Sağlık Bil. Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya, 2009.
- 218. Trindade, R. A., Lima, A. Andrade-Wartha, E. R., Oliveira e Silva, A. M., Mancini-Filho, J., Villavicencio, A. L. C. H.:** Consumer's evaluation of the

effects of gamma irradiation and natural antioxidants on general acceptance of frozen beef burger. Radiat. Phys. Chem., 78, 293- 300, 2009.

- 219. Türk Gıda Kodeksi Tebliğleri: Baharat Tebliği:** 31.07.2000 Tarih ve 24126 Sayılı Resmi Gazete yayımı, Tebliğ No: 2000/16.
- 220. Türk Gıda Kodeksi Tebliğleri: Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliği:** 07.07.2006 tarih ve 26221 Sayılı Resmi Gazete yayımı, Tebliğ No: 2006/31.
- 221. Türk Gıda Kodeksi Tebliğleri: Et Ürünleri Tebliği,** 10.02.2000 Tarih ve 23960 Resmi Gazete yayımı, Tebliğ No: 2000/4.
- 222. Türk Gıda Kodeksi Tebliğleri: Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği:** 06.02.2009 Tarih ve 27133 Sayılı Resmi Gazete yayımı, Tebliğ No: 2009/6.
- 223. Türk Gıda Kodeksi Tebliğleri: Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği.** 22.12.2003 tarih ve 25324 Sayılı Resmi Gazete yayımı Tebliğ No: 2003/44.
- 224. Türk Gıda Kodeksi: Gıda İşinlama Yönetmeliği,** 06.11.1999 tarih ve 23868 Sayılı Resmi Gazete yayımı.
- 225. Türk Sanayicileri ve İşadamları Derneği:** Türkiye’de tarım ve gıda: gelişmeler, politikalar ve öneriler. TÜSİAD Yayın No, T/2008- 05/459, 2008.
- 226. Türker, S.:** Hayvansal gıdalarda kalite kontrolü. Tamer matbaası, Ankara, 1997.
- 227. Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C.:** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications, Review. Antonie Van Leeuwenhoek., 82, 165- 185, 2002.
- 228. Üner, Y., Aksu, H., Ergün, Ö.:** Baharatın çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkileri, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 26 (1), 1- 10, 2000.
- 229. Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Guillèn, F., Castillo, S., Serrano, M.:** The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. Postharvest Biol. Tech., 41, 317- 327, 2006.
- 230. Valero, M., Francès, E.:** Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth, Short communication. Food Microbiol., 23, 68- 73, 2006.

- 231. Valero, M., Salmeron, M. C.:** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiology*, 85, 73-81, 2003.
- 232. Vazgeçer, B., Ulu, H., Öztan, A.:** Et ve et ürünlerinde baharatın antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Gıda*, 30 (2), 75- 81, 2005.
- 233. Vázquez, B. I., Fente, C., Franco, C. M., Vázquez, M. J., Cepeda, A.:** Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese, *Int. J. Food Microbiology*, 67, 157- 163, 2001.
- 234. Vitaglione, P., Fogliano, V.:** Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *J. Chromatography B*, 802, 189- 199, 2004.
- 235. Vural, N.:** Besin analizleri. Ankara Üniv., Eczacılık Fakültesi, Yayın no: 69, 1992.
- 236. Yadav, A. S., Bhatnagar, D. (a):** Free radical scavenging activity, metal chelation and antioxidant power of some of the Indian spices. *Biofactors*. 31 (3-4), 219- 227, 2007.
- 237. Yadav, A. S., Bhatnagar, D. (b):** Modulatory effect of spice extracts on iron-induced lipid peroxidation in rat liver. *Biofactors.*, 29 (2- 3), 147- 157, 2007.
- 238. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. and Pokorný, J.:** Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 108, 776- 793, 2006.
- 239. Yavuz, M., Korukluoğlu, M.:** *Listeria monocytogenes*'in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Uludağ Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt 24, Sayı 1, 1- 10, 2010.
- 240. Yıldırım, Y.:** Et teknolojisi. Yıldırım Basımevi, Ankara, 1988.
- 241. Yoshioka T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M.:** Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated- oxygen toxicity in the blood. *Am J. Obstet Gynecol.*, 135, 372- 376, 1979.
- 242. Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., Sun, X.:** Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81, 686- 692, 2009.

8. EKLER

8.1. Araçlar ve Çözeltiler

- 8.1.1. 0,02 N HCl:** 1,1885 g/ml yoğunluğundaki hidroklorik asitten (HCl) 1,66 ml alındı ve 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 8.1.2. Eber Reaktifi:** 1 kısım hidroklorik asit (HCl özgül ağırlığı 1,125), 1 kısım eter ve 3 kısım % 96'lık etil alkolden taze olarak hazırlandı ve ağzı kapalı koyu renkli cam şişede muhafaza edildi.
- 8.1.3. Fizyolojik Tuzlu Su:** 85 mg Sodyum Klorür (NaCl) 1000 ml distile suda çözdürüldü ve 121 °C'de 15 dak. sterilize edildi.
- 8.1.4. Fosfat Tamponu:** 17,418 g K_2HPO_4 ve 13,609 g KH_2PO_4 tartılarak 0,15 M KCl'de çözdürüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı. NaOH ile pH'sı 7,4'e ayarlandı.
- 8.1.5. MDA için Standart Çözelti:** 0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan (D.0,02; %97; MA: 220,3) 100 ml alkolde çözdürülerek 20 mmol/l'lik stok standart çözelti hazırlandı.
- 8.1.6. Tiyobarbitirik Asit (% 0,67):** 1,675 g 2-thiobarbitirik asit (TBA) distile suda çözüldü ve hacmi 250 ml'ye tamamlandı.
- 8.1.7. Triklorasetik Asit (% 20):** 200 g Triklorasetik asit (TCA) distile suda çözüldü ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

9. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Ankara, Aydın ve Burdur'da tamamladım. 1989 yılında başladığım Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1994 yılında yüksek lisans diploması ile mezun oldum. 1994- 2004 yılları arasında Antalya'da serbest Veteriner Hekim olarak çalıştım. 2004- 2005 yıllarında Manavgat İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nde Tarım Danışmanlığı yaptım. 2005- 2006 yılları arasında Antalya Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi'nde Veteriner Hekim olarak çalıştım. 2006 yılında Tunceli İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'ne kamu görevlisi olarak atandım. 2007 yılında KAÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nde Doktora eğitimime başladım. Ekim 2009 yılından itibaren Eğirdir İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nde çalışmaktayım.